



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **FACULTAD DE VETERINARIA**

Optimización del contenido y disponibilidad del licopeno y otros compuestos bioactivos en tomate y productos elaborados con tomate

**D. Sergio Bravo Lozar**  
2012



## **AGRADECIMIENTOS**

Uno siempre piensa que este momento nunca va a llegar. Durante el recorrido de este largo camino se hacía utópico pensar que estaría sentado frente a esta hoja en blanco con la imperiosa necesidad de ser agradecido. En este preciso instante se me vienen a la cabeza todos los momentos que he pasado hasta llegar aquí, todas las horas de trabajo, los dolores de espalda y calentamientos de cabeza persiguiendo un sueño que por fin está viendo la luz. Es verdad que es mi sueño, pero en este sueño son muchos los personajes que han significado mucho para mí, los cuales han sido pilares fundamentales en el desarrollo de esta tesis, así como de mi carrera universitaria y en mi crecimiento personal.

En primer lugar quería agradecer a la **Fundación Séneca** la concesión de la beca que ha hecho posible la realización de esta tesis doctoral, a **Juver Alimentación S.L.U** por facilitarme las muestras con la que se ha llevado a cabo parte del estudio, y a al **Dr. Francisco Rincón**, porque su conocimiento y saber hacer han ayudado en la realización de este proyecto.

Me gustaría dedicar algunas de mis primeras palabras a **MI FAMILIA**, porque son ellos los que más me han apoyado en todo momento. Agradecer a mi **madre** por sus sabios consejos, valores, motivación constante y sobre todo por su amor incondicional. A mi **padre** por enseñarme el valor para salir adelante, sin rendirse, y a mi **hermana** por mostrarme lo que significa esforzarse hasta desfallecer.

Con la edad he ido aprendiendo que la familia no solo son aquellos con los que estableces lazos de sangre, sino también con esas otras personas que te hacen sentir de la misma forma. Por eso mi **FAMILIA “Universitaria”** tiene un hueco importante en este apartado.

A **María Jesús**, a la que le debo mucho de este trabajo. Por ser más que una “jefa”, más que un ejemplo a seguir, por motivarme y ayudarme en muchos aspectos, haciendo posible mi crecimiento personal y profesional. A **Javi**, la calma en estado puro, por servirme de guía en todo este trabajo y por confiar siempre en mí. Así como a **Gaspar**, por sus palabras, su ayuda y por la “extraña” sensación de tranquilidad que genera el estar a su lado.

En el campo de batalla quiero destacar a dos ángeles que me han ayudado mucho más de lo que me hubiese atrevido a pedirles. A **Gala**, especialmente, porque

ha vivido esta tesis como la suya propia, compartiendo nervios, alegrías, dudas, horas de trabajo y momentos, sabiendo siempre diluir la presión y el estrés con entretenidas conversaciones, té muy caliente, cañas de chocolate y multitud de energía donada a lo “oso amoroso” (piuuu piuuu). Y claro está, a **Viki**, por su dedicación y trabajo, por las horas compartidas y porque si esta tesis pudiese llevar coautores, indudablemente se lo merecería.

A **Rocío** (el descubrimiento) e **Inma** (y olé) por su contribución, trabajo y conocimiento sobre compuestos fenólicos que ha sido de gran ayuda para la consecución de esta tesis. **Elvira** (mi increíble primera compañera de piso y amiga), **Lorena**, **Joaquín**, **Charly**, **Gema**, **Nicola** (Rata-cachorro Cullen), **Carlos**, **Carmen**, **Mamen**, **Rubén**, **Marina**, **Edu**, **Guillermo**, **Patri**, **Vero**, **Nieves**, **Darío**, **Michelle**, **Ana** y **Amparo** (pack sensaciones) y el resto de secuaces y demás seres que habitan o habitaron en el departamento, sin olvidar a **Toñi** (la solución). Gracias a todos (incluso a los que se me olvida mencionar) porque sois el mejor equipo que nunca nadie podría haber soñado. Siempre estáis para echarme una mano, enseñarme, tomar un café, dar un abrazo, preguntar qué tal estoy o encargáros de que todo estuviese en orden (**Cari** y su **niña**). Me hacéis sentir afortunado.

Más allá de las puertas de la universidad tampoco quería olvidarme de mi **FAMILIA “Alvalle”**, **Coca**, **Lola** y **Noelia**, y mi **FAMILIA “Internacional”**, el “Lycopene Team” (**Kati**, **Gabi**, **Lars**, **Assunta**, **Rosella**, **Volker**...) por enseñarme, formarme y tratarme como alguien especial. A mi **FAMILIA “adoptiva”**, encabezada por **José Vicente**, por permitir que mi estancia en Valencia fuera rica en conocimientos, datos y experiencias. Porque por su “culpa” conocí a grandes personas que ayudaron de una forma u otra a la realización de esta tesis, como **Patricia**, **Ana** y, especialmente, **Arancha**, que hizo todo cuanto estuvo en su mano por ayudarme.

Personalmente también me gustaría nombrar a dos personas muy especiales. A **Alber**, amigo, hermano y sobre todo el espejo donde siempre he querido mirarme, por ser la persona que primero me animó a empezar esta aventura, y a **Francis**, mi otro hermano, por estar siempre donde ha estado, cerca.

Tengo especial ilusión en cerrar este apartado con la persona que en el último año y medio no ha cesado de apoyarme. Por su dedicación, su empeño, su paciencia, por aguantar mis lágrimas y sonreírle a los malos momentos, por enseñarme que se puede, por su amor incondicional, por ocupar un lugar privilegiado en mi corazón, por mantenerme vivo y con ilusión, por cada abrazo y cada beso que encumbraba mi

ánimo para seguir adelante..., gracias **Beatriz** porque tú has sido el motor que lo impulsaba todo y el 50% de mi **PROPIA FAMILIA**.

Todos, cada uno a su manera y en su medida habéis hecho que me encuentre hoy aquí escribiendo los agradecimientos de esta tesis. Así que solo me queda despedirme de la única forma que os merecéis, y será diciendo humildemente...

**GRACIAS.**



*A toda mi gran **FAMILIA***



*Lo mejor del tomate está dentro...*



---

# Índice

---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	4
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	4
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	4
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
<b>COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL TOMATE</b> .....	5
<b>LICOPENO Y OTROS CAROTENOIDES DEL TOMATE</b> .....	8
-CAROTENOIDES.....	8
-FACTORES QUE AFECTAN AL CONTENIDO EN LICOPENO Y OTROS CAROTENOIDES.....	12
Genotipo, cultivo y condiciones de crecimiento .....	12
Grado de maduración.....	14
Almacenamiento y tratamientos post-cosecha .....	15
Efecto del cocinado/procesado y su posterior almacenamiento .....	17
-BIODISPONIBILIDAD DEL LICOPENO Y OTROS CAROTENOIDES .....	18
-PAPEL DEL LICOPENO Y OTROS CAROTENOIDES EN LA SALUD .....	20
<b>COMPUESTOS FENÓLICOS DEL TOMATE</b> .....	24
-COMPUESTOS FENÓLICOS .....	24
-FACTORES QUE AFECTAN AL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN TOMATES .....	26
Factores pre-recolección .....	27
Factores post-recolección .....	29
Procesado/cocinado .....	29
-BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS .....	30
Absorción y metabolismo .....	31

-COMPUESTOS FENÓLICOS Y SALUD .....	34
<b>OTROS COMPONENTES .....</b>	<b>36</b>
-VITAMINAS ANTIOXIDANTES.....	36
-LAS VITAMINAS Y LAS VARIACIONES EN SU CONTENIDO .....	37
-BIODISPONIBILIDAD DE LAS VITAMINAS C Y E .....	39
<b>CONSUMO DE TOMATE. INGESTA CON EFECTOS BENEFICIOSOS.....</b>	<b>41</b>
<b>CALIDAD ORGANOLÉPTICA DEL TOMATE .....</b>	<b>43</b>
-RUTAS DE SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN TOMATE.....	45
Síntesis de volátiles C6 (Degradación de ácidos grasos).....	45
Síntesis de apocarotenoides volátiles .....	46
Síntesis de volátiles derivados de aminoácidos.....	47
-FACTORES QUE AFECTAN A LA COMPOSICIÓN DE VOLÁTILES EN EL TOMATE...	47
 <b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	 <b>49</b>
 <b>DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	 <b>49</b>
-EXPERIENCIA 1: Estudio del efecto de la exposición a la luz uv-c en los compuestos bioactivos y actividad antioxidante del tomate .....	50
-EXPERIENCIA 2: Evolución de los compuestos bioactivos antioxidantes durante el almacenamiento en un zumo de tomate comercial.....	53
-EXPERIENCIA 3: Evolución de los principales compuestos volátiles responsables del aroma y su relación con la actividad enzimática y la estabilidad de los carotenoides durante el tratamiento térmico y el almacenamiento de un zumo de tomate refrigerado...	55
-EXPERIENCIA 4: Estudio de los factores que afectan a la disponibilidad <i>in vitro</i> de los carotenoides del puré de tomate.....	57
<b>METODOLOGÍAS ANALÍTICAS UTILIZADAS.....</b>	<b>61</b>
-DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES .....	61
-DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES.....	64
-DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES LIBRES .....	67
-DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS INDIVIDUALES .....	69

-DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE BASADA EN LA REDUCCIÓN DEL RADICAL ABTS <sup>+</sup> .....	70
-PODER ANTIOXIDANTE PARA REDUCIR AL IÓN FÉRRICO (FRAP) .....	74
-VITAMINA C.....	76
-DETERMINACIÓN DE LA DISPONIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DEL LICOPENO .....	78
-EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES .....	83
-TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS .....	85
-PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS.....	88
<b>ESTUDIO ESTADÍSTICO</b> .....	90
-EXPERIENCIA N°1 .....	90
-EXPERIENCIA N°2 .....	90
-EXPERIENCIA N°3 .....	90
-EXPERIENCIA N°4 .....	91
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	92
<b>EXPERIENCIA 1</b> .....	92
-TOMATES ROJOS.....	92
-TOMATES VERDES .....	98
<b>EXPERIENCIA 2</b> .....	106
<b>EXPERIENCIA 3</b> .....	120
-ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	120
-COMPUESTOS VOLÁTILES .....	122
-LICOPENO .....	128
-PERFIL AROMÁTICO.....	130
<b>EXPERIENCIA 4</b> .....	133
<b>CONCLUSIONES</b> .....	144
<b>RESUMEN</b> .....	147

<b>SUMMARY</b> .....	149
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	151
<b>ANEXO</b> .....	185

---

# Abreviaturas

---

**AA:** actividad antioxidante

**ABTS:** 2,2' Azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico

**ACF:** factores aparentemente críticos

**ADH:** alcohol deshidrogenasa

**Biliar:** sales biliares

**BHT:** hidróxitolueno butilado

**C:** concentración

**CAR:** carboxeno

**CE:** equivalentes de catequina

**Colip:** colipasa

**DVB:** divinil-benceno

**ERO:** especies reactivas de oxígeno

**FRAP:** poder antioxidante reductor del hierro

**GAE:** equivalentes de ácido gálico

**GD:** digestión gástrica

**HDL:** lipoproteínas de alta densidad

**HPL:** hidroperóxido liasa

**HPLC:** cromatografía líquida de alta resolución

**I-CAM:** moléculas de adhesión intercelulares

**ID:** digestión intestinal

**IF:** factores influyentes

**LOX:** lipoxigenasa

**MeOH:** metanol

**MF:** fracción micelar

**MPA:** ácido metafosfórico

**MTBE:** metil tert-butil éter

**Nº:** número

**NADH:** nicotidamida adenina dinucleótido

**ORAC:** capacidad de absorción de radicales de oxígeno

**Pancr:** pancreatina

**PB:** diseño experimental de Plackett-Burman

**ppm:** partes por millón

**ppb:** partes por billón

**TEAC:** capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox

**PDMS:** polidimetilsiloxano

**THF:** tetrahidrofurano

**Trolox:** ácido 6-hydroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-carboxílico

**T<sub>t</sub>:** tratamiento térmico

**UV:** luz ultravioleta

**UV-A:** luz ultravioleta A

**UV-B:** luz ultravioleta B

**UV-C:** luz ultravioleta C

**Vel:** velocidad

**V-CAM:** moléculas de adhesión vasculares

**VLDL:** lipoproteínas de baja densidad



---

# *Introducción*

---

A lo largo de los últimos años ha sido ampliamente discutido y aprobado que la dieta Mediterránea confiere beneficios para la salud con respecto a determinados tipos de cánceres y enfermedades cardiovasculares (Sofi *et al.*, 2008; Fargnoli *et al.*, 2009). Los beneficios de la dieta Mediterránea han sido atribuidos fundamentalmente al importante aporte de fibra, vitaminas, ácidos grasos polinsaturados  $\omega$ -3 procedentes del pescado y los  $\omega$ -6 de cereales integrales, y a los ácidos grasos monoinsaturados del aceite de oliva (Ortega, 2006). Además, los compuestos de naturaleza antioxidante u otros fitoquímicos, como los compuestos fenólicos del vino tinto, han sido reconocidos como parte fundamental de esta reconocida dieta. Más recientemente, la atención ha incluido los carotenoides y especialmente al licopeno, pigmento que le da el característico color rojo al tomate.

El tomate es originario de América del Sur, y fue introducido en Europa por los españoles en el siglo XVI. Durante las décadas siguientes, el cultivo de las diferentes variedades de tomates se extendió por España, Italia y Francia, siendo aceptado muy pronto en la región del Mediterráneo como un fruto comestible, pero durante su viaje hacia el norte y el este de Europa no generó la misma confianza y la mejor clasificación que obtuvo por más de un siglo fue la de una planta ornamental. En estas regiones fue conocido como "wolf peach" o melocotón de lobo, una traducción aproximada a partir del cual se originó su nombre botánico, *Lycopersicon*. Hoy en día su cultivo y consumo están ampliamente distribuidos por el mundo, aunque es especialmente relevante en la cocina mediterránea y mexicana. Se consumen en fresco, pero también se procesa en una amplia gama de productos que incluyen la salsa de tomate, sopa, puré, zumos, conservas en diversas formas junto con varios otros vegetales, hierbas y especias.

El tomate y sus derivados como el zumo, presentan en su composición una amplia variedad de compuestos bioactivos antioxidantes (carotenoides, vitaminas, compuestos fenólicos, etc), destacando el licopeno. Aunque los compuestos antioxidantes se encuentran de forma natural en el tomate fresco, su contenido se ve modificado por diferentes factores como son el tipo de cultivo y de variedad (Martínez-

Valverde *et al.*, 2002; Periago *et al.*, 2009; García-Valverde *et al.*, 2011) las condiciones agronómicas durante el cultivo (Tomás-Barberán y Espín, 2001; Dumas *et al.*, 2003), los tratamientos post-cosecha como la refrigeración, el almacenamiento, la exposición a la luz UV-C (Bramley, 2000; Toor y Savage, 2006; Liu *et al.*, 2009; Sliestad y Verheul, 2009), y, por el efecto del procesado tecnológico y culinario (Dewanto *et al.*, 2002; Ahuja *et al.*, 2006). Para que estos compuestos puedan tener un efecto beneficioso para la salud humana, es necesario que los mismos se encuentren en cantidades significativas y que sus contenidos se mantengan durante la vida comercial, además de presentarse en formas químicas que sean accesibles y disponibles. De este modo se favorece su absorción intestinal, siendo incorporados a la circulación sistémica e incrementando los niveles plasmáticos de antioxidantes, que puedan actuar frente a los radicales libres responsables del estrés oxidativo, o bien desarrollar efectos beneficiosos en el organismo sobre diferentes funciones fisiológicas.

Numerosos estudios científicos han puesto de manifiesto que el licopeno del tomate se absorbe mejor cuando se encuentra en productos procesados que en el tomate fresco, ya que la homogenización y el tratamiento térmico conlleva a una ruptura de la estructura celular quedando el licopeno más disponible para su absorción (Gartner *et al.*, 1997; Agarwal *et al.*, 2001; Richelle *et al.*, 2002). Además, la presencia de aceite de forma conjunta en el alimento favorece la formación de las micelas en el intestino delgado, facilitando de este modo su absorción (Ahuja *et al.*, 2006). Hay que prestar especial atención a la formación de isómeros del licopeno ya que estudios *in vivo* han puesto de manifiesto que el consumo de productos procesados incrementa la concentración plasmática de isómeros *cis* (Hadley *et al.*, 2003), que son mejor absorbidos en el intestino y presentan una mayor actividad antioxidante (Böhm *et al.*, 2002).

Estudios de intervención realizados previamente en nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto que el consumo de zumo de tomate de forma regular reduce el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (Jacob *et al.*, 2008). Los efectos beneficiosos del zumo de tomate sobre la salud estarían asociados al efecto sinérgico que desarrollan los distintos antioxidantes presentes en el mismo. Sin embargo, la presencia de licopeno juega un papel fundamental ya que este carotenoide es el compuesto mayoritario y se han propuesto diferentes mecanismos de acción mediante los cuales el licopeno puede disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular al disminuir el contenido de colesterol plasmático, modificar la

proporción de las lipoproteínas de baja densidad o LDL y reducir la presencia de determinados biomarcadores de riesgo cardiovascular, como son la proteína C reactiva y los marcadores de función endotelial V-CAM y el I-CAM (Jacob *et al.*, 2008; García-Alonso *et al.*, 2012).

Por ello el estudio en profundidad de los parámetros de calidad del zumo de tomate, tanto desde el punto de vista organoléptico como nutricional, ha despertado un interés en las empresas que comercializan este tipo de producto u otros con características similares como el gazpacho, sopas frías de tomate, etc. La puesta en el mercado de productos en los que se haya optimizado el contenido de estos compuestos antioxidantes (especialmente el licopeno en la materia prima), durante la fabricación y el almacenamiento es de importancia para poner en el mercado nuevos productos con un valor añadido, gracias a sus propiedades funcionales y sus posibles efectos beneficiosos para la salud. Además, también hay que señalar que las propiedades organolépticas de estos productos serán quienes jueguen un papel central en la calidad del tomate porque serán estas las que determinen su aceptación general por parte del consumidor.



---

# Objetivos

---

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido el estudio de la optimización del contenido en licopeno y otros compuestos bioactivos en zumo de tomate mediante tratamientos y procedimientos post-cosecha de producto fresco (conservación y radiación ultravioleta), y control del almacenamiento, evaluando los principales factores que afectan a la disponibilidad *in vitro*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Evaluar el efecto del tratamiento post-cosecha con radiaciones UV-C en el contenido de compuestos bioactivos (licopeno,  $\beta$ -caroteno y compuestos fenólicos) en el tomate tras la aplicación de dicho tratamiento, en diferentes etapas de maduración de los frutos.
- II. Conocer la evolución de los compuestos bioactivos antioxidantes del zumo de tomate (carotenoides, compuestos fenólicos y vitamina C), con especial atención a los isómeros del licopeno, durante la vida comercial utilizando diferentes condiciones de almacenamiento y envasado.
- III. Determinar los compuestos aromáticos presentes en el zumo de tomate refrigerado, analizando la evolución durante el almacenamiento y la relación existente con la estabilidad del licopeno
- IV. Identificar los factores que afectan a la disponibilidad *in vitro* del licopeno del tomate



---

# *Revisión bibliográfica*

---

## COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL TOMATE

El tomate es uno de los cultivos hortofrutícolas de mayor importancia económica en el mundo. Su demanda está en continuo aumento ya que el fruto del tomate y sus productos derivados son considerados alimentos saludables (Davies y Hobson, 1981) gracias a sus propiedades nutricionales y, en concreto, a su elevado contenido en compuestos de actividad antioxidante.

**Tabla 1.** Contenido nutricional del tomate (Composición química media/100g).

<b>Agua</b>	94.0	g <sup>1</sup>	<b>Vitamina B1</b>	0.06	mg <sup>2</sup>
<b>Calcio</b>	14.0	mg <sup>2</sup>	<b>Vitamina B2</b>	0.04	mg <sup>2</sup>
<b>Hierro</b>	0.5	mg <sup>2</sup>	<b>Vitamina E</b>	0.70	mg <sup>4</sup>
<b>Fósforo</b>	23.0	mg <sup>1</sup>	<b>Vitamina C</b>	13.7	mg <sup>4</sup>
<b>Potasio</b>	204.0	mg <sup>1</sup>	<b>Vitamina A</b>	13.6	µg <sup>2</sup>
<b>Sodio</b>	13.0	mg <sup>1</sup>	<b>Licopeno</b>	10.63	mg <sup>4</sup>
<b>Magnesio</b>	20	mg <sup>2</sup>	<b>Ácidos fenólicos</b>	5.36	mg <sup>4</sup>
<b>Yodo</b>	1.7	µg <sup>2</sup>	<b>Flavonoides</b>	5.02	mg <sup>4</sup>
<b>Zinc</b>	0.24	mg <sup>2</sup>	<b>Fibra</b>	1.04	g <sup>2</sup>
<b>Carbohidratos</b>	4.3	g <sup>1</sup>	<b>Proteínas</b>	0.9	g <sup>1,2</sup>
<b>Grasa</b>	0.2	g <sup>2,3</sup>	<b>Energía</b>	17.0	Kcal <sup>2</sup>

<sup>1</sup> (Alonso y Souza-Egipsy, 1998).<sup>2</sup> (Mapa, 2003).<sup>3</sup> (Belitz y Grosch, 1998).

<sup>4</sup> (Frusciante *et al.*, 2007)

Desde el punto de vista químico, al igual que la mayoría de los vegetales, el tomate es un alimento con un contenido mayoritario en agua (94%) y de escasa

riqueza en macronutrientes (Alonso y Souza-Egipsy, 1998). Sin embargo, cada vez suscita mayor interés por su contenido en micronutrientes, vitaminas y minerales (Belitz y Grosch, 1998), licopeno y en compuestos fenólicos, ambos de gran importancia nutricional por sus propiedades antioxidantes (Thompson *et al.*, 2000; Martínez-Valverde *et al.*, 2002).

Entre los hidratos de carbono disponibles o asimilables (almidón y azúcares libres) destacan por encima del resto la glucosa y la fructosa (Fernández-Ruiz, 2003). La fibra del tomate está compuesta principalmente por hidratos de carbono, con unos valores de fibra dietética que ascienden hasta el 80% del total de fibra, siendo la parte insoluble (celulosa, hemicelulosa y lignina) el componente principal, relevando a la fibra soluble (pectinas) a un segundo plano (García Herrera *et al.*, 2010; Navarro-González *et al.*, 2011).

El contenido en grasa es muy bajo (0.2%), estando constituido principalmente por triacilgliceroles, glico- y fosfolípidos (Belitz y Grosch, 1998). Aproximadamente la mitad de este contenido está constituido por grasas poliinsaturadas. Su bajo contenido en grasa determina que sea un alimento poco energético, ya que 100 gramos de tomate tan solo aportan entre 17 y 21 kcal.

De los elementos minerales el más destacado es el potasio, el cual se encuentra en mayores concentraciones que el sodio (Hernández y Sastre, 1999), hecho que ha sido identificado como un factor beneficioso para la salud cardiovascular (Wilcox *et al.*, 2003)

En los tomates presentan actividad antioxidante las vitaminas C (ácido ascórbico) y E ( $\alpha$ -tocoferol), los carotenoides, los flavonoides y otros compuestos fenólicos, elementos traza como selenio o el zinc, algunos compuestos azufrados y otras sustancias como el ácido lipoico o el coenzima Q (Hedges y Lister, 2005). Estos antioxidantes son capaces de desactivar los radicales libres que pueden estar presentes en el organismo a través de la dieta, la polución, el tabaquismo, exposición a la radiación ultravioleta o simplemente como parte de los procesos normales del organismo (Hedges y Lister, 2005). En la **Tabla 2** se muestra el contenido de algunos de estos antioxidantes.

El contenido de estos antioxidantes en el tomate puede variar de acuerdo a distintos factores como la variedad (Martínez-Valverde *et al.*, 2002; García-Valverde *et al.*, 2011), las condiciones de cultivo (Zushi y Matsuzoe, 1998; Fanasca *et al.*, 2006), el estado de maduración (Periago *et al.*, 2009; García-Valverde *et al.*, 2011), procesado

tecnológico (Gahler, *et al.*, 2003; Pérez-Conesa *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2010) y las condiciones de almacenamiento (Toor y Savage, 2006). La influencia de estos factores serán ampliamente descritos más adelante.

**Tabla 2.** Contenido de los principales antioxidantes en tomates (Hedges y Lister, 2005).

Componentes	Concentración (mg/100 g de peso fresco)
<b>Acido ascórbico</b>	15-48
<b>Carotenoides</b>	4-24
<i>β-caroteno</i>	0.4-1
<i>Licopeno</i>	3-18
<i>Fitoeno</i>	1-3
<i>Fitoflueno</i>	~1
<b>Ácidos fenólicos</b>	16-29
<i>Cafeico</i>	0.2-10
<i>Clorogénico</i>	1.3-3.8
<i>Coumárico</i>	0.1-1.6
<i>Ferúlico</i>	0.1-0.7
<b>Flavonoides</b>	
<i>Naringenina</i>	0.4-4.2
<i>Glicósidos de Quercetina</i> <i>(Fundamentalmente Rutina)</i>	0.3-4.3
<i>Glicósidos de Kaempferol</i>	0.02-0.10
<b>Vitamina E</b>	0.04-1.2

En cuanto a la distribución de los compuestos bioactivos en el fruto es importante saber que en la epidermis se encuentra el mayor porcentaje de estos compuestos. Toor y Savage (2005) concluyeron que el 52% del total de los antioxidantes (48% licopeno, 43% de ácido ascórbico, compuestos fenólicos 53%) de la fruta se encontraban en la epidermis del tomate, superando en porcentaje a la fracción contenida en pulpa y semillas. Estos datos suponen un factor muy importante a tener en cuenta en el momento de su consumo.

## LICOPENO Y OTROS CAROTENOIDES DEL TOMATE

### CAROTENOIDES

Los carotenoides son pigmentos naturales caracterizados por presentar propiedades funcionales diversas e importantes para el buen funcionamiento del organismo. Su estructura básica es un tetraterpeno simétrico y lineal, de 40 átomos de carbono, formado a partir de 8 unidades de isopreno. Este esqueleto puede modificarse dando como resultado una gran diversidad de estructuras, agrupadas en dos categorías: los carotenos (estrictamente hidrocarburos) y las xantofilas, derivadas de los anteriores por incorporación de funciones oxigenadas (Yahia y Ornelas-Paz, 2009).

Los carotenoides son sintetizados en una amplia variedad de organismos fotosintéticos, como las plantas y las algas, y no fotosintéticos como algunos hongos y bacterias (Stange y Flores, 2012), siendo responsables del color amarillo, naranja y rojo de la mayoría de frutos. Los animales, no son capaces de sintetizarlos y los incorporan a través de la dieta.

La principal función biológica de los carotenoides es la de servir como pigmentos accesorios en la captación de la luz durante el proceso fotosintético, y como sustancias fotoprotectoras (Vershinin, 1999), inhibiendo la propagación de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres, impidiendo de esta forma la acción nociva de éstos a nivel celular.

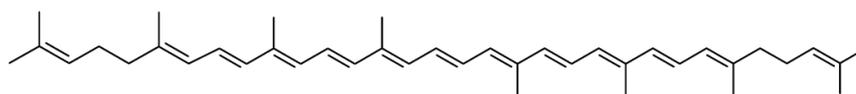
Los principales carotenoides presentes en los tomates se muestran en las **Tablas 2 y 3**, y las estructuras de algunos de estos compuestos se muestran en la **Figura 1**. El licopeno es el carotenoide predominante en tomates (Hadley, 2003), pigmento que aporta el color rojo característico de estos frutos. Aunque este pigmento es considerado el carotenoide más importante en tomates, por actividad y concentración, la presencia de una amplia gama de otros carotenoides no puede pasarse por alto. Destacan el  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\gamma$ -caroteno como precursores de la vitamina A, el fitoeno y fitoflueno, precursores incoloros del licopeno, y la luteína, una xantofila de coloración amarilla. Además de los ya citados, violaxantina, neoxantina, zeaxantina,  $\alpha$ -criptoxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\zeta$ -caroteno, neurosporeno, ciclicopeno y el 5, $\beta$ -caroteno,6-epóxido son otros carotenoides comúnmente encontrados en tomate y sus derivados (Fraser *et al.*, 1994; Paetau *et al.*, 1998; Khachik *et al.*, 2002; Burns *et al.*, 2003).

**Tabla 3.** Contenido en los principales carotenoides (mg/100 gr de peso fresco) de tomates y productos derivados (Beecher, 1998; Tonucci *et al.*, 1995; Dumas *et al.*, (2003). t *trazas*

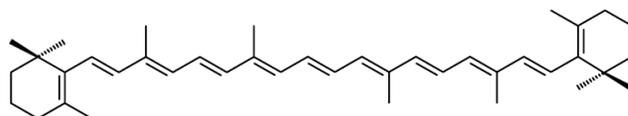
Carotenoides	Tomate fresco	Tomate en conserva	Salsa de tomate
<b>Fitoeno</b>	1.8	1.9	3
<b>Fitoflueno</b>	1.1	0.8	1.3
<b>z-Caroteno</b>	0.1	0.2	0.8
<b>Neurosporeno</b>	t	1.1	7
<b>Licopeno</b>	4.1	9.3	18
<b>γ -Caroteno</b>	t	1.5	3.2
<b>β -Caroteno</b>	0.8	0.2	0.5

La función biológica de licopeno está determinada por su estructura química. El licopeno es un carotenoide acíclico insaturado que contiene 11 dobles enlaces conjugados en la parte central de la molécula y 2 dobles enlaces no conjugados en cada extremo (**Figura 1**). Debido a la presencia de estos dobles enlaces conjugados, el licopeno muestra una importante actividad antioxidante, y es considerado como el carotenoide más eficiente en la neutralización de oxígeno singlete (Cantrell *et al.*, 2003), actividad dos veces superior a la de β-caroteno y 10 veces superior a la del α-tocoferol (Di Mascio *et al.*, 1989). Dado que el licopeno no contiene estructura de anillo β-ionona en el extremo de la molécula, no se puede convertir en vitamina A (retinol) a diferencia de otros carotenoides con actividad provitamina A como el β-caroteno y la β-criptoxantina

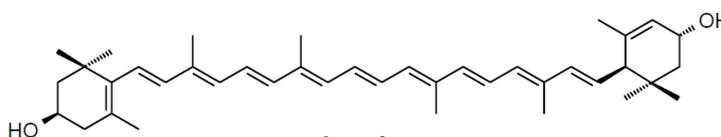
El licopeno presente en los tomates crudos está generalmente en la forma *all-trans*, termodinámicamente más estable, que constituye entre el 79–92% del licopeno total en tomates crudos maduros (Richelle *et al.*, 2002; García-Valverde *et al.*, 2011). Sin embargo, la luz, el calor o las reacciones químicas pueden provocar cambios conformacionales dando lugar a los distintos isómeros *cis* (**Figura 2**). Este cambio en la geometría de la molécula es significativo porque parece aumentar la biodisponibilidad del licopeno en humanos (Burri *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010).



Licopeno



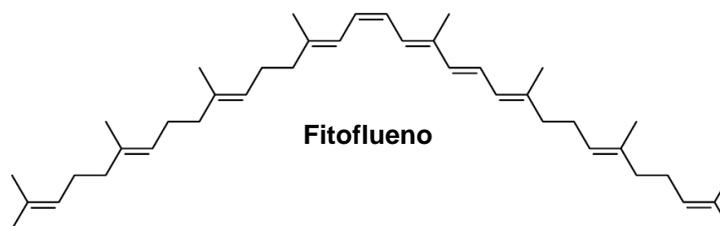
$\beta$ - Caroteno



Luteina

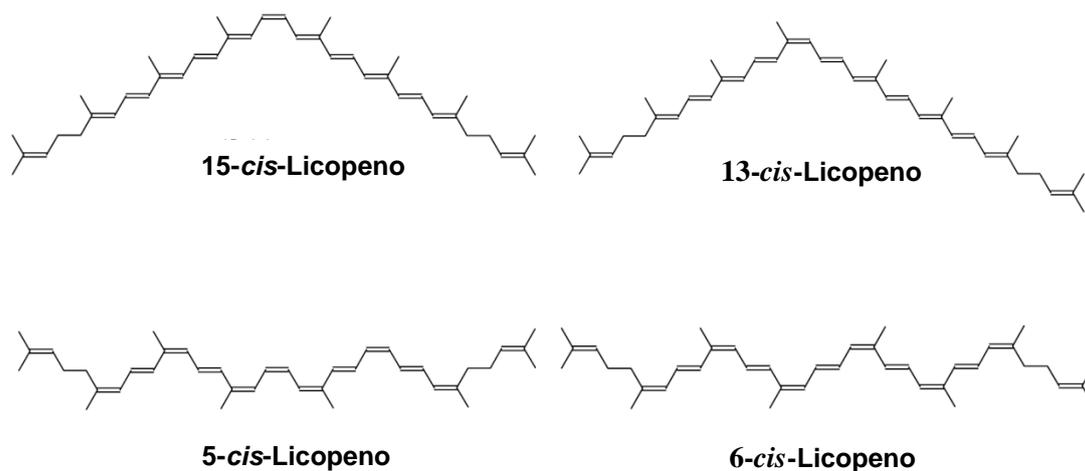


Fitoeno



Fitoflueno

**Figura 1.** Estructura química del licopeno y otros carotenoides importantes presentes en el tomate.



**Figura 2.** Estructura química de los isómeros *cis* del licopeno.

El licopeno es una molécula de características lipofílicas que se acumula en forma de estructuras semicristalinas unidas a la membrana de los cromoplastos o cloroplastos (Southon y Faulks, 2001). Su localización en el fruto se da de forma predominante en la piel (Al-Wandawi *et al.*, 1985; Sharma y Le Maguer, 1996; George *et al.*, 2004; Moco *et al.*, 2007).

Otro de los carotenoides importantes en el tomate, por su contenido y su actividad, es el  $\beta$ -caroteno (**Figura 1**). Este carotenoide es una molécula con propiedades antioxidantes (Wardlaw y Kessel, 2002; Yeum y Russell, 2002) y, particularmente importante desde el punto de vista nutricional, ya que el organismo fácilmente lo transforma en retinol, por lo que presenta actividad provitamina A (Biesalski *et al.*, 2007). Es sintetizado en la planta a partir del licopeno y su concentración depende, al igual que otros carotenoides, de las condiciones de cultivo, estado de madurez, tratamientos post-cosecha, almacenamiento, etc. (Maiani *et al.*, 2009).

FACTORES QUE AFECTAN AL CONTENIDO EN LICOPENO Y OTROS  
CAROTENOIDES.

Genotipo, cultivo y condiciones de crecimiento

La concentración de compuestos bioactivos del tomate puede variar según el genotipo, el tipo de cultivo y las condiciones de cultivo. Con el fin de maximizar el contenido de licopeno y otros carotenoides en el tomate, numerosas investigaciones se han llevado a cabo con el objetivo de evaluar estos factores (Abushita *et al.*, 2000; Dumas *et al.*, 2003; Martínez-Valverde *et al.*, 2002; Periago *et al.*, 2009; García-Valverde *et al.*, 2011). A la hora de potenciar estos compuestos bioactivos es importante tener en cuenta aspectos como la selección de variedades para maximizar el contenido de carotenoides y minimizar la variación del genotipo. Según estimaciones de la FAO, unas 50000 variedades de interés para el sector agrario se pierden cada año en el mundo. La «mejora tecnológica» provocó la desaparición de gran parte de la diversidad genética de los cultivos más importantes (Roselló *et al.*, 1998; Egea, 2010). Como consecuencia de lo que se conoció como la “Revolución verde”, en el caso particular de los tomates son muchas las variedades que se han dejado de utilizar en pro de aquellas que presentan mejor adaptabilidad, resistencia a patógenos, mayor tiempo de vida media o incluso, mayor productividad, prestando poca atención a las características cualitativas tales como sabor, la nutrición y la salud humana (Giovannoni, 2006; Dorais *et al.*, 2008). Sin embargo, en los últimos años ha existido un interés creciente en el contenido de compuestos bioactivos en los alimentos de origen vegetal en general y del tomate en particular. Por ello un mayor contenido en estos compuestos ha supuesto un nuevo factor de selección de variedades e híbridos. Como consecuencia, se han desarrollado un amplio número de nuevos cultivos de tomate con mayor contenido en licopeno. En la actualidad ya existen diversos estudios que revisan las características agronómicas y el contenido en licopeno de estos nuevos cultivos (Armendariz *et al.*, 2006; Cantore *et al.*, 2008).

Otro estudio reciente ha evaluado 49 tipos distintos de tomate y especies relacionadas, determinando el contenido en carotenoides (licopeno y  $\beta$ -caroteno) y vitamina C, con el objetivo de establecer qué variedades pueden ser utilizadas para futuros planes de mejora del contenido en compuestos bioactivos en tomate (Adalid *et al.*, 2010). Esto supone la confirmación de un cambio de dirección hacia una mayor preocupación por la salud y por aquellos componentes vegetales que la favorecen.

Autores como Abushita *et al.* (2000), Toor y Savage (2005) y García-Valverde *et al.* (2011), establecieron el contenido de carotenoides en variedades distintas de tomates, tanto para su consumo en fresco como para industria poniendo de manifiesto que el genotipo después del estado de madurez, una variable que afecta de manera importante al contenido en este tipo de compuestos (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Contenido de los principales carotenoides en distintos genotipos de tomate.

Estudios	Variedad de tomate	Contenido carotenoides (mg/100g Peso fresco)	
		Licopeno ( <i>trans</i> )	$\beta$ -Caroteno
Abushita <i>et al.</i> 2000	<i>Delfine</i>	6.51	0.43
	<i>Marlyn</i>	5.53	0.33
	<i>Tiffany</i>	6.23	0.34
	<i>Alambra</i>	5.40	0.33
	<i>Regulus</i>	6.60	0.55
	<i>Petula</i>	6.68	0.47
	<i>Diamina</i>	6.48	0.41
	<i>Brillante</i>	8.47	0.38
	<i>Casper</i>	6.61	0.25
	<i>Gobe</i>	5.92	0.40
	<i>Ispana</i>	6.22	0.31
	<i>Soprano</i>	8.65	0.32
	<i>Tenger</i>	7.66	0.23
	<i>Zaphyre</i>	6.95	0.38
	<i>Draco</i>	6.87	0.29
	<i>Jovanna</i>	11.61	0.34
	<i>K-541</i>	9.95	0.28
	<i>Nivo</i>	8.46	0.26
	<i>Simeone</i>	9.88	0.30
<i>Sixtina</i>	10.51	0.32	
García- Valverde <i>et al.</i> 2011	<i>Ronaldo</i>	7.47	0.28
	<i>Pera</i>	12.90	0.37
	<i>Zoco</i>	11.19	0.54
	<i>Cherry Pera</i>	10.28	0.53

Existen otros factores que afectan de manera determinante al contenido de licopeno y otros carotenoides. Entre ellos, la exposición directa de la luz solar es capaz

de disminuir la síntesis de licopeno (Dumas *et al.*, 2003; Brandt *et al.*, 2006), al igual que las temperaturas por debajo de 12°C y por encima de 32°C (Leoni, 1992; Dorais *et al.*, 2008). Otro factor agronómico que puede influir en la concentración final de licopeno es la disponibilidad de agua, siendo la escasez de esta la que podría producir un aumento en el contenido de este carotenoide (Dumas *et al.*, 2003; Mahajan y Singh 2006; Favati *et al.*, 2009). Finalmente, la disponibilidad de nutrientes en el sustrato también parece poder regular el contenido en carotenoides como el licopeno. La presencia de K y P parecen estar involucrados en un aumento del contenido de licopeno, mientras que el N, por el contrario, parece influir de manera negativa en la concentración del mismo, hecho relacionado con el aumento del follaje por un incremento de la disponibilidad de N, que permite una menor incidencia de la luz sobre el fruto (Dorais *et al.*, 2008).

Desde este punto de vista, más estudios son necesarios para establecer las condiciones agronómicas óptimas que favorezcan el aumento de carotenoides con un efecto beneficioso para la salud. Sería de gran interés obtener más datos que ayuden a entender más claramente cómo determinados factores agronómicos y técnicas de cultivo pueden afectar a la concentración de estos compuestos bioactivos. En la actualidad únicamente parecen estar claros los efectos de la luz y la temperatura, los cuales, junto con los antecedentes genéticos, son los principales determinantes responsables de la acumulación de estos compuestos durante el período de fructificación (Dumas *et al.*, 2003).

### Grado de maduración

La maduración de frutos de tomate implica cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares, incluyendo la degradación de la clorofila (pérdida del color verde) y la síntesis y el almacenamiento de carotenoides (aparición del color rojo), particularmente licopeno, durante la transición de cloroplastos a cromoplastos fotosintéticamente inactivos (Brandt *et al.*, 2006). Dicha transformación se caracteriza por una rápida degradación del aparato fotosintético y la síntesis y acumulación masiva de carotenoides, la cual continúa incluso después de la cosecha mientras el fruto permanezca intacto. Así pues, existe una diferencia en el contenido de licopeno según el estado de madurez del fruto. García-Valverde *et al.* (2011) evidenciaron el efecto del grado de maduración en la concentración de los principales carotenoides, tal y como se muestra en la **Tabla 5**. Este efecto de la maduración en la carotenogénesis

fue previamente descrito en otros estudios como el de Meredith y Purcell (1966), Cabibel y Ferry (1980), Brandt *et al.* (2006) o Periago *et al.* (2009).

**Tabla 5.** Contenido en licopeno y  $\beta$ -caroteno (expresado como mg/Kg de peso fresco) de 4 variedades de tomate durante las distintas fases de maduración. (García-Valverde *et al.*, 2011).

Muestra	Estado de maduración	Licopeno	$\beta$ -Caroteno
Ronaldo	Verde	0.94	0.76
	Cambiante	9.24	2.47
	Rosa	14.75	1.90
	Rojo	74.73	2.76
Pera	Verde	0.39	0.87
	Cambiante	18.08	2.34
	Rosa	35.84	2.39
	Rojo	128.69	3.65
Zoco	Verde	0.61	1.41
	Cambiante	9.12	4.24
	Rosa	15.17	3.21
	Rojo	111.93	5.36
Cherry Pera	Verde	0.58	1.61
	Cambiante	6.47	4.21
	Rosa	27.76	5.44
	Rojo	102.84	5.26

#### Almacenamiento y tratamientos post-cosecha

El tomate se define como un fruto climatérico, ya que muestran un incremento más o menos marcado en la tasa respiratoria y en la síntesis de etileno, proceso que tiene lugar aunque la fruta sea separada de la planta inmediatamente antes de madurar. Por lo tanto, el metabolismo de los tomates continúa activo y de forma independiente una vez recolectado, hasta finalmente deteriorarse y perder todo su valor (Yanuriati *et al.*, 1999). Desde este punto de vista, las condiciones de almacenamiento también son un factor a tener en cuenta en la modulación de la síntesis de compuestos activos del tomate.

Para extender la vida media de frutas y vegetales, su metabolismo respiratorio es enlentecido mediante el uso de bajas temperaturas de almacenamiento y atmósferas modificadas con altas concentraciones de dióxido de carbono (Kalt *et al.*, 1999). El almacenamiento a temperaturas por debajo de los 7°C inhibe la acumulación de licopeno durante el proceso de maduración de los tomates, mientras que puede aumentar hasta 3 veces su concentración almacenándolos en un rango de temperaturas de entre 15-25°C (Toor y Savage 2006). Por el contrario, un almacenamiento por encima de los 30°C disminuye su concentración y eleva la de  $\beta$ -caroteno (Pék *et al.*, 2010). Si la maduración sucede a temperaturas inferiores a 12°C, subóptimas para la síntesis de licopeno, en los cromoplastos se acumula  $\beta$ -caroteno, cuya síntesis progresa a esas temperaturas, dando lugar a frutos anaranjados o amarillentos (Shewfelt *et al.*, 1988; López-Camelo *et al.*, 2003).

El desarrollo del color del tomate también está influenciado por la composición de la atmósfera de conservación. Se ha demostrado que los cambios aplicados en las concentraciones de O<sub>2</sub> tienen un efecto mayor que las de CO<sub>2</sub>, aunque con 3-5 kPa CO<sub>2</sub> se retrasa la maduración del tomate, en parte por inhibición de la biosíntesis de etileno (Yang y Chinnan, 1987). Kader, (2000) y Ben-Yehoshua, (2003), han expuesto que el uso de entre 40 y 50 kPa de O<sub>2</sub> acelera la maduración del tomate, y que entre 60 y 100 kPa de O<sub>2</sub> se produce la estimulación de la biosíntesis de licopeno en las variedades con genes mutantes de la maduración (“rin” o “inhibidor de la maduración” y “nor” o “sin maduración”).

La luz también juega un papel primordial en la síntesis de licopeno. Estudios como el de Soto-Zamora *et al.* (2005) evidenciaron el efecto positivo de las condiciones de escasa iluminación en el aumento de este carotenoide, cuya síntesis está altamente relacionada con la temperatura que alcanza la superficie del tomate al incidir la luz sobre él. Sin embargo, también existen estudios que evidencian el papel positivo de la luz solar y de ciertas longitudes de onda. La luz ultravioleta C (283–200 nm) y la roja (610–750 nm) pueden actuar como reguladores de la síntesis y acumulación de carotenoides, especialmente del licopeno durante el almacenamiento (Liu *et al.*, 2009; Maharaj *et al.*, 2010). La luz ultravioleta B (320–280 nm) parece tener un efecto positivo sobre el contenido del principal carotenoide en tomate cuando se aplica en una intensidad de 80 kJ/m<sup>2</sup>, pero también tiene asociados efectos no tan deseables como la pérdida de textura, color y capacidad antioxidante (Liu *et al.*, 2011).

Efecto del cocinado/procesado y su posterior almacenamiento

Todo producto derivado del tomate conlleva un procesado y en la mayoría de los casos tiene asociado un tratamiento térmico necesario para la esterilización o pasteurización del producto. Generalmente, este proceso puede significar una pérdida de carotenoides, dado que estos son sensibles a la temperatura (Shi y Le Maguer, 2000), si bien esta pérdida suele estar enmascarada por la evaporación de agua y consecuente concentración de los mismos. Por lo tanto, los tomates procesados aún pueden contener elevadas cantidades de carotenoides, lo cual representa una de las razones para recomendar la ingesta de estos productos.

En este sentido, el tratamiento térmico de alimentos es uno de los factores que pueden afectar la biodisponibilidad del licopeno y por lo tanto favorecer su absorción. Este hecho está basado en parte en el proceso de isomerización que sufre el licopeno cuando es sometido a un tratamiento térmico, produciéndose la transición de las formas *all-trans* a los isómeros *cis*. Estos isómeros presentan una mayor biodisponibilidad (Boileau *et al.*, 2002; Unlu *et al.*, 2007), además de mostrar una mayor capacidad antioxidante (Böhm *et al.*, 2002). Además del calor, la luz, los ácidos orgánicos y otros factores han sido descritos como causantes de isomerización (Schierle *et al.*, 1997; Nguyen y Schwartz, 1998; Shi *et al.*, 1999).

La ingesta de licopeno junto con aceite es otro de los factores que pueden influir en su biodisponibilidad (Ahuja *et al.*, 2006). Un estudio en humanos muestra que la presencia de aceite en ensaladas aumentó el contenido de licopeno en el plasma en comparación a la ensalada sin aceite (Brown *et al.*, 2004). En este sentido, Fielding *et al.* (2005) observaron que tras el consumo de tomates cocinados con aceite de oliva se incrementa considerablemente la concentración de licopeno en el plasma humano en comparación con los tomates cocinados sin aceite de oliva, debido probablemente a que la grasa es necesaria tanto para la liberación del licopeno de la matriz alimentaria como para su incorporación en las micelas que se forman en el intestino delgado. La grasa a su vez estimularía la secreción de ácidos biliares lo que favorecería la formación de estas micelas (During y Harrison, 2004; 2005b).

Desde otro punto de vista del procesado y generalmente como paso previo en la producción de productos procesados de tomate, la homogeneización mecánica del tomate también supone una mejora en la extracción de carotenoides. Este proceso provoca la rotura de las membranas celulares, favoreciendo la liberación de los carotenoides como el licopeno. Por lo tanto, la integridad de la matriz celular de

tomates determina la biodisponibilidad de los carotenoides y su rotura mediante homogeneización mecánica permite su liberación de la matriz alimentaria (van het Hof *et al.*, 2000). A pesar de ello, estudios más recientes como el de Pérez-Conesa *et al.*, (2009) no encontraron en la homogeneización (y posterior pasteurización) un tratamiento positivo para la liberación de los carotenoides

En la actualidad también están siendo estudiadas otros tipos de tecnologías en el procesamiento de tomate como es el caso de la aplicación de campos eléctricos pulsados. Esta tecnología se presenta como una alternativa a los tratamientos térmicos convencionales en la preservación de los alimentos. En lo que respecta a compuestos como el licopeno, la aplicación de campos eléctricos pulsados de intensidad moderada, puede favorecer un incremento de hasta el 20% de este carotenoide en los productos de tomate resultantes. La consecuencia de este incremento podría deberse a una respuesta frente al estrés provocado por la aplicación de esta tecnología, aunque también por un incremento de la permeabilidad celular de membrana que favorecería una extracción más eficiente de los compuestos bioactivos como el licopeno (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2012).

#### **BIODISPONIBILIDAD DEL LICOPENO Y OTROS CAROTENOIDES**

La biodisponibilidad es definida como la parte del nutriente que el cuerpo digiere, absorbe y utiliza en sus funciones fisiológicas. Esta biodisponibilidad puede variar entre el 0% y el 100%, y en el caso de carotenoides es altamente variable a la vez que está influenciada por las especies y estructuras de los carotenoides presentes en el alimento, por la composición y liberación de la matriz del alimento, cantidad consumida y absorción en el tracto intestinal, transporte junto con la fracción lipoproteica, conversiones bioquímicas y su deposición en tejidos específicos, al igual que por el estado nutricional de cada individuo (Kopsell y Kopsell 2012).

El cuerpo humano es incapaz de sintetizar carotenoides por lo que debe obtenerlos a partir de la alimentación. En general, el tomate y sus productos derivados suponen al menos el 85% del licopeno ingerido a través de la dieta (Rao y Agarwal 2000). El resto, un 15%, suelen obtenerse de otras frutas con menor contenido en este carotenoide como la sandía o el pomelo.

Por su carácter liposoluble la absorción del licopeno estará muy relacionada con la absorción de grasas, por lo que cualquier factor que disminuya la secreción de

los ácidos biliares disminuye la absorción de licopeno. En el estómago y duodeno, el licopeno se separa de la matriz del alimento y se incorpora a la fase lipídica (Krinsky y Johnson, 2005), previa actuación en el proceso de las sales biliares y la lipasa pancreática. Este proceso favorece la formación de vesículas lipídicas que se absorben en el intestino delgado mediante difusión pasiva (Krinsky y Johnson, 2005), aunque, como se ha visto en algunos estudio *in vitro*, en la absorción intestinal del licopeno pueden estar implicados transportadores específicos de membrana (During y Harrison, 2004; 2005a), lo que implicaría un transporte activo. Transportadores como el CD36, SB-R1 o NPC1L1 podrían estar implicados en el transporte activo de carotenoides hacia el interior de las células epiteliales intestinales (van Bennekum *et al.*, 2005).

Existen varios factores no fisiológicos que pueden afectar a la absorción de licopeno. Debido a su carácter lipofílico es mejor absorbido en presencia de grasas (Ahuja *et al.*, 2006; Fernández-García *et al.*, 2012) aunque un alto contenido en fibra es capaz de reducir la absorción del licopeno disminuyendo sus niveles hasta un 40% en plasma (Goñi *et al.*, 2006; Fernández-García *et al.*, 2012). El cocinado también es un factor relevante en la biodisponibilidad del licopeno ya que este aumenta su bioaccesibilidad (liberación de la matriz alimentaria) además de favorecer procesos de isomerización del licopeno que dan lugar a las formas *cis* del licopeno (**Figura 2**). Esta configuración de la molécula favorece su biodisponibilidad (Failla *et al.*, 2008). Se ha hipotetizado que este fenómeno es debido probablemente a que la configuración *cis* disminuye el espacio ocupado por la molécula en comparación con el isómero lineal *all-trans*. Este hecho evitaría la agregación y formación de cristales en las gotas lipídicas, facilitando así su incorporación a las micelas (Britton, 1995; Boileau *et al.*, 2002). También es posible que la configuración *cis* licopeno pueda unirse de forma más favorable a los transportadores de membrana responsables de la absorción de los carotenoides en el borde en cepillo de las células epiteliales intestinales (During *et al.*, 2005b; Reboul *et al.*, 2005).

Tras ser ingerido e incorporado a las micelas, el licopeno aparece en el plasma, inicialmente en los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y posteriormente en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL), aunque los mayores niveles aparecen en las LDL (Clinton, 1998).

El licopeno absorbido se distribuye por todo el cuerpo a través el sistema circulatorio. Además, este compuesto es el carotenoide más abundante en el plasma humano con una vida media de aproximadamente 2-3 días (Stahl y Sies, 1996).

Aunque en las plantas los isómeros más abundantes de licopeno son los *all-trans* (Richelle *et al.*, 2010), en el plasma humano existe una concentración considerable de isómeros *cis* alcanzando valores de entre el 50-60% de la concentración total de licopeno (Rao y Agarwal, 2000; Richelle *et al.*, 2010), lo que podría implicar un proceso de isomerización que tendría lugar probablemente en el interior de las células intestinales (Richelle *et al.*, 2010).

En cuanto a la distribución del licopeno en el organismo, son muchos los autores que han determinado la concentración de este carotenoide en el cuerpo humano. Goralczyk y Siler (2004) determinaron que la concentración de licopeno en los tejidos podía variar entre 2-21 nmol/g de tejido, encontrándose la más alta en testículos humanos, seguidos de la glándula adrenal, hígado, próstata, mama, páncreas, piel, colon, ovario, pulmón, estómago, riñón, tejido adiposo y cuello uterino. Erdman, (2005), encontró que las concentraciones más altas de licopeno aparecían en el hígado, glándulas adrenales y los tejidos reproductivos como los testículos (diez veces más alta que otros tejidos). Este carotenoide también puede encontrarse en heces y orina. (Zaripheh *et al.*, 2003)

En el organismo humano, tras un proceso oxidativo fisiológico, los principales metabolitos del licopeno encontrados en el suero son el 1,2-epóxido de licopeno y el 5,6-epóxido de licopeno y en menor proporción el 1,2;5,6-diepóxido de licopeno, 1,2;5',6'-diepóxido de licopeno, 5,6;5',6'-diepóxido de licopeno y 1,2;1',2'-diepóxido de licopeno (Fernández-Ruiz *et al.*, 2007). De forma alternativa, también se ha hipotetizado que su origen en el suero humano se debe a su presencia, en cantidades muy pequeñas, en los productos derivados del tomate sometidos a altas temperaturas de procesado (Khachik *et al.*, 2002).

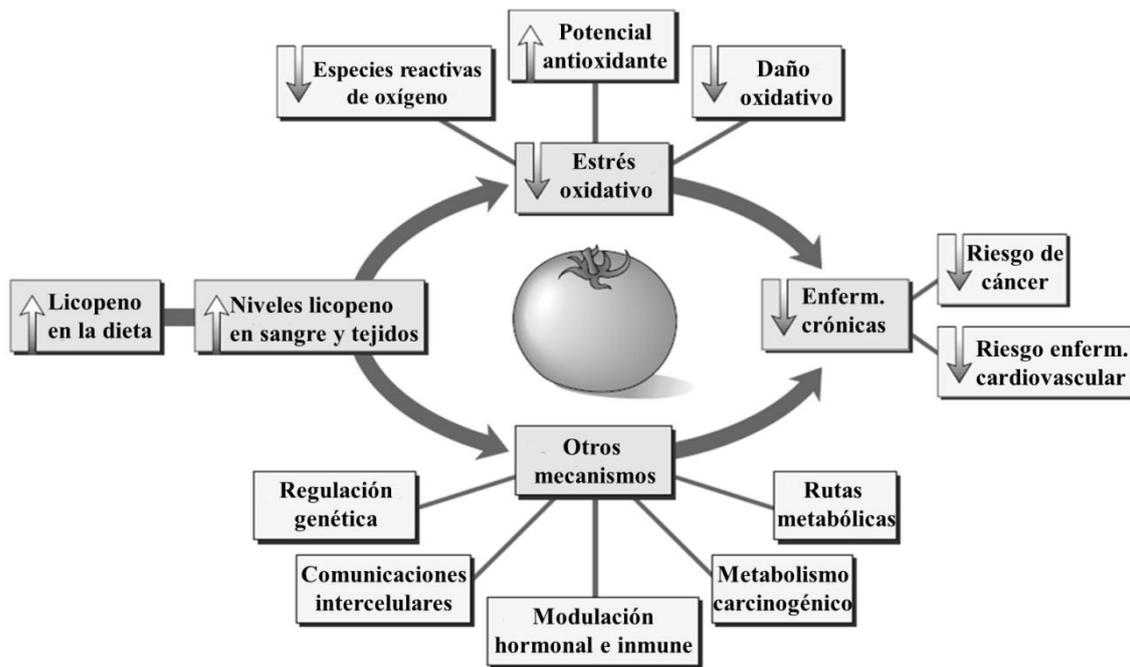
#### *PAPEL DEL LICOPENO Y OTROS CAROTENOIDES EN LA SALUD*

El estrés oxidativo inducido por especies reactivas del oxígeno (ERO), se asocia con la incidencia de enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedad cardíaca coronaria o la osteoporosis (Rao y Agarwal, 1999). Las ERO se producen endógenamente como producto del proceso metabólico normal, o de factores de la vida diaria como la dieta, el humo del tabaco y el ejercicio. Los antioxidantes, en virtud de su capacidad de interactuar con las ERO, pueden mitigar este daño, por lo que juegan un papel importante en la prevención de las enfermedades crónicas.

El licopeno, presente en frutas y verduras, y especialmente en el tomate y productos derivados, es un potente antioxidante que puede neutralizar ERO, reducir el estrés oxidativo y el peligro de oxidación de los componentes celulares, incluyendo lípidos, proteínas y ADN (Agarwal & Rao, 2000). La oxidación de estos componentes es un proceso implicado en el desarrollo de las enfermedades crónicas, tales como las cardiovasculares, el cáncer y la osteoporosis, por lo que el licopeno y su potente actividad antioxidante pueden reducir el riesgo de padecerlas (Wertz *et al.*, 2004).

Son numerosos los estudios donde se ha estudiado el papel de licopeno tanto en la prevención como en el desarrollo de enfermedades tales como distintos tipos de cáncer (Gann *et al.*, 1999; Giovannucci *et al.*, 2002; Jian *et al.*, 2005), enfermedades coronarias (Rao y Heber, 2001; Rao, 2002; Rao y Balachandran, 2003a), enfermedades relacionadas con los huesos como la osteoporosis (Ishimi *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2007), la hipertensión (Paran y Engelhard 2001, Moriel *et al.*, 2002; Paran 2006), la cirrosis (Paran y Engelhard, 2001; Rao *et al.*, 2006), infertilidad masculina (Gupta y Komar, 2002), enfermedad neurodegenerativas como el Alzheimer (Rao y Balachandra, 2003b), la enfermedad de Parkinson (Schmidt *et al.*, 1997; Foy *et al.*, 1999) o la esclerosis lateral amiotrófica (Longnecker *et al.*, 2000) y la diabetes (Upritchard *et al.*, 2000). Además, han sido demostradas actividades radioprotectoras del licopeno en ratones de laboratorio y se han demostrado bajos niveles de licopeno sérico en mujeres y niños con el virus de inmunodeficiencia humana (Coodley *et al.*, 1995; Periquet *et al.*, 1995). Con referencia a otras enfermedades, la comunidad científica trata en la actualidad de investigar más a fondo el papel que desempeña el licopeno en enfermedades de la piel, artritis reumatoide, enfermedades periodontales y procesos inflamatorios (Waliszewski y Blasco, 2010).

El licopeno puede actuar mediante dos formas (**Figura 3**). Su acción más destacada la ejerce como un antioxidante, pudiendo inactivar radicales libres o atenuando reacciones de oxidación, particularmente la peroxidación lipídica y el daño oxidativo del DNA, evitando así el daño en los tejidos y posibles procesos cancerosos. El licopeno también puede actuar frente a otros procesos no oxidativos como regulador de las uniones intercelulares GAP, regulación de la expresión génica, modulación de la función hormonal e inmune, y con actividad antiproliferativa y pro-diferenciativa (Agarwal y Rao, 2000). Estos mecanismos pueden estar interrelacionados u operar simultáneamente para reducir el riesgo de varios tipos de canceres (Agarwal y Rao, 2000).



**Figura 3.** Los efectos biológicos del licopeno en la prevención de enfermedades crónicas (Rao y Argawal 2000).

La mayoría de los estudios sobre carotenoides están basados en el licopeno ya que su poder antioxidante es mayor que el de otros carotenoides, como el  $\beta$ -caroteno (Di Mascio *et al.*, 1989). Sin embargo, existen otros carotenoides, fundamentalmente aquellos que presentan actividad provitamina A, que desempeñan un papel importante en la salud (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Función y efecto de los principales carotenoides del tomate con actividad provitamina A (Tanaka *et al.*, 2012).

Carotenoides	Función	Efecto
<b><i><math>\alpha</math>-caroteno</i></b>	Provitamina A; Antioxidante	Inmuno-potenciador. Estimula la comunicación celular. Disminuye el riesgo de algunos tipos de cáncer
<b><i><math>\beta</math>-caroteno</i></b>	Provitamina A; Antioxidante	Inmuno-potenciador. Disminuye el riesgo de algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. La suplementación con altas dosis puede incrementar el riesgo de cáncer de pulmón entre fumadores
<b><i><math>\beta</math>-criptoxantina</i></b>	Provitamina A; Antioxidante	Efectos antiinflamatorios. Inhibe el riesgo de algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Inmuno-potenciador

$\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina, son algunos de los compuestos que presentan actividad provitamina A, ya que en el cuerpo humano son capaces de ser metabolizados y originar vitamina A, molécula esencial para la diferenciación celular, desarrollo embrionario y visión nocturna, a parte de tener un papel relevante en procesos como la síntesis de glicoproteínas, carcinogénesis y la producción de hormonas del crecimiento (Underwood y Arthur, 1996; McCullough *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2006; Marceau *et al.*, 2007). La capacidad de los carotenos para actuar como provitamina A depende de la conversión en retinol por los animales, así como de la presencia de  $\beta$ -ionona. Los carotenos que contienen como mínimo un anillo de  $\beta$ -ionona pueden convertirse en retinol en los animales. De esta forma, el carotenoide con mayor actividad de vitamina A gracias a su estructura química es el  $\beta$ -caroteno, que contiene dos de estos anillos (**Figura 1; Tabla 7**) (Meléndez-Martínez *et al.*, 2004a).

**Tabla 7.** Carotenoides con actividad provitamina A. Los valores son relativos al  $\beta$ -caroteno (Bauernfeind, 1972).

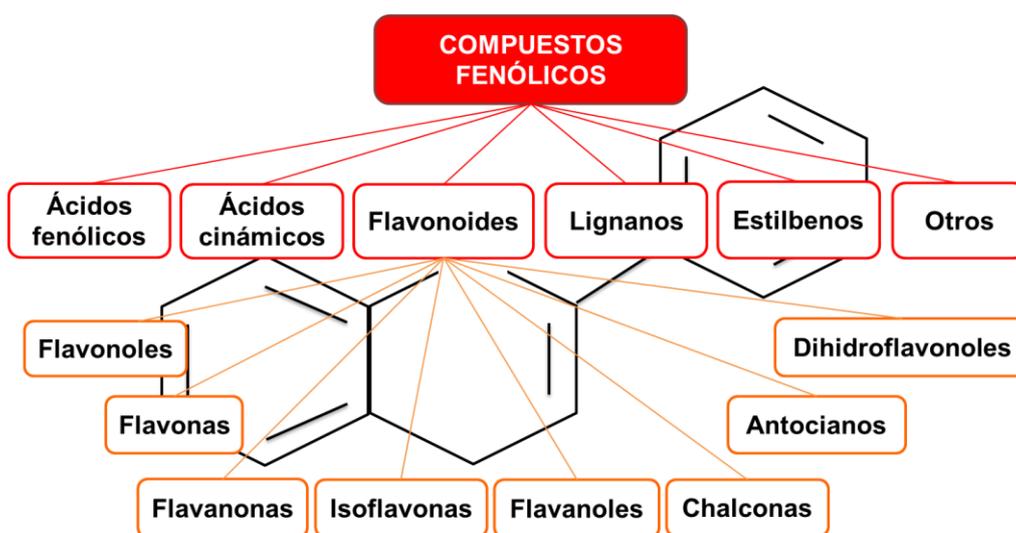
Carotenoides	Porcentaje de actividad
$\beta$ -caroteno ( <i>trans</i> )	100
$\beta$ -caroteno ( <i>cis</i> )	38-53
$\alpha$ -Caroteno ( <i>trans</i> )	53
$\alpha$ -Caroteno ( <i>cis</i> )	13-16
$\beta$ -Criptoxantina ( <i>trans</i> )	57
$\beta$ -Criptoxantina ( <i>cis</i> )	27-42

## COMPUESTOS FENÓLICOS DEL TOMATE

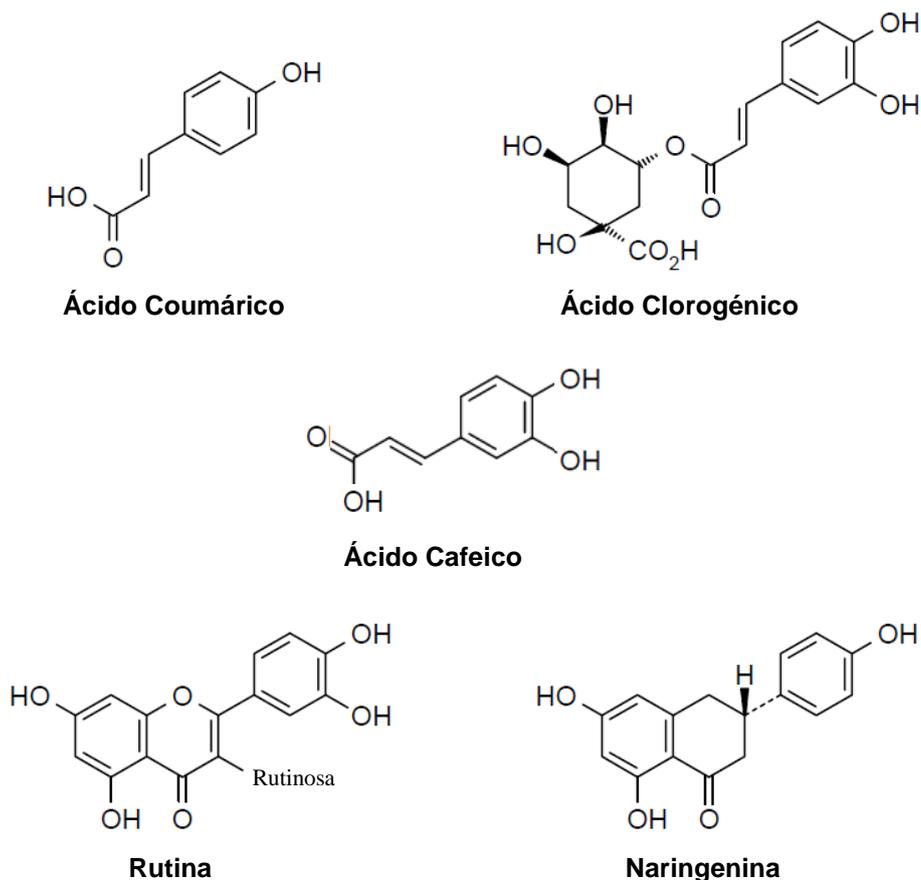
### COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8000 compuestos distintos. Pueden englobarse dentro de un importante grupo de fitoquímicos bioactivos no nutricionales, donde también se incluyen a los terpenoides (carotenoides y fitoesteroles) y a los compuestos azufrados (glucosinolatos y compuestos de aliáceas). En las plantas desempeñan funciones relacionadas con el crecimiento y reproducción, y en procesos defensivos frente a patógenos, depredadores o radiación ultravioleta.

Los compuestos fenólicos se encuentran en la mayoría de las 350 especies vegetales consumidas regularmente por el hombre (Scalbert y Williamson, 2000) y son en parte responsables de las propiedades organolépticas de los alimentos de origen vegetal (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Se clasifican en diferentes grupos (**Figura 4**), aunque los más comunes en los alimentos son generalmente los ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos, estilbenos, cumarinas y taninos (Harbourne, 1993). Los ácidos fenólicos y los flavonoides son los grupos más representativos presentes en el tomate. En la **Figura 5** se muestran las estructuras de los principales compuestos fenólicos en tomates.



**Figura 4.** Clasificación de los compuestos fenólicos.



**Figura 5.** Estructura química de los principales compuestos fenólicos en tomates.

Según la literatura, el contenido en compuestos fenólicos totales de los tomates puede oscilar en un intervalo comprendido entre 16 (Davies y Hobson, 1981) y 50 mg/100 g de peso fresco (Martínez-Valverde *et al.*, 2002). En este intervalo se encuentran los datos aportados por otros autores (Minoggio *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2007; García-Valverde *et al.*, 2011). Martínez-Valverde *et al.*, (2002) determinaron el contenido de compuestos fenólicos individuales en tomates de distintas variedades, destacando la presencia de los ácidos coumárico (hasta 0.58 mg/100 g de peso fresco), clorogénico (1.43-3.28 mg/100 g de peso fresco) y cafeico (0.14-1.30 mg/100 g peso fresco), así como quercetina (0.72-4.36 mg/100 g peso fresco), kaempferol (hasta 0.21 mg/100g de peso fresco) y naringenina (hasta 1.26 mg/100 g de peso fresco). Estudios más recientes, como el de García-Valverde *et al.* (2011), muestran al ácido clorogénico y a la rutina (derivado glicosilado de la quercetina) como los principales compuestos fenólicos del tomate (**Tabla 8**). Las variaciones en el contenido entre los distintos estudios recogidos en la literatura científica se deben a las

diferencias en las muestras de tomate, variedades y formas de cultivo fundamentalmente, aspectos que serán ampliamente desarrollados en apartados posteriores.

**Tabla 8.** Contenido en compuestos fenólicos en tomates maduros de distintas variedades (García-Valverde *et al.*, 2011).

Variedad de tomate	Ronaldo	Pera	Zoco	Cherry Pera
<b>Compuestos fenólicos totales</b>	239.37	259.5	291.12	558.63
<b>Ácido Clorogénico</b>	16.81	17.66	<i>nd</i>	29.29
<b>Ácido Cafeico</b>	<i>nd</i>	2.84	<i>nd</i>	<i>nd</i>
<b>Ácido Ferúlico</b>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.93
<b>Rutina</b>	8.23	9.64	2.55	31.07
<b>Naringenina</b>	0.29	<i>nd</i>	<i>nd</i>	3.42

*nd* (no detectado)

Los compuestos fenólicos tienden a acumularse en las vacuolas de la epidermis de las plantas, fuera del alcance de las enzimas oxidativas. Su localización se debe a su probable papel en la protección contra la radiación ultravioleta, y como productos químicos de defensa contra patógenos y depredadores (Strack 1997). De esta forma, muchos autores han comprobado que en el tomate, los compuestos fenólicos tienden a acumularse en la piel, en comparación con la pulpa y las semillas (Toor y Savage 2005; Harish y Sathishkumar, 2011).

#### FACTORES QUE AFECTAN AL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN TOMATES

Se han realizado numerosos estudios sobre los factores que afectan a los niveles de compuestos fenólicos en distintos vegetales de consumo humano. Sin embargo, no existen demasiadas investigaciones concretas relacionadas con los factores que afectan al contenido de estos compuestos en los tomates. Slimestad y Verheul, (2009) recopilan en su trabajo de revisión aquellos factores más determinantes en la concentración de compuestos fenólicos en tomates, destacando el tipo de cultivo, fertilización e irrigación, la luz, la variación estacional, el estado de

maduración, y las condiciones de cultivo y almacenamiento. Estos factores se pueden agrupar en: factores pre-recolección, post-recolección y de tratamiento térmico y/o procesado.

### Factores pre-recolección

Stewart *et al.* (2000) indicaron que la elección del cultivo es el factor que determina en mayor medida la contribución de compuestos fenólicos en tomates cultivados bajo similares condiciones ambientales. Martínez-Valverde *et al.* (2002) observaron un rango de compuestos fenólicos totales entre 259 y 500 mg/Kg de peso fresco en nueve variedades de tomate, encontrando una gran variabilidad en la cantidad total así como individual entre los distintos compuestos fenólicos. Slimestad y Verheul (2009) muestran la alta variabilidad en los compuestos fenólicos individuales de las distintas variedades de tomate, incluyendo flavonoles, naringenina y chalconaringenina, y los ácidos clorogénico, cafeico, *p*-coumárico y ferúlico. De forma similar, García-Valverde *et al.* (2011) también encontraron diferencias en los compuestos fenólicos encontrados tras el análisis de 4 variedades de tomate destinadas a su procesado en la industria.

En cuanto a las prácticas agrícolas como la fertilización, un suministro limitado de nitrógeno está asociado con altos niveles de compuestos fenólicos en la planta (Parr y Bolwell, 2000; Lea *et al.*, 2007), no así en el fruto del tomate y en lo que respecta al contenido en flavonoides (Slimestad y Verheul, 2009). Una deficiencia en fósforo también se asocia con un incremento de flavonoides del tomate, atenuado durante el proceso de maduración del mismo (Slimestad y Verheul, 2009). Stewart *et al.* (2001) concluyeron que el uso o limitación de nutrientes como el nitrógeno o fósforo se puede emplear para manipular el contenido de flavonoles de los tejidos vegetativos pero no puede utilizarse para elevar el contenido de flavonoles del fruto.

La disponibilidad de agua y la presencia de determinados nutrientes como el boro o el calcio también puede afectar al contenido en compuestos fenólicos de las frutas (Tomás-Barberán y Espín, 2001). De forma adicional, Sgherri *et al.* (2008) demostraron el efecto positivo del uso de agua de mar diluida en la concentración en el fruto de determinados compuestos como el ácido clorogénico, disminuyendo a su vez los niveles de cafeico o ferúlico como consecuencia del estrés oxidativo inducido por la salinidad.

La presencia o ausencia de luz puede provocar efectos totalmente contrarios en la síntesis y acumulación de compuestos fenólicos. La acumulación de flavonoides se ve estimulada por efecto de la luz, a la vez que pueden sufrir una degradación en condiciones de oscuridad (Olsen *et al.*, 2009). En un estudio con tomates cherry cultivados en invernadero con mucha luz se obtuvo aproximadamente el doble de contenido de fenoles solubles (rutina y ácido clorogénico) que los tomates obtenidos de plantas cultivadas en condiciones de poca luz (Wilkins *et al.*, 1996). También ha sido demostrado el efecto de la luz ultravioleta en la composición de compuestos fenólicos en tomates cultivados en invernadero bajo distintos materiales que permitían o no el paso de la radiación solar ultravioleta (Luthria *et al.*, 2006), pudiendo modularse de este modo la concentración de estos compuestos en el fruto. Además, la calidad de la luz tiene un impacto en las modificaciones estructurales de los flavonoides, tal y como concluyeron Wilson *et al.* (1998) sobre el efecto de la luz UV-B, la cual puede estimular la reacción de hidroxilación que convierte la quercetina en kaempferol.

Existen pocos estudios que hayan investigado las fluctuaciones estacionales de los distintos nutrientes, y en particular de los fitonutrientes de los tomates. Algunos trabajos como los de Crozier *et al.* (1997) y Stewart *et al.* (2000) observaron variaciones en el contenido de compuestos fenólicos aunque sin una clara tendencia estacional. De forma similar, Raffo *et al.* (2006), observaron una variabilidad importante en el contenido de naringenina (1.9 a 9.0 mg/100 g) y rutina (1.8 a 6.6 mg/100 g) en tomates cherry cultivados en invernadero durante distintas épocas del año aunque sin una tendencia estacional clara.

La maduración del fruto de tomate, y las condiciones en las que se produzca esta, también implica cambios a nivel de los compuestos fenólicos. Giovanelli *et al.* (1999) evidenciaron una mayor concentración de estos compuestos en los tomates madurados post-cosecha cuando analizaron dos genotipos distintos de la variedad "Moneymaker". Durante las distintas fases de maduración del tomate puede observarse, en general, que los compuestos fenólicos individuales aumentan gradualmente entre el verde y ligeramente rojo y disminuye cuando madura totalmente, según los estudios de Salunkhe *et al.* (1974), Senter *et al.* (1988) y García-Valverde *et al.* (2011).

### Factores post-recolección

En la actualidad, varias metodologías post-cosecha usadas principalmente para la conservación de los alimentos, como la aplicación de campos eléctricos pulsados o la luz ultravioleta, han sido descritas como tratamientos capaces de alterar el contenido de los compuestos fenólicos en tomate (Liu *et al.*, 2011; Vallverdú-Queralt *et al.*, 2012a).

Entre ellos, parece cobrar una especial relevancia el tratamiento de luz ultravioleta (UV), y la aplicación de dosis hórnicas, definidas, en este caso, como aquellas dosis bajas de luz UV que inducen una respuesta positiva en los tejidos contra el estrés provocado por la misma luz. La luz UV es una radiación no ionizante con una longitud de onda de 100 a 400 nm clasificada en 3 tipos: UV-A (315 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-C (200-280 nm). En función de la intensidad y longitud de onda, la irradiación UV puede inducir estrés biológico que desembocaría en la activación de los sistemas de defensa de la planta (Cisneros-Zevallos, 2003), entre ellos la síntesis de la enzima fenilalanina amonio-liasa. Esta enzima es un componente clave en la producción de fenilpropanoides, lo que podría implicar un incremento en fenoles, fitoalexinas y ligninas (Ryalls, 1996). De forma concreta, luz UV-C parece tener un efecto directo sobre la composición de estos fitoquímicos en el tomate. Kim *et al.* (2008) observaron un incremento del 26% en el contenido de los compuestos fenólicos totales en tomates frescos cortados al usar una radiación UV-C como agente desinfectante. De la misma forma, Jagadeesh *et al.* (2009) y Liu *et al.* (2012) observaron un aumento significativo del contenido de distintos compuestos fenólicos al aplicar dosis hórnicas de luz UV-C. Otros tipos de luz UV, como la luz UV-B también ha sido estudiada, evidenciándose un efecto regulador en la síntesis y acumulación de los compuestos fenólicos en frutos como el tomate (Liu *et al.*, 2011) o las uvas (Cantos *et al.*, 2000).

### Procesado/cocinado

El procesado industrial de los tomates incluye distintos tratamientos térmicos, tratamientos empleados con el objetivo de inactivar microorganismos o enzimas, y que paralelamente disminuyen el grado de humedad y concentran el producto, como son la pasteurización, la esterilización, la concentración y la deshidratación. En la literatura científica existen resultados contradictorios con respecto al efecto del procesado en los

compuestos fenólicos de los tomates. Existen estudios que afirman que el procesado industrial de los tomates puede suponer, tanto una disminución como un incremento del contenido en compuestos beneficiosos para la salud humana con respecto a los tomates en fresco (Abushita *et al.*, 2000; Dewanto *et al.*, 2002). Jacob *et al.*, (2010) estudiaron el efecto de dos tipos de procesado industrial que incluían un tratamiento térmico de 110°C durante 15 y 30 minutos comparados con el tomate en fresco. Sus resultados mostraron un incremento del 63% y 89% respectivamente, en el contenido de compuestos fenólicos totales, observando similar comportamiento en los flavonoides totales. El tratamiento térmico provocó este incremento, principalmente debido a la rotura de la estructura celular, lo que permitió una mejor extracción de los compuestos de la matriz del alimento, tal y como describieron Gahler *et al.* (2003). Sin embargo, otros autores han descrito que tras el tratamiento térmico con una temperatura de 88°C durante 2, 15 y 30 minutos, no se observa una variación significativa en el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales del puré de tomate (Dewanto *et al.*, 2002). Estudios sobre tomate en dados revelan una disminución gradual y significativa de los compuestos fenólicos cuando fueron sometidos a tratamientos térmicos, y se asocian las mayores temperaturas con las mayores pérdidas en estos compuestos (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2011). Vallverdú-Queralt *et al.* (2012b) asocian este fenómeno a los tratamientos o procesados más intensos y extensos, concluyendo también que la esterilización y el embotellado suponen ligeras pérdidas puntuales en el contenido de compuestos fenólicos durante el procesado. En cuanto al cocinado a nivel doméstico, Bugianesi *et al.* (2004) determinaron un incremento en el contenido de naringenina y ácido clorogénico en el plasma humano tras ingerir tomates cherry previamente cocinados, con respecto a su ingesta en fresco, concluyendo así que el tratamiento térmico favorecía un aumento de su biodisponibilidad. En este sentido, Natella *et al.* (2010) analizaron el contenido de compuestos fenólicos en tomate y concluyeron que no existían diferencias entre distintos tipos de procesado doméstico (hervido, cocido a presión y por microondas).

### **BIODISPONIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS**

Los efectos beneficiosos derivados del consumo de compuestos fenólicos dependen de la cantidad consumida y de su biodisponibilidad. La gran variedad estructural de los compuestos fenólicos, así como la influencia de diversos factores sobre su concentración en los alimentos (**Tabla 9**), hace difícil estimar con exactitud la ingesta de compuestos fenólicos en la dieta (Duthie *et al.*, 2003), aunque

probablemente se alcanza 1 g/día en personas que ingieran varias raciones de fruta y verdura al día (Manach *et al.*, 2004). Los ácidos fenólicos representan aproximadamente un tercio de los compuestos fenólicos procedentes de la dieta y los flavonoides los otros dos tercios (Scalbert y Williamson, 2000).

**Tabla 9.** Principales factores, directos o indirectos, que afectan a la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos de la dieta en humanos (D'Archivio *et al.*, 2010).

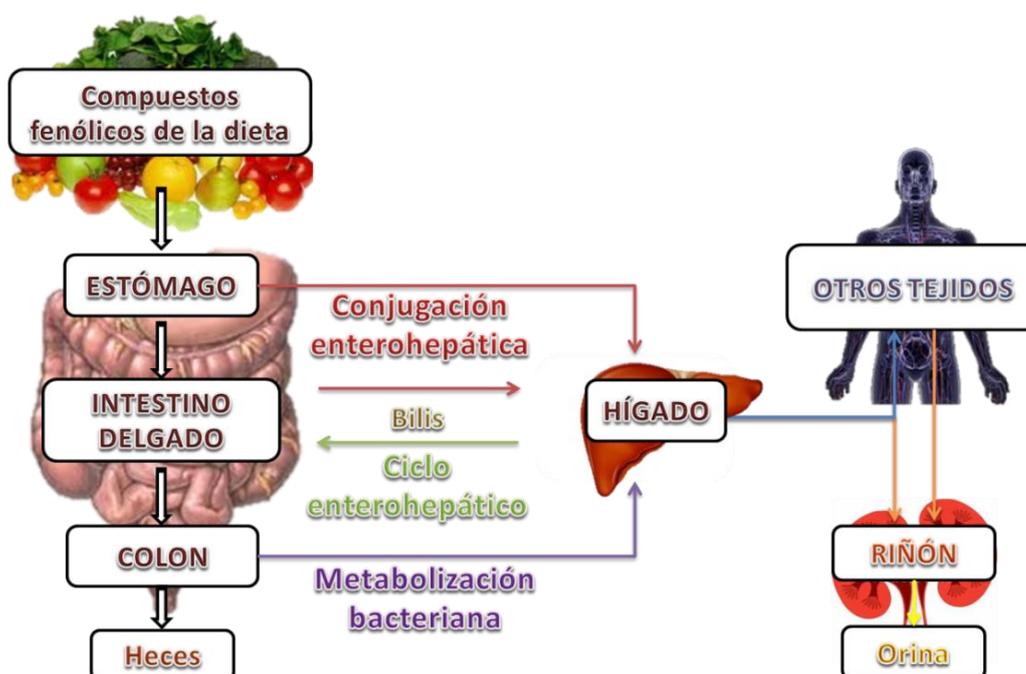
<b>Factores externos</b>	Factores ambientales (exposición solar, grado de maduración); Disponibilidad del alimento
<b>Factores relacionados con el procesado de alimentos</b>	Tratamientos térmicos; homogenización; liofilización; cocinado y métodos de preparación culinaria
<b>Factores relacionados con el alimento</b>	Matriz alimentaria; presencia de compuestos que faciliten o retrasen la absorción (grasa, fibra)
<b>Interacción con otros componentes</b>	Uniones a proteínas (albúmina) o con compuestos fenólicos con similares mecanismos de absorción
<b>Factores relacionados con los compuestos fenólicos</b>	Estructura química; concentración en el alimento; cantidad introducida
<b>Factores propios del individuo</b>	Factores intestinales (actividad enzimática; tiempo de tránsito intestinal o microflora colónica). Factores sistémicos (sexo y edad; desórdenes y/o patologías; genética; condición fisiológica)

### Absorción y metabolismo

La estructura química de los compuestos fenólicos y la forma en que se ingieran (agliconas, ésteres, polímeros, glicósidos, etc.) van a determinar el tipo y el alcance de la absorción intestinal así como la naturaleza de los metabolitos que circulan por el plasma (Scalbert *et al.*, 2002). Es por ello que muchos de los metabolitos que se encuentran en la sangre y/o en los órganos diana y que resultan de la actividad digestiva o hepática pueden ser diferentes de las sustancias nativas en términos de actividad biológica (Cerdá *et al.*, 2005).

El metabolismo de los compuestos fenólicos tiene lugar según una ruta común (**Figura 6**). Algunas agliconas de los compuestos fenólicos pueden ser absorbidas en el estómago (Piskula *et al.*, 1999; Crespy *et al.*, 2002) o en el intestino delgado. Sin embargo, la mayoría de los compuestos fenólicos se encuentran en la naturaleza en forma de polímeros, ésteres y glicósidos que no se pueden absorber en su forma original y previamente tienen que ser hidrolizados por las enzimas intestinales (lactasa

florizina hidrolasa y  $\beta$ -glucosidasa localizadas en el borde en cepillo y en el citosol respectivamente) o por la microflora del colon (Hollman *et al.*, 2004; Manach *et al.*, 2004). Los compuestos fenólicos provenientes de la dieta que no son absorbidos en el intestino delgado (junto con aquellos expulsados vía bilis), alcanzan el colon donde son sometidos a modificaciones estructurales (Williamson y Clifford, 2010). Los compuestos resultantes de este proceso de metabolización son compuestos de un tamaño molecular inferior al de los compuestos de los que provienen. Este hecho hace que estos nuevos compuestos formados puedan ser absorbidos fácilmente en el colon o bien ser eliminados del cuerpo a través de las heces.



**Figura 6.** Posibles rutas y compartimentos implicados en el metabolismo de los compuestos fenólicos provenientes de la dieta (Piskula *et al.*, 1999; Scalbert y Williamson 2000; Crespy *et al.*, 2002; Hollman, 2004).

Antes de pasar al torrente sanguíneo, los compuestos fenólicos sufren otras modificaciones estructurales debido al proceso de conjugación (Felgines *et al.*, 2005) que tiene lugar en el intestino delgado y, principalmente, en el hígado. La conjugación, que incluye los procesos de metilación (Catecol-O-metiltransferasa), sulfatación (sulfotransferasas), y glucuronidación (Uridina-5'-difosfato glucuronosiltransferasas), o una combinación de ellos, representa un proceso de detoxificación metabólica común a muchos compuestos xenobióticos que limita sus efectos tóxicos potenciales y facilita su eliminación biliar y urinaria, debido a un aumento de su hidrofiliidad y peso

molecular. La glucuronidación es particularmente importante para aumentar el peso molecular, necesario para la excreción en la bilis (Day *et al.*, 2000b). Los compuestos fenólicos que siguen la ruta biliar son secretados en el duodeno, donde son sometidos a la acción de enzimas bacterianas, especialmente la  $\beta$ -glucuronidasa, tras la cual son reabsorbidos. Este reciclaje enterohepático prolonga la presencia de los compuestos fenólicos en el organismo.

Por lo tanto es evidente que los compuestos fenólicos sufren numerosas modificaciones (Porrini y Riso, 2008), no solo en el intestino delgado y en el colon, sino también en el hígado, donde tienen lugar la mayoría de las conjugaciones. Así pues, cualquier compuesto fenólico individual genera varios metabolitos, tantos como 20 en el caso de los glicósidos de la quercetina, aunque siempre son dos o tres especies las que usualmente dominan (Mullen *et al.*, 2006).

Todas estas modificaciones afectan a la actividad biológica de los compuestos fenólicos (Zhang *et al.*, 1999; Day *et al.*, 2000a; Wen & Walle 2006a; Wen & Walle 2006b; Landis-Piwowar *et al.*, 2008; Del Rio *et al.*, 2010). En consecuencia, los compuestos que alcanzan las células y tejidos son química, biológica y, en algunos casos, funcionalmente diferentes de la forma originalmente ingerida.

Los metabolitos de los compuestos fenólicos no circulan libres en la sangre. Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado su afinidad por las proteínas plasmáticas, aunque esta afinidad varía de acuerdo a las características estructurales de los compuestos fenólicos (Dufour y Dangles, 2005; Bolli *et al.*, 2010). La albúmina plasmática está considerada la principal responsable de la unión y por tanto del transporte de compuestos fenólicos en el torrente sanguíneo. Esta unión parece aumentar su vida media, retrasando así su eliminación del cuerpo (Manach *et al.*, 2004). De esta forma el grado de unión a la albúmina determinará la distribución de los metabolitos de los compuestos fenólicos, siendo los cambios conformacionales en la proteína los que faciliten la disociación de estos y su posterior incorporación a las células y tejidos (Manach *et al.*, 2004). Esta unión parece poder modularse por componentes en plasma. Más concretamente, se ha demostrado la posible participación de los ácidos grasos en la modulación, por inhibición alostérica, en la unión de los flavonoides a la albúmina en humanos. Este hecho podría interferir en sus efectos biológicos (Bolli *et al.*, 2010).

La concentración de compuestos fenólicos en sangre tras el consumo puede variar considerablemente dependiendo de la naturaleza de los compuestos y del

alimento. Así pues, la concentración en plasma alcanza su máximo entre 1.5 y 5.5 horas después de la ingestión, dependiendo del compuesto fenólico y del lugar donde se produzca la absorción intestinal (Manach *et al.*, 2005).

La mayor parte de los datos procedentes de estudios en seres humanos que se presentan en la literatura sobre biodisponibilidad se refieren sólo a la liberación de los compuestos fenólicos de la matriz del alimento y su consiguiente absorción (es decir, concentración en la sangre o en la orina). La determinación de la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos en los tejidos diana es mucho más importante que el conocimiento de las concentraciones plasmáticas. Parece apropiado considerar la presencia de un compuesto fenólico en el plasma como un marcador de la liberación de la matriz alimentaria y la absorción, pero sólo como un indicador predictivo de la absorción de los tejidos (Porrini & Riso, 2008). Los compuestos fenólicos se encuentran principalmente en aquellos tejidos donde se han metabolizado (tejido hepático, estomacal, intestinal, colónico y nefrítico (Clifford 2004; Graf *et al.*, 2006; Bieger *et al.*, 2008), pero además también pueden acumularse en tejidos dianas específicos, como el tejido pulmonar, el pancreático, el cerebral, el cardíaco y el tejido esplénico (Hong *et al.*, 2002; Parkar *et al.*, 2008).

### COMPUESTOS FENÓLICOS Y SALUD

Numerosos estudios han avalado las propiedades biológicas de los compuestos fenólicos (Middleton *et al.*, 2000; Schroeter *et al.*, 2006; Potenza *et al.*, 2007; Perez-Vizcaino *et al.*, 2009). Entre estas destacan sus efectos antialérgicos, antiinflamatorios, antimicrobianos y anticancerígenos (Cody *et al.*, 1986; Harbourne, 1993), actuando en este último caso mediante dos vías, la inducción de enzimas de detoxificación y la inhibición de la proliferación de las células cancerosas así como la promoción de la diferenciación celular (Kalt, 2001). Los compuestos fenólicos también parecen presentar efectos beneficiosos en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad cardiovascular. Estos efectos son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes que pueden justificar sus acciones vasodilatadoras y vasoprotectoras, así como sus acciones antitrombóticas, antilipémicas, antiateroscleróticas, antiinflamatorias y antiapoptóticas (Quiñones *et al.*, 2012).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos radica en su capacidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y a

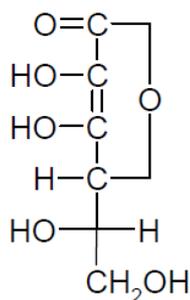
la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático (Duthie *et al.*, 2003). Los compuestos fenólicos poseen además una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre) y por tanto para inhibir la formación de radicales libres a través de reacciones de Fenton (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Hasta la fecha los estudios sobre los beneficios para la salud de los compuestos fenólicos se han centrado en su actividad antioxidante, y en este sentido también se les ha atribuido efecto radioprotector, en concreto a los flavonoides, probablemente relacionado con la protección de los sistemas hematopoyético e inmune gracias a su potencial en la inactivación de radicales libres, control de la oxidación y protección del DNA (Lei y Chen, 2007).

## OTROS COMPONENTES

### VITAMINAS ANTIOXIDANTES

Entre las vitaminas presentes en el fruto del tomate hay que destacar su contenido en vitaminas hidrosolubles, sobre todo vitamina C (en forma de ácido L-ascórbico o ácido dehidroascórbico), y liposolubles, destacando la presencia de vitamina E.

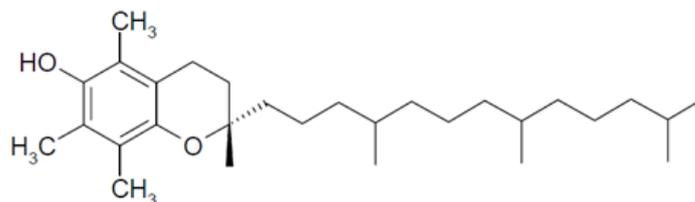


**Figura 7.** Estructura química de la vitamina C (ácido ascórbico).

En el tomate la concentración de ácido ascórbico (**Figura 7**) puede oscilar entre los 20 y 25 mg de media por cada 100 gramos de peso fresco y supone una de las principales fuentes de ingesta de esta vitamina (Favell y Fletcher, 2000; García-Closas *et al.*, 2004). El ácido L-ascórbico puede actuar como cofactor enzimático de mono y dioxigenasas, como antioxidante, interactuando de forma enzimática y no enzimática con radicales libres de oxígeno y sus derivados, y como donante / aceptor de electrones en el transporte en la membrana plasmática. El ácido ascórbico es capaz de neutralizar los radicales superóxido e hidroxilo, así como regenerar  $\alpha$ -tocoferol (Davey *et al.*, 2000). Además de actuar como una vitamina en el correcto funcionamiento fisiológico, se cree que puede tener un efecto beneficioso en relación al cáncer. Aunque Jonson *et al.* (2001) consideraron pruebas epidemiológicas consistentes a la hora de mostrar un efecto protector de la vitamina C contra determinados tipos de cáncer, como el de estómago, faringe y esófago, en la actualidad parece que su papel no está tan claro.

En los tomates está presente sólo una pequeña cantidad de vitamina E. Aunque existen al menos 8 formas distintas de vitamina E, es el  $\alpha$ -tocoferol (**Figura 8**)

la forma predominante en estos frutos (Seybold *et al.*, 2004). Además de su función como una vitamina, hay evidencias del papel del  $\alpha$ -tocoferol como un potente antioxidante con propiedades antiinflamatorias (Singh *et al.*, 2005). Diversos estudios muestran que esta vitamina puede presentar actividad antiateroesclerótica y anticancerígena relacionada con su papel en la prevención de la oxidación de las LDL, modulación de la señalización celular, regulación transcripcional e inducción de la apoptosis (Brigelius-Flohé *et al.*, 2002). La vitamina E tiene efectos sinérgicos en combinación con otros antioxidantes, como la vitamina C, aumentando, en este caso, el poder antioxidante frente a la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad (Baron *et al.*, 2004).



**Figura 8.** Estructura química de la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol).

#### LAS VITAMINAS Y LAS VARIACIONES EN SU CONTENIDO

Las vitaminas C y E son junto con el licopeno y los compuestos fenólicos los principales responsables de la actividad antioxidante del tomate fresco y procesado (Stewart *et al.*, 2000; Beutner *et al.*, 2001; Leonardi, *et al.*, 2000). En la literatura, el contenido en vitamina E de los tomates oscila entre 0.1–1.8 mg/100 g de peso fresco, mientras que el de vitamina C suele presentar valores mayores, entre 2–21 mg/100 g de peso fresco (Frusciante *et al.*, 2007), por lo que representa una importancia relativamente alta en la actividad antioxidante de los tomates.

Entre los factores que más afectan al contenido vitamínico de los tomates, destacan los factores relacionados con el crecimiento del fruto. Factores como la luz o la escasez de agua, tienden a ejercer un efecto positivo sobre el contenido en esta vitamina (Dumas *et al.*, 2003). El uso de nitrógeno a tasas elevadas está relacionado con un menor contenido en vitamina C, probablemente debido a un mayor desarrollo del follaje de la planta y la menor incidencia de luz (Dumas *et al.*, 2003). Contrariamente, parece influir positivamente el uso de calcio (Subbiah y Perumal,

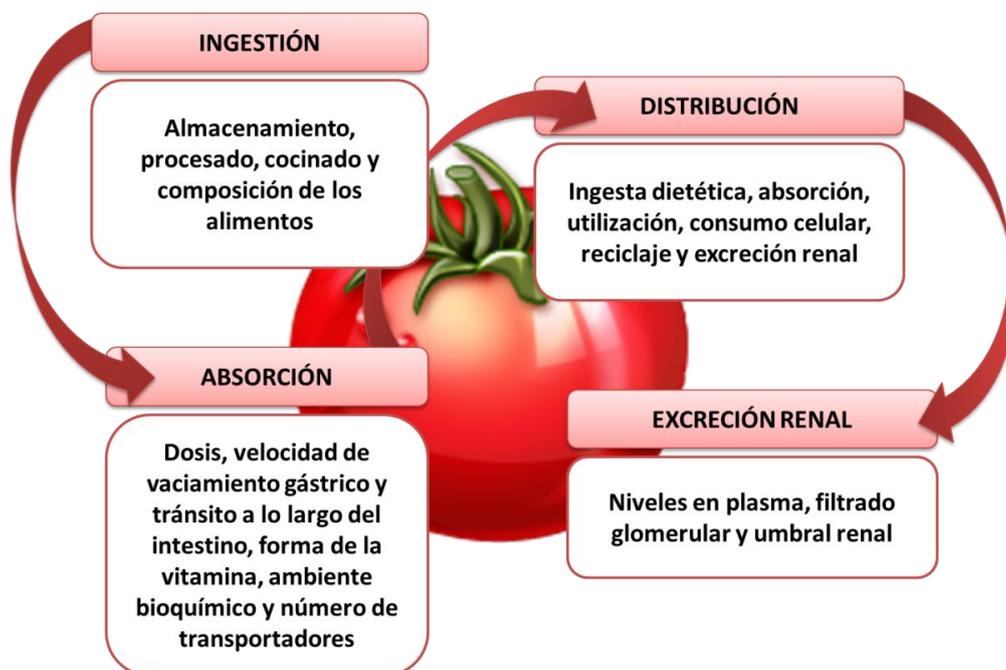
1990) o una combinación de fertilizantes (Dumas *et al.*, 2003). El almacenamiento a temperatura ambiente puede ejercer un efecto negativo en el contenido de vitamina C tal y como observaron recientemente Rai *et al.* (2012). Finalmente, el estado de maduración del fruto también parece influir de una manera directa sobre el contenido de esta vitamina (Jiménez *et al.*, 2002; Cano *et al.*, 2003). En este sentido, Periago *et al.* (2009), encontraron diferencias en el contenido de vitamina C en tres estadios de maduración (verde inmaduro, rosa y rojo maduro) de tres variedades de tomate analizadas, encontrando un contenido creciente de vitamina C conforme la maduración avanzaba.

Las pérdidas de vitamina C en el tomate fresco se incrementan por un almacenamiento prolongado, altas temperaturas, baja humedad relativa, daño físico y daño por frío. Es una vitamina que se oxida fácilmente, especialmente en soluciones acuosas, en gran medida favorecida por la presencia de oxígeno, iones de metales pesados, especialmente  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , por el pH alcalino y alta temperatura. (Lee y Kader, 2000). En general, los productos procesados de tomate presentan una disminución del contenido en vitamina C con respecto al tomate en fresco, normalmente influenciado por el tratamiento térmico (Abushita *et al.*, 2000; Lee y Kader, 2000; Dewanto *et al.* 2002; Gahler *et al.*, 2003; Pérez-Conesa *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2010), aunque en general, la vitamina C se destruye con facilidad cuando el producto se somete a tratamientos adversos y condiciones de almacenamiento.

La vitamina E está solo presente en pequeñas cantidades y existe poca información en relación a los factores que afectan a su contenido en tomates, aunque tanto el estado de madurez como la variedad son factores que afectan a su contenido (Abushita *et al.*, 1997; Raffo *et al.*, 2002). En el tomate podemos encontrar tanto  $\alpha$ -tocoferol como  $\gamma$ -tocoferol. Ambos se distribuyen de forma desigual, siendo  $\gamma$ -tocoferol el más abundante en semillas, aunque el de menor proporción en el contenido total (Seybold *et al.*, 2004). El  $\alpha$ -tocoferol es por tanto la forma predominante de la vitamina E en el tomate. Este puede incrementar su contenido durante los tratamientos post-cosecha relacionados con su procesado. De esta forma la aplicación de tratamientos térmicos cortos favorecería su liberación de los sitios de unión y aumentaría su concentración. Por el contrario los tratamientos térmicos más largos e intensos, (>1 h, >200°C) provocarían su disminución como consecuencia de un proceso de desnaturalización de la vitamina (Seybold *et al.*, 2004).

## BIODISPONIBILIDAD DE LAS VITAMINAS C Y E

La biodisponibilidad de la vitamina C depende de muchos factores tal y como muestra la **Figura 9**, desde aquellos que afectan a su contenido en los alimentos, hasta los que afectan a su absorción, transporte y excreción. De forma general, esta vitamina es absorbida mediante transporte activo y difusión pasiva en el intestino delgado, alcanzando niveles de entre el 80 y 90% cuando la ingestión de esta vitamina es baja. Por otro lado, cuando la ingestión es alta (1 g/día), se reduce significativamente su absorción (Biruet *et al.*, 2009), por lo que el mecanismo de absorción es saturable. En el plasma, la vitamina C se encuentra en su forma reducida y es transportada al interior celular utilizando, tanto transportadores de glucosa como transportadores específicos de esta vitamina. La concentración de vitamina C en plasma comienza a aumentar 15-20 minutos después de la ingestión y alcanza su máximo entre 1-2 horas después de la misma (Benzie y Strain, 1997; Graumlich *et al.*, 1997). El ácido ascórbico se encuentra en altas concentraciones en varios tejidos, como el tejido suprarrenal, hígado, bazo y riñones. Esta vitamina se elimina en un alto porcentaje por orina, bajo la forma de ácido oxálico (catabolito) o si se ingiere en dosis muy elevadas, como ácido ascórbico.



**Figura 9.** Factores que afectan a la biodisponibilidad de la vitamina C.

Por otro lado, la vitamina E es un compuesto de naturaleza liposoluble y su absorción en el tracto gastrointestinal puede oscilar ampliamente entre el 20 y el 80%, dependiendo en gran medida de los lípidos provenientes de la dieta. La presencia de grasa determina su absorción porque favorece la formación de micelas, por lo que también es importante en su correcta absorción, una función biliar y pancreática normal. Tras ser absorbida es captada por los quilomicrones y las VLDL, que se encuentran en la linfa, pasando posteriormente al torrente sanguíneo vía ducto torácico (Hollander *et al.*, 1975). Una pequeña parte de la vitamina E es captada por los tejidos extrahepáticos, principalmente tejido adiposo y muscular, durante el catabolismo de los quilomicrones por acción de la lipoproteína lipasa (Abe *et al.*, 2007) y la restante, la mayor parte, es transportada al hígado (Traber *et al.*, 1985). Para su posterior transporte a través del plasma, la vitamina E se vuelve a unir a la VLDL y la HDL para ser captada por las células, acumulándose en la porción lipídica de las membranas celulares. A diferencia de otras vitaminas liposolubles, la vitamina E no se acumula en el hígado en niveles tóxicos, eliminándose su exceso a través de la bilis o en orina (Yadyra *et al.*, 2010).

## CONSUMO DE TOMATE. INGESTA CON EFECTOS BENEFICIOSOS.

El tomate es la hortaliza más cultivada en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. La producción mundial de tomate en 2010, de consumo fresco (dos terceras partes) y de uso agroindustrial, se estimó en unos 145.8 millones de toneladas (FAOSTAT, 2010) siendo el segundo vegetal más consumido después de la patata. Esto hace que el tomate y sus productos derivados sean una buena fuente de compuestos bioactivos beneficiosos para la salud, y no solo por la concentración de los mismos, sino por el alto consumo de este tipo de alimentos a nivel mundial.

Como se ha comentado anteriormente, el tomate es una fuente importante de compuestos como carotenoides, compuestos fenólicos y vitaminas. Solo en el caso de las vitaminas y compuestos con actividad provitamínica existe una ingesta diaria recomendada, ya que estas son necesarias para el correcto funcionamiento del organismo. En la actualidad, el licopeno, al igual que los compuestos fenólicos, no es considerado como nutriente esencial, por lo que esa es una de las principales razones por la que no se establece una ingesta diaria recomendada. Hasta la fecha no hay un consenso claro sobre la ingesta de licopeno necesario para reducir el riesgo de enfermedad, debido, en gran parte, a la variabilidad en la concentración de licopeno encontrada en las múltiples fuentes. Las sugerencias varían desde aproximadamente 5 hasta 35 mg de licopeno por día según la bibliografía científica, aunque el rango de entre 5-7 mg/día (**Tabla 10**) es la recomendación establecida para individuos sanos según Rao y Shen, (2002). Esta dosis podría alcanzarse mediante el consumo de al menos una o dos porciones de tomates o productos derivados del tomate todos los días.

En cuanto al  $\beta$ -caroteno, la *Food and Nutrition Board* (FNB) de la Academia de las Ciencias (NAS) de los Estados Unidos de América recomendaron en el año 2000 (FNB, 2000), una ingesta dietética de 3-6 mg/día de  $\beta$ -caroteno, dosis asociada a un menor riesgo de contraer enfermedades crónicas, hecho debido principalmente a su actividad provitamina A. Actualmente se establece que la dosis recomendada está entre 2-4 mg/día (**Tabla 10**), aunque según sugiere Grune *et al.* (2010), debería ser incrementada hasta 7 mg/día para asegurar que al menos el 95% de la población consume la ingesta recomendada de vitamina A.

**Tabla 10.** Dosis con efecto saludable de los principales compuestos bioactivos presentes en el tomate.

Componente	Recomendaciones diarias
Licopeno	*5-7 mg <sup>1</sup>
β-caroteno	**2-4 mg <sup>2</sup>
Vitamina C	40-90 mg <sup>3</sup>
Vitamina E	4-15 mg <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Rao y Shen (2002). <sup>2</sup>Biesalski *et al.* 1997 <sup>3</sup>FNB, 2000 <sup>4</sup>Birute *et al.* (2009)

\*Cálculo en base a posibles efectos beneficiosos\*\*  
cálculo en base a su actividad provitamina A.

## CALIDAD ORGANOLÉPTICA DEL TOMATE

La calidad sensorial del tomate depende de numerosos factores, incluyendo el color, la textura, aroma, composición de metabolitos primarios como azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos (Baldwin *et al.*, 1991a,b; Buttery, 1993) y secundarios, como los compuestos fenólicos o los carotenoides (Taylor y Grotewold, 2005; Dávila-Aviña *et al.*, 2011). Así, la calidad organoléptica de los tomates frescos está condicionada principalmente por el incremento en ácidos orgánicos e hidratos de carbono simples y compuestos (Malundo *et al.*, 1995). Los aminoácidos libres también pueden jugar un papel importante en la potenciación del sabor (Bucheli *et al.*, 1999; Tieman 2006), siendo el ácido glutámico el principal aminoácido presente en tomates (Kader *et al.*, 1978). Así pues, aunque la calidad organoléptica de los tomates se relaciona tanto con los aspectos gustativos (dulzor, acidez) como con los olfativos (aroma, olor) y los táctiles (firmeza, textura), es el sabor el que juega un papel central en la calidad del mismo, ya que determina su aceptación por parte del consumidor (Maneerat *et al.*, 2002).

Si bien la decisión inicial de compra se basa en la apariencia, las compras posteriores dependen principalmente de la evaluación del sabor que el comprador realice cuando los tomates son ingeridos (Sinesio *et al.*, 2010). En el tomate interactúan ácidos, azúcares, aminoácidos libres, minerales y una combinación de al menos 400 compuestos aromáticos volátiles (Baldwin *et al.*, 2008) para dar lugar al flavor característico. Sólo algunos de estos compuestos volátiles tienen un alto impacto en el aroma del tomate, debido a su concentración y su umbral de percepción por los seres humanos (Baldwin *et al.*, 2000; Yilmaz, 2001a). Una parte de estos compuestos se encuentran en forma libre, constituyendo la fracción volátil libre pero otra parte se encuentra en forma glicosilada y los componentes que la forman no pueden ser percibidos por los receptores olfativos, constituyendo la denominada fracción volátil glicosilada. Sin embargo, los precursores glicosilados constituyen la fuente potencial para incrementar el aroma final, cuando se consigue la hidrólisis de los enlaces glicosídicos y la consiguiente liberación de los agliconas.

Entre los constituyentes volátiles se pueden encontrar alcoholes orgánicos, ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos, hidrocarburos, aminas, amidas, etc. La mayoría de estos compuestos son derivados del metabolismo de ácidos grasos y de aminoácidos, o de la degradación de los carotenoides (Baysal y Demirdöven, 2007; Tieman *et al.*, 2007) (**Tabla 11**).

Los mayores niveles de compuestos volátiles en tomate se concentran en la pulpa y en la piel, en el fluido se han encontrado pequeñas cantidades de *cis*-3-hexenal, mientras que las semillas no aportan cantidades significativas (Buttery *et al.*, 1988).

La formación de compuestos volátiles tiene lugar durante la maduración del fruto, así como durante la rotura de tejidos, tal y como ocurre cuando los tomates son macerados, triturados u homogeneizados (Buttery, 1993). En este caso, al romper los tejidos se permite la unión entre enzimas y sustratos, previamente compartimentalizados en el fruto, y se aumenta el contacto con el oxígeno (Buttery, 1993), lo que favorece un aumento en la síntesis de los compuestos responsables del aroma.

**Tabla 11.** Algunos de los compuestos que contribuyen al aroma del tomate (Grasselly *et al.*, 2000; Saliba-Colombani *et al.*, 2001).

Origen metabólico	Componente	Notas de olor	Límite de percepción (ppb)
Ácidos grasos	Hexanal <sup>1</sup>	Verde, tomate verde, hierba	4.5
	<i>E</i> -Hexen-2-enal	Manzana, almendra	17
	( <i>Z</i> )-3-hexenol <sup>2</sup>	Verde	70
	( <i>Z</i> )-3-hexenal <sup>3</sup>	Manzana verde	0.25
	( <i>E,E</i> )-2,4-Hexadienal	Verde	0.27
Degradación de pigmentos	Hexanol	Fresco, frutal, verde	500
	6-metil-5-hepten-2-one <sup>3</sup>	Judías verdes, perejil	50
	6-metil-5-hepten-2-ol	Aceitoso	200
	$\beta$ -ionona <sup>3</sup>	Floral, violeta	0.007
Aminoácidos	Geranilacetona <sup>4</sup>	Magnolia	60
	2-isobutiltiazol <sup>5</sup>	Tomate verde	3.5
Compuestos fenólicos	Eugenol <sup>2</sup>	Especias, banana, clavo	6
	Salicilato de metilo	Menta	40

<sup>1</sup> El de mayor contribución al olor del tomate

<sup>2</sup> Diferencias importantes por el grado de madurez. Sin diferencias entre cultivos

<sup>3</sup> De alto valor aromático

<sup>4</sup> Diferencias entre cultivos. Sin diferencias por el grado de madurez

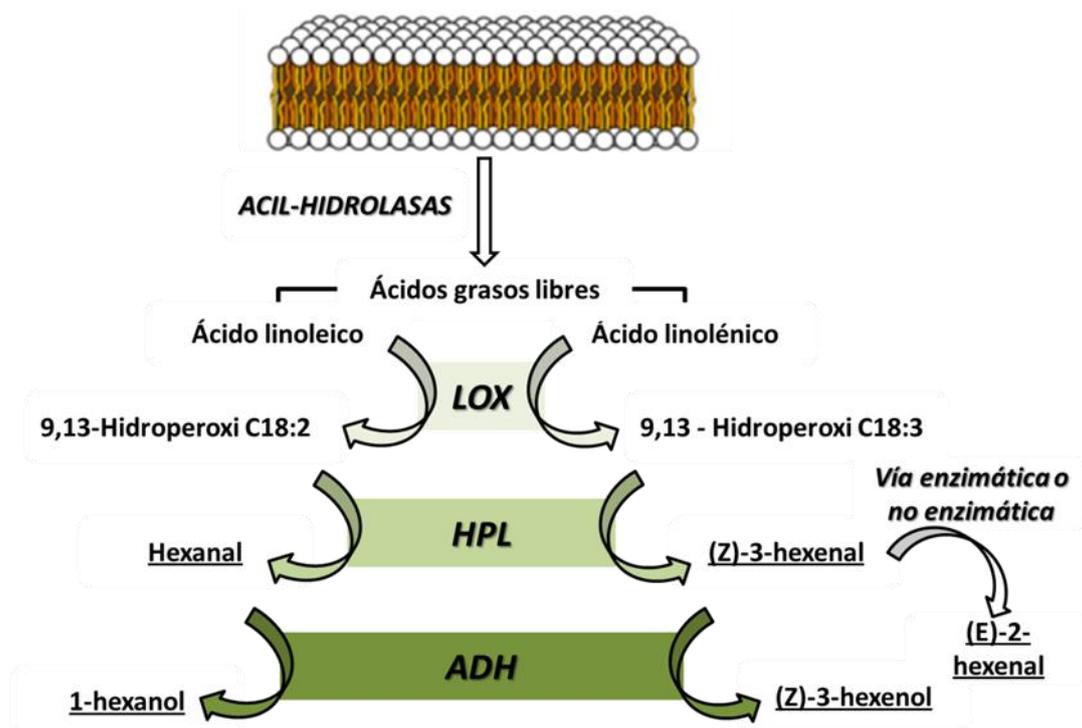
<sup>5</sup> Importante para diferenciar entre cultivos. Se utiliza como intensificador del aroma de los productos a base de tomate.

En el proceso de formación de los compuestos aromáticos intervienen varios tipos de enzimas y sustratos dependientes del estado de madurez del fruto, y que a través de diferentes vías metabólicas conducen a la biosíntesis de estos compuestos. Entre las enzimas responsables de la producción de compuestos volátiles responsables del aroma cabe destacar la lipoxigenasa (LOX), la hidroperóxido-liasa (HPL), la alcohol deshidrogenasa (ADH), presentes en la oxidación de lípidos, así como aminotransferasa, descarboxilasa y ADH, relacionadas con la biosíntesis de volátiles derivados de aminoácidos (Peach *et al.*, 2008).

## RUTAS DE SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN TOMATE.

### Síntesis de volátiles C6 (Degradación de ácidos grasos).

Los compuestos volátiles derivados de ácidos grasos son los principales contribuyentes al aroma del tomate (Yilmaz, 2001b). En la **Figura 10** se muestra el esquema generalmente aceptado en la producción de compuestos volátiles del tomate a partir de lípidos liberados de membrana cuando tienen lugar los procesos de rotura de tejidos. Inicialmente, los ácidos grasos (C16:0, C18:2, C18:3) liberados a partir de los acil-lípidos provenientes de las membranas celulares, actúan como sustrato de la enzima LOX, principalmente los ácidos linoleico y linolénico (Chen *et al.*, 2004), produciendo los correspondientes 9,13-hidroperóxidos. Estos hidroperóxidos sirven entonces como sustrato para la HPL. Por acción de esta enzima son producidos los aldehídos hexanal y (*Z*)-3-hexenol. La enzima isomerasa puede convertir el aldehído (*Z*)-3-hexenal a (*E*)-2-hexenal, y ambos pueden ser convertidos a los correspondientes alcoholes por la enzima ADH (Brauss *et al.*, 1998; Anthon y Barrett, 2003). Los alcoholes generados son sustratos naturales para la formación de ésteres como el hexil, (2,*E*)-hexenil y (3,*Z*)-hexenil éster, proceso llevado a cabo por la acción de la enzima alcohol aciltransferasa (Salas, 2004).



**Figura 10.** Formación de compuestos volátiles derivados de lípidos (LOX, lipoxigenasa; HPL, hidroperóxido-lias; ADH, alcohol deshidrogenasa).

### Síntesis de apocarotenoides volátiles

Los apocarotenoides volátiles están entre los compuestos más importantes que contribuyen al aroma del tomate, y es probable que se originen mediante oxidación de los carotenoides cíclicos y acíclicos (Dávila-Aviña *et al.*, 2011) originando compuestos como la  $\beta$ -ionona y  $\beta$ -damasceona (a partir del  $\beta$ -caroteno), la geranilacetona (a partir de fitoeno) o la 6-metil-5-hepten-2-ona (obtenida a partir del licopeno).

La  $\beta$ -ionona y  $\beta$ -damasceona se caracterizan por presentar aromas frutales y florales, con bajos umbrales de olor en humanos, por lo que son compuestos que en muy baja concentración son percibidos por los consumidores. La geranilacetona y la 6-metil-5-hepten-2-ona también se caracterizan por presentar notas florales y frutales aunque sus umbrales son algo más elevados que para los volátiles derivados del  $\beta$ -caroteno, por lo que se requiere una mayor concentración para poder detectarlo.

### Síntesis de volátiles derivados de aminoácidos

Otro grupo de compuestos responsables del aroma del tomate se forman a partir de aminoácidos (Tieman *et al.*, 2006). El metabolismo de los aminoácidos genera compuestos alifáticos, alcoholes ramificados, aldehídos, cetonas, ácidos y ésteres. Entre los más destacables en tomate están el 3-metilbutanol, 3-metilbutanal y 2-isobutiltiazol derivados de la leucina, y el 2-feniletanol generado a partir de la fenilalanina (Dávila-Aviña *et al.*, 2011). Entre estos compuestos cabe destacar el 2-isobutiltiazol, que está relacionado con las notas dulces y frutales del tomate (Tandon *et al.*, 2003). La biosíntesis de estos volátiles involucra principalmente tres enzimas: aminotransferasa, descarboxilasa y ADH (Tieman *et al.*, 2007).

### FACTORES QUE AFECTAN A LA COMPOSICIÓN DE VOLÁTILES EN EL TOMATE

En las últimas décadas, existe una creciente falta de aceptación de los tomates por parte del consumidor, ya que las variedades que encuentra en el mercado, carecen del flavor característico de este fruto. Este hecho junto con la disposición del consumidor a pagar un valor añadido por un producto que cumpla con sus expectativas (Bruhn *et al.*, 1991), han impulsado los trabajos dirigidos a conocer mejor los compuestos que determinan el flavor del tomate y a mejorar su aroma. Varios estudios señalan que la composición del aroma del tomate puede variar atendiendo a factores como el tipo de maduración, ya que los tomates cultivados al aire libre y madurados en forma natural contienen mayor concentración de compuestos volátiles que los tomates cultivados en invernadero y madurados en cámaras con control de atmosferas (Dorais *et al.*, 2001; Dudareva y Pichersky, 2008). También el tipo de variedad influye en su composición tal y como observaron distintos autores (Tandon *et al.*, 2003; Krumbein *et al.* 2004; Alonso *et al.*, 2009), el estado de maduración (Mohammadi-Aylar *et al.*, 2010), o los tratamientos aplicados (Maharaj, *et al.*, 1999), lo cual va a determinar que las condiciones de cultivo influyen en su concentración aromática.

El almacenamiento también es un factor clave en la producción de compuestos volátiles. Basándose en el tiempo y en la temperatura de almacenamiento, autores como Maul *et al.* (2000), Boukobza y Taylor, (2002), o León-Sánchez *et al.* (2009) observaron la importancia de estos parámetros en la formación de los compuestos volátiles responsables del aroma del tomate. Todos observaron una disminución en la

producción de volátiles a bajas temperaturas, provocado probablemente por la disminución de la actividad biológica.

Dado que el aroma del tomate es una parte muy importante de su sabor, existe numerosos estudios que han tratado de evaluar el efecto del procesado en los componentes volátiles y no volátiles responsables del aroma. Durante el procesado de los tomates hacia los distintos derivados, como zumos, purees, salsas, etc, se produce un cambio cualitativo y cuantitativo de estos componentes que puede ser favorable o no (Petro-Turza, 1986). Estos procesos llevan normalmente asociado un tratamiento térmico aplicado con el objetivo de inactivar enzimas y estabilizar los productos, extendiendo así su vida media. Sin embargo, el calentamiento puede tener un efecto muy marcado en el aroma de los procesados de frutas, favoreciendo cambios sensoriales en el producto (Hayes *et al.*, 1998; Servili *et al.*, 2000), desde la reducción de volátiles (Sieso y Crouzet, 1977) hasta la pérdida de color (Goodman *et al.*, 2002).

Como se ha visto, aldehídos, esterés e hidrocarburos son los componentes más característicos del tomate fresco y sufren una marcada disminución en su concentración debida al tratamiento térmico. Por otro lado, estos tratamientos provocan un aumento de compuestos azufrados y heterocíclicos. Los aromas generados por el tratamiento térmico surgen como consecuencia de las reacciones de Maillard, la caramelización y la degradación de lípidos, vitaminas, pigmentos y otros constituyentes del tomate (Sucan *et al.*, 2002). En consecuencia, la industria intenta optimizar los tratamientos térmicos con el objetivo de alargar en el tiempo la presencia de aquellos compuestos responsables del aroma característico del producto en fresco. Otras tecnologías como la aplicación de campos eléctricos pulsados pueden usarse como alternativa a los tratamientos térmicos, favoreciendo la mejora de los atributos organolépticos, y especialmente el aroma, en productos procesados de tomate (Aguiló-Aguayo *et al.*, 2010).

---

# *Material y métodos*

---

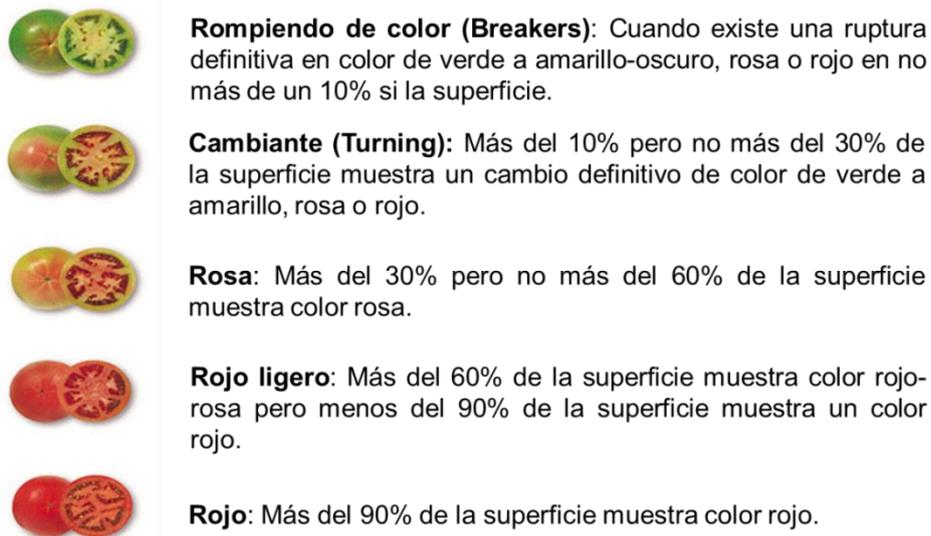
## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Para la consecución del objetivo general y de los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral, las actividades de investigación fueron planteadas en 4 experiencias distintas que se enumeran a continuación.

- EXPERIENCIA 1: Estudio del efecto de la exposición a la luz UV-C en los compuestos bioactivos y actividad antioxidante del tomate.
- EXPERIENCIA 2: Evolución de los compuestos bioactivos antioxidantes durante el almacenamiento en un zumo de tomate comercial.
- EXPERIENCIA 3: Evolución de los principales compuestos volátiles responsables del aroma y su relación con la actividad enzimática y la estabilidad de los carotenoides durante el tratamiento térmico y el almacenamiento de un zumo de tomate refrigerado.
- EXPERIENCIA 4: Estudio de los factores que afectan a la disponibilidad *in vitro* de los carotenoides del puré de tomate.

**EXPERIENCIA 1: ESTUDIO DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A LA LUZ UV-C EN LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL TOMATE**

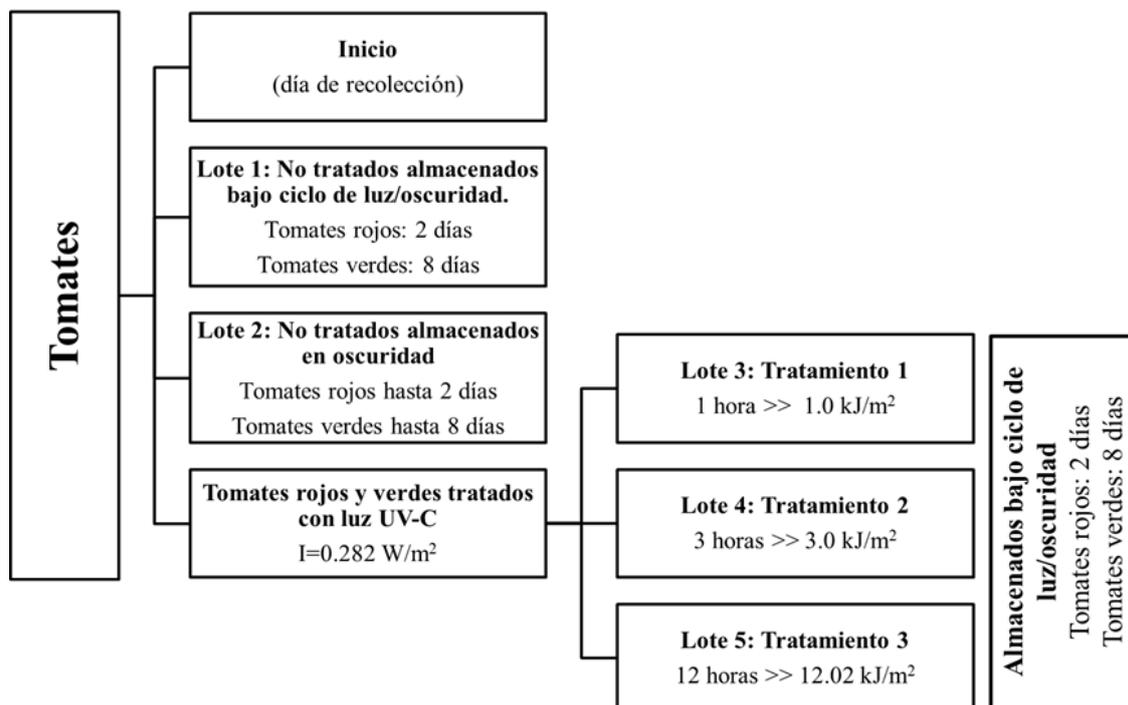
Para el desarrollo de esta experiencia se seleccionaron tomates con dos estadios distintos de maduración, el estado de tomate verde (Breaker) que ha iniciado el proceso de maduración y el tomate rojo ligero sin llegar al estado de totalmente rojo. Los tomates fueron recolectados directamente de la planta en los estados de madurez descritos y que se pueden observar en la **Figura 11**. Los tomates verdes eran de la variedad “Daniela” y los tomates rojos de la variedad “Pera”. Este tipo de tomate se utiliza para consumo en fresco preferentemente, aunque también pueden ser utilizados en algunas preparaciones industriales.



**Figura 11.** Clases de madurez fisiológica y comercial para comercializar tomates frescos.

Después de su recolección, las frutas fueron almacenadas en un refrigerador portátil y fueron transportadas hasta el laboratorio, donde se procedió a su lavado con agua siendo posteriormente secadas al aire bajo condiciones ambientales. Ambos tipos fueron separados en 6 lotes; un grupo fue usado como control (muestras iniciales), 3 lotes se seleccionaron para someterlos a la exposición con UV-C bajo tres condiciones diferentes, y los otros dos fueron almacenados a temperatura ambiente bajo las condiciones naturales de luz (ciclo día/noche) y en total oscuridad.

El tratamiento de hormesis con radiación ultravioleta C (UV-C) fue aplicado el día de la recolección a temperatura ambiente. Fue utilizada una lámpara de luz UV-C con un pico máximo de 254 nm. Las dimensiones de la cámara usada fueron 700 mm de ancho, 580 de profundidad y 732 de alto, con una lámpara de 15 W de luz UV-C. Los tomates fueron irradiados abarcando toda la superficie de los mismos con una lámpara que proporcionaba una intensidad de  $0.282 \text{ W/m}^2$  (medida con un radiómetro digital Delta Ohm DO9721, Chile Ltda., Santiago, Chile). La luz UV-C fue aplicada a temperatura ambiente en intervalos de 1, 3 y 12 horas, equivalentes a dosis de 1.0, 3.0 y  $12.0 \text{ kJ/m}^2$ , tal y como muestra la **Figura 12**. Después de cada tratamiento, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente para completar el proceso de maduración alcanzando un tiempo máximo de almacenamiento de dos días en el caso de los tomates rojos y hasta 8 días para los tomates verdes. De forma paralela los dos lotes de cada grupo de tomates (rojos y verdes) que no fueron expuestos a la UV-C, se dejaron madurar el mismo tiempo bajo las condiciones de luz/oscuridad (fotoperiodo de 12 h) y total oscuridad, respectivamente.



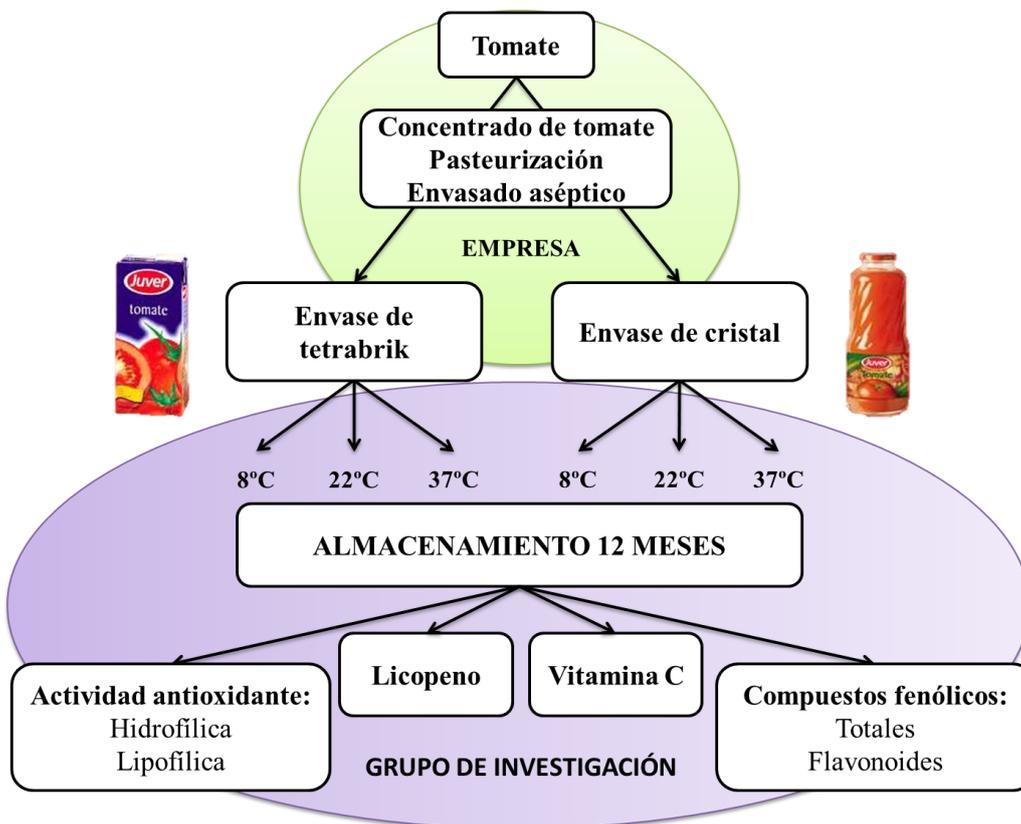
**Figura 12.** Diagrama de los diferentes tratamientos aplicados.

Inmediatamente después de su recolección (lote inicial) y tras finalizar el tiempo de almacenamiento establecido en los 5 lotes restantes tanto para los tomates rojos

como verdes, las muestras fueron analizadas para determinar el contenido en licopeno y sus isómeros,  $\beta$ -caroteno, compuestos fenólicos individuales y totales, y su actividad antioxidante. Para el análisis, las muestras fueron homogeneizadas y almacenadas a -80°C hasta que los análisis fueron llevados a cabo. Todos los análisis se realizaron con los tomates en fresco y por triplicado, a excepción de la determinación de los compuestos fenólicos individuales (flavonoides y ácidos hidroxicinámicos), por HPLC, para lo cuál las muestras fueron congeladas y liofilizadas con el objetivo de concentrar dichos compuestos bioactivos.

**EXPERIENCIA 2: EVOLUCIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS ANTIOXIDANTES DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN UN ZUMO DE TOMATE COMERCIAL**

Para el presente estudio se utilizó un zumo de tomate comercial elaborado por la empresa Juver Alimentación S.L.U. El procedimiento industrial seguido en esta experiencia es el proceso estándar de elaboración de zumo a partir de concentrado de tomate, que es posteriormente pasteurizado (96°C durante 30 s) y envasado en aséptico, utilizando dos tipos de envases con capacidad de 1 L: el envase de tetrabrik y la botella de cristal, tal y como se describe en la **Figura 13**.



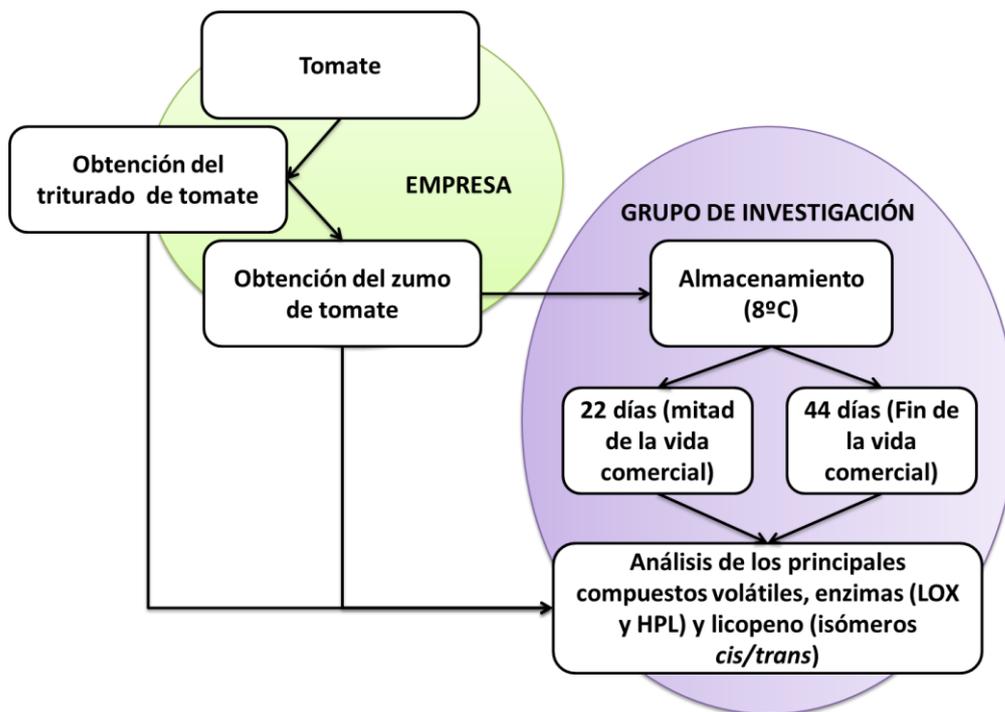
**Figura 13.** Diagrama del diseño experimental.

Se diseñó un estudio de almacenamiento de 12 meses de duración durante el cual las muestras se conservaron a diferentes temperaturas (8, 22 y 37°C). Es importante señalar que los zumos envasados en tetrabrik son comercializados como

zumos enriquecidos en vitamina C, dato que se indica en su etiqueta. Por el contrario, las muestras envasadas en botellines de cristal no llevaban vitamina C adicionada. Las muestras fueron analizadas en el momento de su fabricación y de forma periódica (cada 2 meses) hasta alcanzar el periodo de un año. Durante el tiempo de almacenamiento se analizaron parámetros físico-químicos, compuestos bioactivos antioxidantes (vitamina C, licopeno y sus isómeros, compuestos fenólicos totales y flavonoides totales) y la actividad antioxidante tanto hidrofílica como lipofílica, tal y como se muestra en la **Figura 13**. Todas las determinaciones se realizaron con la muestra en fresco y por triplicado.

**EXPERIENCIA 3: EVOLUCIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS VOLÁTILES RESPONSABLES DEL AROMA Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y LA ESTABILIDAD DE LOS CAROTENOIDES DURANTE EL TRATAMIENTO TÉRMICO Y EL ALMACENAMIENTO DE UN ZUMO DE TOMATE REFRIGERADO.**

Para la determinación y evolución de los compuestos aromáticos responsables del aroma del tomate, las enzimas relacionadas, lipoxigenasa (LOX) e hidroperóxido liasa (HPL), y la estabilidad de los carotenoides, se utilizó un zumo de tomate refrigerado, incluido dentro de los productos vegetales de V gama, elaborado una empresa local. El zumo se fabricó siguiendo el proceso estándar de la empresa a partir de tomate fresco y adicionando un 1.6% de aceite de oliva virgen extra, zumo de limón y sal (0.2 g/100 g de zumo de tomate), procediendo posteriormente a una “flash” pasterización (96°C durante 30 s) y a un envasado en aséptico en un envase tetrabrik de 500 ml, siguiendo el esquema representado en la **Figura 15**.



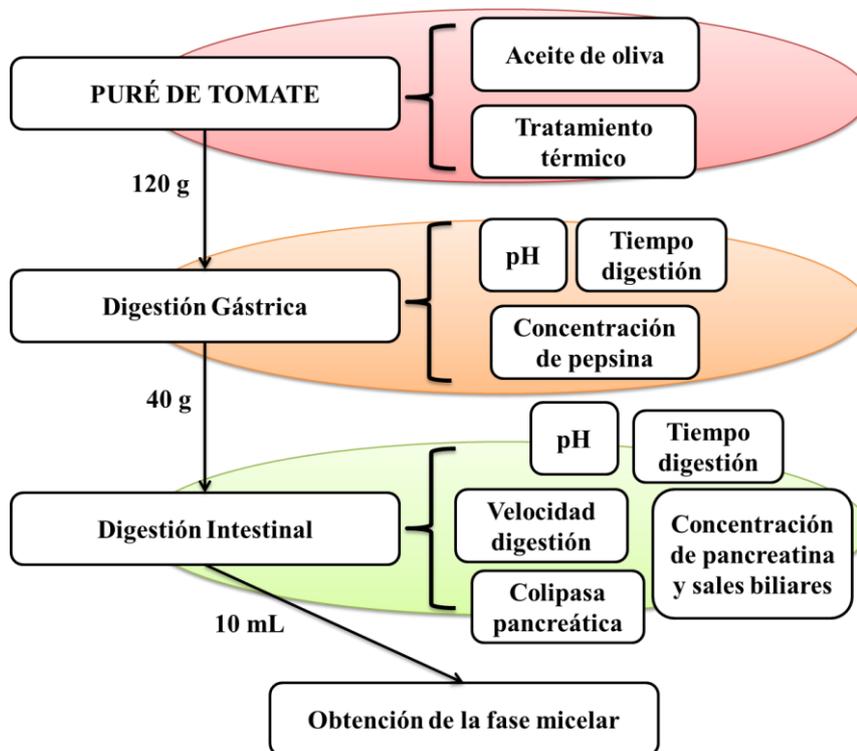
**Figura 15.** Diagrama experimental.

Las muestras fueron analizadas para determinar la actividad de las enzimas LOX y HPL, la evolución de los componentes volátiles y la estabilidad del licopeno durante la vida comercial

Los métodos analíticos usados en esta experiencia serán descritos a continuación. Parte de este estudio se llevó a cabo en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) de Valencia, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) bajo la supervisión y colaboración del Dr. José Vicente Gil Ponce.

EXPERIENCIA 4: ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN A LA DISPONIBILIDAD IN VITRO DE LOS CAROTENOIDES DEL PURÉ DE TOMATE

El objetivo de este estudio fue determinar la disponibilidad *in vitro* del licopeno y sus isómeros en el puré de tomate suministrado por Juver Alimentación, siguiendo un modelo de digestión gástrica (GD) e intestinal (ID). Para evaluar este efecto se seleccionaron inicialmente todos aquellos factores aparentemente críticos (apparent critical factors, ACF) que pueden ser decisivos para determinar la biodisponibilidad de estos compuestos de acuerdo a las referencias encontradas en la bibliografía científica. En total se seleccionaron 11 factores aparentemente críticos tal y como se muestra en la **Figura 14** y en la **Tabla 12**.



**Figura 14.** Esquema del proceso experimental y factores controlados durante el proceso de digestión *in vitro*.

Dos de los diez factores seleccionados estaban relacionados con la fase de inicial de preparación de muestra (aplicación de tratamiento térmico y la presencia de aceite), tres factores relacionados con la fase de digestión gástrica (el pH gástrico, el

tiempo de digestión gástrica, y la concentración de pepsina) y los factores restantes con diferentes condiciones de la digestión intestinal simulando la digestión en el intestino delgado (el pH intestinal, la concentración de pancreatina y sales biliares, la presencia de colipasa pancreática, el tiempo de digestión intestinal y la velocidad de digestión intestinal).

Todos los factores fueron codificados como variables independientes  $X_i$  (para  $i=1$  al 11). Esta codificación nos permite transformar las variable naturales en variables codificadas, definiendo las variables codificadas como variables sin dimensión y que presentan todas ellas la misma media aritmética y la misma desviación estándar (Myers y Montgomery, 1995). Para cada una de las variables se tomaron dos niveles un nivel bajo (nivel -1) y otro alto (nivel +1), siguiendo un diseño experimental de Plackett-Burman, tal como se relaciona en la siguiente tabla (**Tabla 12**).

**Tabla 12.** Características de los veinticuatro ensayos realizados en el diseño experimental de Plackett-Burman y los niveles bajo o alto aplicado a cada uno de los factores aparentemente críticos. La columna orden muestra el orden aleatorio en el que se debe realizar los ensayos y la columna N° el número de ensayo correspondiente.

Orden	N°	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	$X_9$	$X_{10}$	$X_{11}$
13	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
22	2	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
2	3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1
5	4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1
28	5	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
4	6	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
12	7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
20	8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
29	9	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
32	10	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1
17	11	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
9	12	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
3	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	14	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
1	15	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
7	16	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
21	17	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
25	18	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
30	19	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
6	20	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
16	21	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
23	22	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
27	23	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
31	24	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1

Los rangos experimentales considerados en el diseño son especificados en la **Tabla 13**.

**Tabla 13.** Factores aparentemente críticos (ACF), considerados a dos niveles, en el diseño experimental de plegamiento con un nivel de resolución IV. Los factores están expresados como variables codificadas ( $X_{1-11}$ ) y con las abreviaturas actuales correspondientes a las variables crudas originales.

Factores Críticos (ACF)	Símbolo		Nivel	
	Código	Actual	-1	+1
Tratamiento térmico	$X_1$	$T_t$	si	no
Presencia de aceite de oliva (%)	$X_2$	Aceite	5	7.5
pH gástrico	$X_3$	$pH_{GD}$	2	4
Tiempo de digestión gástrica (min)	$X_4$	$Tiempo_{GD}$	15	60
Concentración de pepsina (mg/100g)	$X_5$	$C_{Pepsina}$	500	800
pH intestinal	$X_6$	$pH_{ID}$	6	7.5
Concentración de pancreatina (mg/100 g)	$X_7$	$C_{Pancr}$	100	180
Concentración de sales biliares (mg/100 g)	$X_8$	$C_{Biliar}$	100	1000
Concentración de colipasa (mg/100 g)	$X_9$	$C_{Colip}$	0	100
Tiempo de digestión intestinal (min)	$X_{10}$	$Tiempo_{ID}$	60	120
Velocidad de la digestión intestinal (rpm)	$X_{11}$	$Vel_{ID}$	100	500

Para identificar los factores influyentes (influencing factors, IF) que son decisivos para la disponibilidad *in vitro* del licopeno y para su isomerización durante la fase de digestión, fue aplicado el diseño experimental de Plackett-Burman (PB) (Plackett y Burman, 1946) basado en las matrices de Hadamard, en el cual el número de experimentos que hay que realizar para evaluar el efecto de los factores considerados claves es múltiple de 4. Se utilizó un nivel de resolución IV que permite que los principales efectos no sean confundidos por la interacción de dos factores, permitiendo evaluar el efecto primario de cada uno de los ACF seleccionados (Robinson, 2000). Con este nivel de resolución y mediante una estrategia estadística de plegamiento conforme al criterio de Box y Hunter (Box y Hunter, 1961), fueron utilizados 24 ensayos en el diseño experimental de PB. La ventaja obvia de este tipo específico de diseño experimental es el número limitado de ensayos para evaluar los efectos primarios de los numerosos ACF seleccionados previamente y que en la experiencia realizada resultan ser 11 (**Tabla 13**) (Antony, 2003). De esta forma los efectos primarios de los 11 ACF pueden ser cuantificados con tan sólo 24

experimentos frente a los 2048 que serían necesarios realizar en el caso de utilizar un diseño factorial completo, lo que permite identificar entre los ACF cuales son realmente influyentes (IF), con un menor gasto de tiempo y de recursos materiales y humanos. Finalmente los experimentos fueron realizados en orden aleatorio (orden trial), porque la aleatorización permite eliminar los errores analíticos asociados al investigador o a otras fuentes externas de variabilidad, evitando así conclusiones erróneas (Joglekar y May, 1987; Robinson, 2000). La **Tabla 12** muestra los 24 ensayos realizados de acuerdo al diseño experimental PB y los niveles (bajo o alto) considerados en cada uno de los factores. Para cada ensayo los parámetros analíticos a estudiar se realizaron por triplicado. El procedimiento analítico seguido en cada uno de los ensayos será descrito posteriormente en la sección de Metodología Analítica. El diseño experimental de PB fue generado y los resultados analizados utilizando el paquete estadístico *Statistica software package* (StatSoft, Inc., Tulsa). El diseño y el análisis estadístico fueron realizados en colaboración con el Dr. Francisco Rincón de la Universidad de Córdoba.

## **METODOLOGÍAS ANALÍTICAS UTILIZADAS**

A continuación se describen las diferentes técnicas analíticas utilizadas en el desarrollo del trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral.

### *DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES*

Los carotenoides fueron analizados en las distintas muestras utilizadas mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de acuerdo con el método establecido por Böhm (2001) y Seybold *et al.* (2004).

#### I. *Aparatos y equipos:*

- Espectrofotómetro ThermoScientific UV-Visible modelo Evolution 300 (England).
- Agitador de tubos Heidolph (Schwabach, Germany).
- Centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5804 R (Hamburg, Germany).
- Homogenizador Ika-Werke (Staufen, Germany).
- Rotavapor Heidolph (Germany).
- Termostato de inmersión BT-25 (SBS Instruments, Badalona, España).
- Bomba de vacío Trivac (Leybold-Heraeus, Mellor Road, USA)
- Sistema de HPLC compuesto por:
  - Bomba Merck-Hitachi L-2130 (Merck, Darmstadt, Germany).
  - Inyector Merck-Hitachi L-2200 (Merck, Darmstadt, Germany).
  - Columna C<sub>30</sub> (5 mm de tamaño de poro, 250 x 4.6 mm) (Trentec, Gerligen, Alemania).
  - Termostatizador con célula Peltier modelo MFE-01 (Análisis vínicos S.L., Tomelloso, Spain).
  - Detector Merck-Hitachi de diodos en línea L-2455 (Merck, Darmstadt, Germany).

## II. Reactivos

- Tetrahidrofurano (THF) (Merck, Darmstadt, Germany).
- Metanol (MeOH) (Sigma, St. Louis, USA).
- Óxido de magnesio (Scharlau, Barcelona, España).
- Metil terc-butil éter (TBME) (Merck, Darmstadt, Germany).
- Butilhidroxitolueno (BHT) (Sigma, St. Louis, USA).
- Ciclohexano (Sigma-Aldrich, St Louis, USA):Tolueno (J.T.Baker, Deventer, Holland).

## III. Patrones

Como patrones fueron usados el  $\beta$ -apo-8'-(*trans*)carotenal (Fluka, Buschs, Switzerland) como patrón interno, y el *trans*-licopeno (CaroteNature, Ostermundigen, Switzerland) y el  $\beta$ -caroteno (Sigma, St. Louis, USA) como patrones externos.

## IV. Procedimiento

Las muestras fueron sometidas a tres extracciones con MeOH/THF (1+1, v/v) con un 0.1% de BHT) El proceso consistió en adicionar 400 mg de MgO, 200  $\mu$ L de *trans*- $\beta$ -apo-8'-carotenal (usado como patrón interno) y 35 mL de MeOH/THF a 0.6 g de muestra de tomate previamente triturado, y homogeneizar durante 5 min mediante el uso de un agitador magnético. La solución resultante fue filtrada al vacío usando un filtro Whatman N<sup>o</sup>5. La extracción fue repetida dos veces más hasta la pérdida total de color y combinada con los extractos previamente obtenidos. El siguiente paso supuso la evaporación del extracto con un rotavapor al vacío y a 30°C. El residuo obtenido fue vuelto a disolver en MEOH/TBME (1+1, v/v) hasta un volumen final de 10 mL. A continuación la solución fue centrifugada a 11000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante directamente analizado mediante HPLC.

Para la separación y cuantificación de los carotenoides por HPLC se utilizó una columna C<sub>30</sub> mantenida a una temperatura de 17°C. Se usó un método de gradiente con un flujo de 1.3 mL<sup>-1</sup> min constituido por MeOH (Solvente A) y MTBE (Solvente B). El gradiente establecido se muestra en la siguiente tabla (**Tabla 14**):

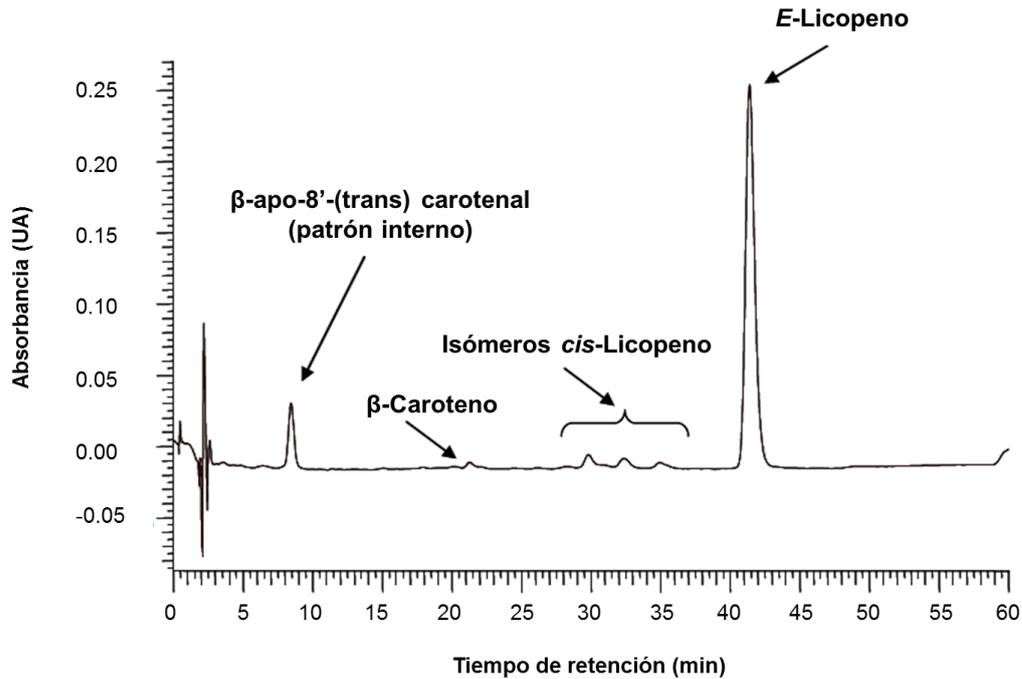
**Tabla 14.** Gradiente establecido en la determinación de carotenoides mediante HPLC.

Tiempo (min)	MeOH (%)	TBME (%)
<b>0</b>	90	10
<b>35</b>	55	45
<b>45</b>	40	60
<b>56</b>	40	60
<b>60</b>	90	10

A partir de los patrones se prepararon soluciones madre concentradas empleando como solvente la mezcla ciclohexano:tolueno. Para la calibración, las soluciones patrón se diluyeron a la concentración adecuada en la mezcla MeOH/TBME: para su posterior inyección en el HPLC. El cálculo de la concentración del patrón de licopeno y  $\beta$ -caroteno se realizó mediante espectrofotometría a 472 y 450 nm respectivamente, empleando un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) del licopeno en hexano de 3450 dl/g cm y 2180 dl/g cm para el  $\beta$ -caroteno, aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración (mg/mL)} = \frac{[(\text{Absorbancia}_{\text{patrón}} - \text{Absorbancia}_{\text{blanco}})]}{\epsilon_{472\text{nm}}} \times 10^6$$

Puesto que los patrones de los isómeros *cis* del licopeno no estaban disponibles, estos fueron identificados en base a sus tiempos de retención y espectro de absorción descritos en la literatura (Seybold *et al.*, 2004; Fröhlich, *et al.*, 2007). El contenido en carotenoides fue expresado como mg/Kg de peso fresco. En la **Figura 16** se muestra un cromatograma con la identificación de los distintos compuestos y sus tiempos de retención.



**Figura 16.** Cromatograma para carotenoides obtenido mediante HPLC.

### DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

La cuantificación de los fenoles totales de las distintas muestras de tomate se realizó, tras la hidrólisis ácida y alcalina de la muestra, y mediante la técnica espectrofotométrica basada en la utilización del método de Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton y Rossi (1965), modificado y adaptado a muestras de tomate por Gahler *et al.* (2003).

#### 1. Aparatos y equipos

- Espectrofotómetro ThermoScientific UV-Visible modelo Evolution 300 (England).
- Agitador de tubos Heidolph (Schwabach, Germany).
- Centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5804 R (Hamburg, Germany).

## *II. Reactivos*

- Solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Aldrich, Steinheim): pesar 15 gr de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y llevarlos a 200 mL con agua.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Fluka, Buschs, Switzerland): Diluirlo 1:10 en agua.
- HCl 1 M.
- Solución 2M de NaOH (Scharlau, España) en metanol al 75%: 16 g de NaOH en 50 mL de agua mas 150 mL de metanol.
- Solución de ácido metafosfórico (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 0.75 M: 14.7 g de MPA en 200 mL de agua.
- Mezcla de acetona (Quemical, Barcelona, España) /agua 1+1 (v/v).

## *III. Patrones*

Solución madre de ácido gálico se preparó pesando 10 mg y llevándolo a 100 mL con agua. Se repartió la solución madre en alícuotas de 1 mL en viales y se congeló a -30°C hasta su uso. A partir de esta solución se prepararon los diferentes patrones que constituyeron la recta de calibrado, comprendidos entre 0 y 100 mg/L.

## *IV. Preparación de la muestra*

Para la determinación de fenoles totales se tomaron 2 gramos de zumo de tomate, pesados en un tubo de centrifuga. A continuación se le adicionó 1 mL de HCl 1M, agitándose durante 1 minuto e incubándose en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos. Una vez transcurrida la primera hidrólisis (ácida), se retiró del baño, se agitó la muestra durante 1 minuto en vórtex y se adicionó 1 mL de NaOH (2M en 75% de MeOH), agitándose durante 1 minuto e incubándose de nuevo durante 30 minutos a 37°C (en agitación). Tras la hidrólisis alcalina se adicionó 1 mL de MPA (0.75M), se agitó y centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos. Una vez concluido el proceso, se separaron las fases, de forma que el sobrenadante se llevó a un matraz de 10 mL y el precipitado se volvió a disolver con 1 mL de Acetona: Agua (1+1), para volver a ser centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos. Seguidamente, se unieron los sobrenadantes y se volvió a centrifugar (5000 rpm durante 30 minutos). Finalmente se recogió de nuevo el sobrenadante y se llevó a un volumen final de 10 mL con la

solución de Acetona: Agua. Las muestras se almacenaron en congelación a -30°C hasta su análisis.

V. *Procedimiento*

Para cuantificar los compuestos fenólicos totales se realizó la reacción colorimétrica con el reactivo de Folin-Ciocalteu diluido, pipeteando en las microcubetas de plástico los volúmenes recogidos en la siguiente tabla (**Tabla 15**):

**Tabla 15.** Procedimiento de cuantificación de los compuestos fenólicos totales.

	Blanco	P1	P2	P3	P4	P5	Muestra
<b>C (mg/L de ác. Gálico)</b>	0	20	40	60	80	100	--
<b>Solución de ác. Gálico</b>	--	20µL	40 µL	60 µL	80 µL	100 µL	--
<b>Agua</b>	100 µL	80 µL	60 µL	40 µL	20 µL	--	--
<b>Muestra</b>	--	--	--	--	--	--	100 µL
<b>Folin-Ciocalteu (1:10)</b>	0.5mL	0.5mL	0.5mL	0.5mL	0.5mL	0.5 mL	0.5 mL
<b>Solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	0.4mL	0.4mL	0.4mL	0.4mL	0.4mL	0.4mL	0.4mL

Posteriormente, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas y se midió la absorbancia a 750 nm realizando el autocero frente al aire sin cubeta. Los resultados fueron expresados como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/Kg de peso fresco, de acuerdo a la recta patrón elaborada con las diferentes soluciones patrones, tal y como se muestra en la siguiente Figura (**Figura 17**).

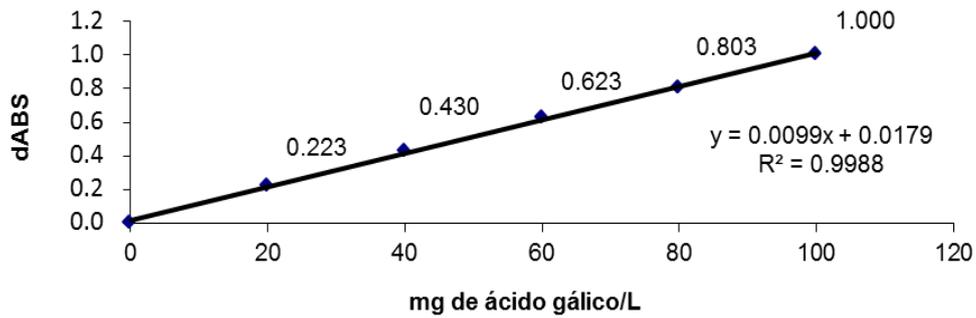


Figura 17. Recta patrón de los compuestos fenólicos.

### DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES LIBRES

La cuantificación de los flavonoides libres en las diferentes muestras de tomate se realizó mediante la técnica espectrofotométrica descrita por Dewanto *et al.* (2002) para la determinación de flavonoides en tomates.

#### I. Aparatos y equipos

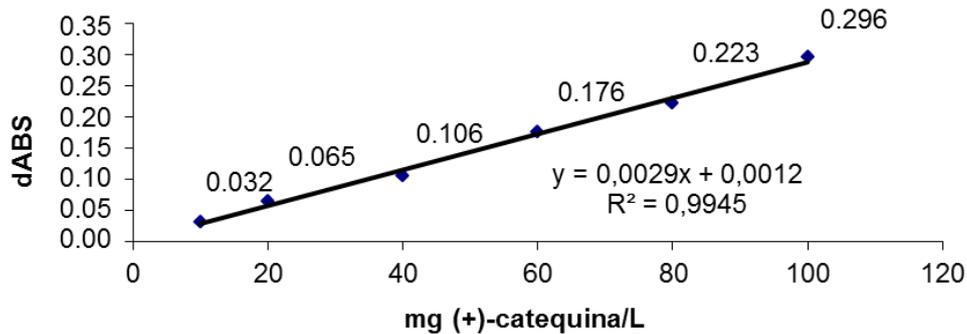
- Espectrofotómetro ThermoScientific UV-Visible modelo Evolution 300 (England).
- Agitador de tubos Heidolph (Schwabach, Germany).
- Centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5804 R (Hamburg, Germany).

#### II. Reactivos

- Solución de  $\text{NaNO}_2$  (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) al 5%.
- $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Aldrich, Steinheim, Germany)
- Solución de  $\text{NaOH}$  (Scharlau, España) 1M.
- (+)-Catequina (Sigma, St. Louis, USA).

III. Patrón

La (+)-Catequina fue usada como estándar usando las siguientes soluciones: 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L para obtener la recta patrón que aparece en la siguiente figura (**Figura 18**)



**Figura 18.** Recta patrón flavonoides.

IV. Procedimiento

Para la determinación de los flavonoides libres se tomó una alícuota de 200 µl de un extracto acuoso de las muestras de tomate y derivados, que fue preparada mezclando 2 g de muestra con 10 mL de agua destilada, separando el sobrenadante mediante centrifugación. Posteriormente, el volumen del extracto fue mezclado con 1.25 mL de agua destilada adicionando seguidamente 75 µl de NaNO<sub>2</sub> al 5%. Pasados 6 minutos, se añadieron 160 µl de una solución de AlCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O y se dejó durante 5 minutos antes de añadir 500 µl de NaOH 1M. Finalmente, la mezcla se llevó a un volumen de 2.5 mL con agua destilada agitando en un agitador de tubos hasta conseguir la completa homogenización. La absorbancia se midió en el espectrofotómetro a 510 nm, inmediatamente después del blanco y los patrones. El contenido total de flavonoides se cuantifica de acuerdo a la recta patrón (**Figura 18**) y es expresado como mg equivalentes de catequina (CE) por Kg de tomate (Dewanto *et al.*, 2002).

## *DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS INDIVIDUALES*

Los compuestos fenólicos individuales mayoritarios del tomate se analizaron y cuantificaron por HPLC siguiendo el método de extracción y análisis descrito por García-Valverde *et al.* (2011) para muestras de tomate.

### *I. Aparatos y equipos*

- Agitador de tubos (Heidolph, Schwabach, Germany).
- Centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5804 R (Hamburg, Germany).
- Concentrador al vacío Eppendorf modelo 5301 (Hamburg, Germany).
- Sistema de HPLC Agilent 1200 Series con detector de diodos y horno (Mechelen, Belgium).
- Columna RP-18 Lichrocart, 250 x 4 mm, 5µm (Merck, Darmstadt, Germany).

### *II. Reactivos*

- Metanol al 70%.
- Metanol (Sigma, St. Louis, USA).
- Agua acidificada con 0.05% de ácido trifluoroacético (Sigma, St. Louis, USA) a pH 2.

### *III. Patrones*

- Ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido coumárico, rutina y naringenina y la miricetina y el kaempferol (Sigma, St. Louis, USA).

### *IV. Procedimiento*

0.1 g de tomate liofilizado y 1.5 mL de MeOH al 70 % fueron homogeneizados durante un minuto en un agitador de tubos. La suspensión fue posteriormente centrifugada a 13000 rpm durante 10 minutos, repitiendo este proceso de extracción hasta 3 veces. Los sobrenadantes fueron combinados y concentrados en un

concentrador Eppendorf modelo 5301 a vacío, hasta reducir el volumen inicial a un volumen final de 1 mL. Los compuestos fenólicos individuales fueron analizados por HPLC con un detector diodo array (Agilent 1200 Series, Mechelen, Belgium), una columna RP-18 (Lichrocart, 250 x 4 mm, 5µm (Merck, Darmstadt, Germany) y a una temperatura de 15°C. El gradiente de agua acidificada (A) y MeOH (B) a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> fue establecido según la siguiente tabla (**Tabla 16**):

**Tabla 16.** Gradiente establecido para determinación y cuantificación de los compuestos fenólicos individuales.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	80	20
45	35	65
55	80	20

El tiempo total del análisis fueron 60 minutos. Los compuestos fueron identificados por comparación de espectros y cuantificados mediante comparación de sus áreas con las de los patrones. Las mediciones espectrales UV-visible se realizaron en un rango de 210-400 nm. Los cromatogramas fueron registrados a 320 nm para los ácidos hidroxicinámicos (ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido *p*-coumárico, ácido ferúlico), a 360 nm para los flavonoides (kaempferol, miricetina, luteolina, quercetina y rutina) y 280 nm para la naringenina. Los compuestos derivados fueron identificados por comparación de sus espectros con los de los patrones reales y fueron considerados como derivados cuando existió un 90% o más de similitud con el espectro del patrón. Los compuestos fenólicos individuales fueron calculados como mg por Kg de peso seco, pero los datos fueron convertidos en peso fresco, expresándolo por lo tanto como mg/Kg de peso fresco.

#### **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE BASADA EN LA REDUCCIÓN DEL RADICAL ABTS<sup>+</sup>**

La determinación de la actividad antioxidante en los zumos de tomate se llevó a cabo según la técnica descrita por Miller *et al.* (1996). La técnica está basada en la reducción del catión ABTS<sup>+</sup> por los antioxidantes presentes en la muestra. La solución

del radical presenta una coloración verde cuya absorbancia que se mide a 734 nm. La presencia de antioxidante en la muestra provoca una disminución de la coloración verde del radical. La magnitud de la disminución es proporcional a la concentración de antioxidantes.

### *I. Aparatos y equipos*

- Espectrofotómetro ThermoScientific UV-Visible modelo Evolution 300 (England).
- Agitador de tubos Heidolph (Schwabach, Germany).
- Centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5804 R (Hamburg, Germany).
- Homogenizador (Ika-Werke, Staufen, Germany).

### *II. Reactivos*

- Tampón fosfato salino pH 7.4 [0.218 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.494 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 8.766 g de NaCl en 1 L de agua.
- Acido 2,2'- diazino-di-(3-etilbenzoiatolín) sulfónico (ABTS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).
- Óxido de manganeso (IV) (Panreac, Barcelona, Spain).
- Hexano (Merck, Darmstadt, Germany).
- Acetona (JTBaker, Deventer, Holland).
- Etanol (JTBaker, Deventer, Holland).

### *III. Patrón*

- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromán-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Se utilizó el Trolox como antioxidante de referencia o patrón, preparándose una solución madre de 2.5 mM en tampón fosfato salino. Diariamente se prepararon 5 patrones de concentraciones 0.0125, 0.0250, 0.0500, 0.1 y 0.1250 mM diluyendo la solución madre con tampón fosfato salino.

#### *IV. Preparación de las muestras*

Para determinar la actividad antioxidante se prepararon dos tipos de extractos, hidrofílico y lipofílico, con el objetivo de poder extraer todos los compuestos antioxidantes del tomate con diferentes estructuras químicas y propiedades. Los procedimientos seguidos en la preparación de cada uno de estos extractos se detallan a continuación:

- Extracto hidrofílico: se tomaron 2 g de muestra de tomate en 10 mL de agua, agitado durante 1 minuto. Después, se centrifugó la mezcla a 5000 rpm durante 5 min y se utilizó el sobrenadante obtenido para determinar la actividad antioxidante.
- Extracto lipofílico: Se pesó 1 g de la muestra, y se le añadió 20 mL de una mezcla hexano:acetona:etanol (2:1:1), agitando durante 30 minutos y protegido de la luz. Posteriormente, se adicionaron 15 mL de agua destilada y se centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos, para separar la fase apolar (hexano) que contiene la fracción con los compuestos lipofílicos de las muestras de tomate. El extracto lipofílico se lleva a un volumen final de 10 mL con hexano y se toma una alícuota de 1 mL, evaporando el solvente bajo corriente de nitrógeno. El extracto seco se disuelve en 0.5 mL de 2-propanol y para analizar su actividad antioxidante frente al radical ABTS<sup>+</sup>.

#### *V. Procedimiento*

Para producir el radical, se hizo pasar una solución madre 5mM de ABTS en tampón fosfato salino a través de un filtro de papel con óxido de manganeso. Para retirar el exceso de óxido de manganeso se filtró la solución de radical ABTS activado a través de un filtro Whatman de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Esta solución se fue diluyendo posteriormente con tampón fosfato salino 5mM a pH 7.4 hasta alcanzar una absorbancia a 734 nm de  $0.70 \pm 0.02$ . A continuación la solución se preincubó a 30°C antes de su uso, utilizándola en estas condiciones de temperatura. La solución de trabajo se preparó diariamente.

Una vez preparados los patrones, el blanco y los extractos de las muestras, se procedió al desarrollo de la reacción colorimétrica de acuerdo al siguiente procedimiento recogido en la **Tabla 17**.

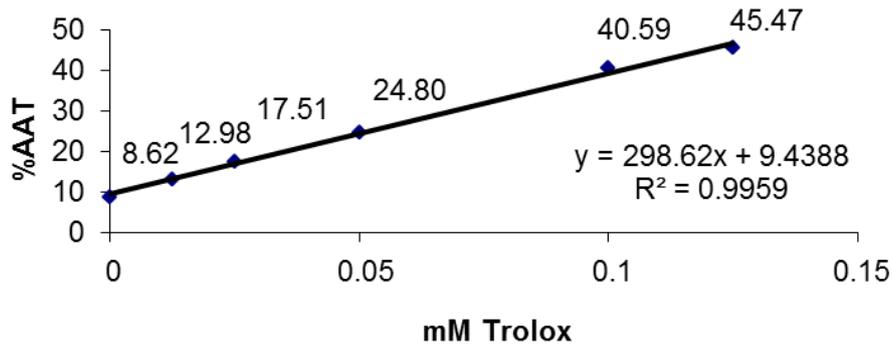
**Tabla 17.** Procedimiento para la determinación de la actividad antioxidante basada en la producción del radical ABTS<sup>+</sup>.

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua	100 µL	--	--
Patrón	--	100 µL	--
Muestra	--	--	100 µL
Sol. ABTS	1 mL	1 mL	1 mL

Al añadir el volumen de la muestra, agua o patrón a la solución del radical ABTS<sup>+</sup> se accionó el cronómetro y se agitó la mezcla durante 30 segundos en un agitador vórtex, midiendo la absorbancia a 734 nm a los 2 minutos del inicio de la reacción. La reducción de la coloración en la solución del radical ABTS<sup>+</sup> es proporcional a la actividad antioxidante de la muestra, aplicando la siguiente expresión matemática para calcular el porcentaje de actividad antioxidante (AA) en los patrones y en la muestra problema:

$$\%AA = [(Ab \text{ solución de trabajo} - Ab \text{ muestra/blanco}) / Ab \text{ solución de trabajo}] \times 100$$

Una vez calculado el %AA los patrones se elaboró la recta patrón, representando el %AA de las soluciones patrones frente a concentración de Trolox tal y como se muestra en la **Figura 19**. A partir de esta recta se calculó la actividad antioxidante total de las muestras que se expresó como mmol de equivalentes de Trolox por Kg de muestra.



**Figura 19.** Recta patrón de Trolox para la determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo TEAC.

### PODER ANTIOXIDANTE PARA REDUCIR AL IÓN FÉRRICO (FRAP)

EL potencial antioxidante de los extractos de tomate fue estimado usando el ensayo FRAP (Benzie y Strain, 1999). A bajo pH, cuando el complejo 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ -TPTZ) es reducido al complejo 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ -TPTZ) un color azul intenso se desarrolla con una absorción máxima de 593 nm (Benzie y Strain, 1996; Bahorun *et al.*, 2004).

#### I. Aparatos y equipos

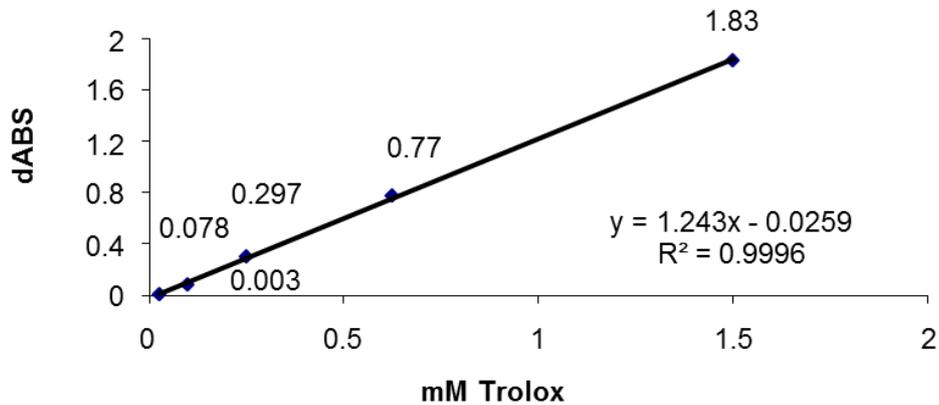
- Espectrofotómetro ThermoScientific UV-Visible modelo Evolution 300 (England).
- Agitador de tubos Heidolph (Schwabach, Germany).

#### II. Reactivos

- Buffer de acetato de sodio 300 mM pH 3,6 ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (Scharlau, Barcelona, España) y  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  (BDH Laboratory Supplies, England).
- Solución 10 mM TPTZ (2, 4, 6 tris (2-piridil)-s-triazina) 98% (Sigma, St. Luis, USA) en una solución 40mM de HCl (Riedel de Haën, Alemania).
- Solución 20 mM de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Riedel de Haën, Alemania).

### III. Patrón

- La solución de  $\text{Fe}^{+2}$  se preparó a partir  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Riedel de Haen, Alemania) en un rango de 0.1 a 2 mM (**Figura 20**).



**Figura 20.** Recta patrón de Trolox para la determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo FRAP.

### IV. Preparación de la muestra

Para determinar la actividad antioxidante por la técnica del FRAP se preparó un extracto hidrofílico de las muestras homogeneizando 2 g de muestra de tomate o zumo de tomate en 10 mL de agua y agitando durante 1 minuto hasta completar una buena dispersión. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 5000 rpm durante 5 min y se utilizó el sobrenadante obtenido para el desarrollo de la reacción colorimétrica.

### V. Procedimiento

Para la reacción se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra y fueron adicionados a 1 mL del reactivo FRAP, leyendo en continuo la absorbancia de la reacción a 593 nm hasta los 4 minutos. La lectura de absorbancia a los 4 minutos se usó para calcular los valores del FRAP. Tras realizar la recta patrón con los valores obtenidos en las soluciones patrones, se calculó la actividad de las muestras expresando los resultados como mmol de equivalentes de Fe (II) por Kg de peso fresco (mmol Eq. Fe (II)/Kg).

## VITAMINA C

La cuantificación del ácido ascórbico se realizó mediante HPLC, de acuerdo a la metodología descrita por Esteve *et al.* (1995).

### *I. Equipos y aparatos*

- Centrifuga para Eppendorf modelo VWR Galaxy 14D (Barcelona, España).
- HPLC Merck-Hitachi LaChrom (Darmstadt, Alemania) compuesto por: Inyector autosampler modelo L-7200, bomba modelo L-7100, columna con horno integrado modelo L-7350 y un detector de diodos modelo L-7455.
- Agitador de tubos Heidolph (Schwabach, Germany).

### *II. Reactivos*

- Ácido fosfórico (Aldrich, Steinheim, Germany).
- Ácido Metafosfórico (Aldrich, Steinheim, Germany).
- Ácido Metafosfórico 1% (MPA) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
- Tampón fosfato 0.1M (pH=3)

### *III. Patrón*

Ácido L-(+)-ascórbico (Merck 100127, Darmstadt, Germany). Se preparó una solución madre de patrón de concentración 25 mg de ácido ascórbico en 100 mL de MPA (1%). A partir de la solución madre patrón se prepararon 4 diluciones para elaborar una recta patrón. Las concentraciones de las soluciones de trabajo empleadas para hacer la recta fueron 2.5, 6.25, 12.5 y 25 µg/mL, obteniéndose cromatogramas como el representado en la **Figura 21**.

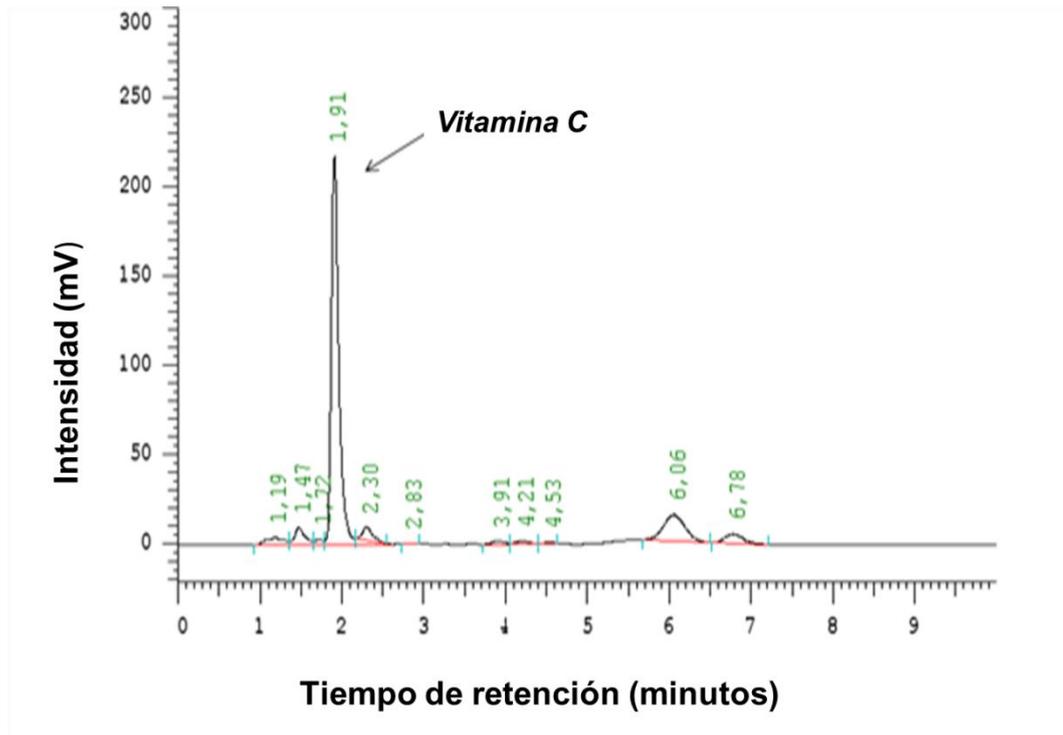


Figura 21. Cromatograma vitamina C.

#### IV. Procedimiento

Diez gramos de muestra fueron diluidos hasta 100 mL con MPA (1%) y agitados durante 10 min. Los extractos fueron filtrados en primer lugar con un papel de filtro Whatman N°1 y posteriormente con un filtro Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  antes de ser analizados mediante HPLC. Las condiciones del sistema fueron:

- Volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$
- Detector de diodos Array de longitud de onda fija en 245 nm
- Volumen de elución isocrática con un caudal de 1  $\text{ml min}^{-1}$ .
- Una columna RP-18 Lichospher 100 (12.5 cmx 0.4 cm), y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Tampón fosfato 0.1 M (pH 3.5) para la fase móvil.

Los resultados se expresaron como mg de ácido ascórbico por Kg de zumo de tomate.

## *DETERMINACIÓN DE LA DISPONIBILIDAD IN VITRO DEL LICOPENO*

La técnica de determinación de la disponibilidad *in vitro* del licopeno se basa en el método de digestión *in vitro* propuesto por Miller *et al.* (1981) y modificado posteriormente por Garret *et al.* (1999) para evaluar la biodisponibilidad de los carotenoides. La técnica consiste en simular un proceso de digestión gástrica seguido de una digestión intestinal, separando posteriormente la fase micelar que recoge la fracción de licopeno y sus isómeros disponible para su absorción en el intestino delgado. En esta técnica hemos introducido algunas variaciones en aquellos factores que han sido considerados críticos, utilizando diferentes valores para estos factores basados en datos previos obtenidos en la bibliografía científica, tal y como se ha descrito previamente en la sección de Diseño Experimental (Experiencia 4).

### *I. Equipos y aparatos*

- Baño agitador Unitronic OR-P Selecta (Barcelona, España).
- pH metro Crison Micro pH 2000 (Barcelona, España).

### *II. Reactivos*

- HCl (Scharlau, Barcelona, España) 0.1N.
- HCl 6M y 1M (para ajustar pH en la fase gástrica).
- NaHCO<sub>3</sub> (Aldrich, Steinheim, Germany) 0.1M.
- KOH (J.T. Baker, Deventer, Holland) 20% (para ajustar pH).
- NaCl (Panreac, Barcelona, España) 0.9%.
- Pepsina (Sigma P-7000, 370 units/mg solid, from porcine stomach mucosa).
- Pancreatina (Sigma P-1750, from porcine pancreas).
- Sales biliares (Sigma B-8756).
- Colipasa Pancreática Porcina (Sigma C-3028, colipase from porcine pancreas).

### *III. Preparación de las muestras*

Para la preparación de las muestras fueron tenidos en cuenta los siguientes factores, partiendo en todos los ensayos de una misma cantidad de muestra

correspondiente a 150 g de puré de tomate. De estos 150 g, 120 g se separaron para realizar el proceso de digestión y los 30 g restantes se almacenaron en viales de color ámbar a -80°C para proceder al análisis de licopeno y sus isómeros por HPLC.

1. La presencia/ausencia de aceite de oliva (Aceite,  $X_2$ ): La adición de aceite en las muestras dependió del tipo de ensayo. En los ensayos de nivel bajo para este factor (-1) no se adicionó, mientras que en los ensayos con un nivel alto (+1), se adicionaron 7.5 g de aceite, a los 150 g de muestra inicial, para conseguir un porcentaje del 5% de aceite en la muestra. La muestra fue homogenizada durante 5 min para conseguir una buena mezcla de las dos fases. La adición de aceite se realizó para evaluar el efecto de la presencia de grasa en la solubilización del licopeno en el interior de las micelas, hecho que es un factor importante para facilitar la disponibilidad (Ahuja *et al.*, 2006).
2. Tratamiento térmico ( $T_t$ ,  $X_1$ ): en aquellos ensayos en los que las muestras llevaban un nivel alto (+1) de este factor se aplicó un tratamiento térmico durante 15 min a ebullición suave (evitando la evaporación en exceso), simulando el proceso de preparación culinaria de las salsas de tomate. Posteriormente, se adicionó el volumen de agua perdido (hasta completar 120 g), con el objetivo de mantener el mismo grado de concentración de licopeno que la muestra inicial y poder evaluar el efecto del tratamiento térmico en la isomerización y absorción del licopeno. Por el contrario en los ensayos en los que las muestras llevaban un nivel bajo (-1) de este factor, la muestra de puré de tomate se sometió al proceso de digestión sin un tratamiento previo de calentamiento.

1) Fase de Digestión gástrica (GD)

Durante el proceso de GD fueron considerados los siguientes factores:

- pH de la digestión gástrica ( $pH_{GD}$ ,  $X_3$ ): La acidez del pH es una de las fases iniciales que puede originar isomerización del licopeno debido a la baja estabilidad de este carotenoide en presencia de ácidos. El pH gástrico con el estómago vacío y en las fases de ayuno está en torno a 1.5, sin embargo con la presencia del alimento se elevan los valores. En los estudios *in vitro* se han

utilizado valores de pH gástrico de 1.5 y 2, pero según otros autores cuando se consumen alimentos vegetales el pH gástrico se eleva hasta 4 (Reboul *et al.*, 2006; Feruzzi *et al.*, 2006) por lo que recomiendan que los ensayos con carotenoides se realicen con este valor de pH. En este estudio se consideró como nivel bajo (-1) un pH de 2 y nivel alto (+1) un valor de pH de 4. Los 120 g de muestra se introdujeron en un bote de digestión grande y se ajustó el pH a  $2\pm 0.02$  o a  $4\pm 0.02$  según el ensayo. Se utilizó HCl 6M para ajustar a pH 2 y HCl 1M para ajustar a pH 4. A continuación las muestras fueron introducidas en un baño termostático a 37°C durante 10 min para atemperarlas con anterioridad al inicio de la digestión gástrica.

- Concentración de pepsina ( $C_{\text{pepsina}}$ ,  $X_5$ ): En los procesos de digestión gástrica recogidos en la bibliografía científica hay muchas variaciones en la concentración de pepsina utilizada, que varía en función del tipo de muestra y de la cantidad de alimento ensayado. En el método de Miller *et al.* (1981) utilizan 500 mg/100 g de muestra, pero otros autores aumentan los valores de pepsina hasta 800 mg/100 g (Reboul *et al.*, 2006). Para este factor se seleccionó como nivel bajo (-1) una concentración de 500 mg pepsina/100g de muestra y como nivel alto (+1) una concentración de 800 mg pepsina/100g de muestra. Las diferentes concentraciones de pepsina fueron preparadas disolviendo la cantidad de enzima necesaria (pepsina de estómago porcino, Sigma P-7000) en ácido clorhídrico 0.1 N). Posteriormente se añadió 3.125 mL de una solución de pepsina a las muestras y se introdujeron en el baño termostático a 37°C en agitación continua a durante 15 minutos o 60 minutos según el ensayo, tal y como se describe a continuación.
- Tiempo de digestión gástrica ( $\text{Tiempo}_{\text{GD}}$ ,  $X_4$ ): En la bibliografía emplean 1h de digestión gástrica a 37°C. Este tiempo es elevado si tenemos en cuenta el alimento sobre el que vamos a trabajar, ya que tras el consumo de alimentos con un tamaño de partícula inferior a 2 mm, el estómago se vacía rápidamente, y con los líquidos (como por ejemplo el zumo) se vacía de inmediato. El vaciado gástrico se enlentece por la presencia de proteínas, por la presencia de aceite y por la acidez. Para evaluar el efecto del tiempo de vaciado gástrico se consideró con nivel bajo (-1) 15 min y como nivel alto (+1) 60 min. Este hecho no permite evaluar que el grado de isomerización del licopeno en función de que sea ingerido solo, lo que daría un tiempo de digestión corto, o sea ingerido con otros alimentos que alargaría el proceso de digestión gástrica.

Transcurrido el tiempo de digestión gástrica se tomaron  $\approx 20$  g para el análisis de licopeno y sus isómeros, anotando el pH de la muestra tras la primera fase de digestión. La muestra digerida es utilizada para la fase siguiente de digestión intestinal.

## 2) Fase de digestión intestinal (ID)

Durante el proceso de ID fueron considerados los siguientes factores:

- pH intestinal ( $\text{pH}_{\text{GD}}$ ,  $X_6$ ): Una vez finalizada la digestión gástrica la muestra se neutraliza para proceder a la digestión intestinal. Los valores de pH intestinal varían en la bibliografía, por lo que de acuerdo a esos datos se seleccionó un pH de 6 para el nivel bajo (-1) y un pH de 7.5 para el nivel alto (+1). Para ello se toman 40 g de la muestra digerida y se introdujo en un bote de digestión, regulando el pH con KOH al 20%. La muestra se volvió a introducir en el baño termostático a 37°C para atemperar la muestra antes de iniciar la digestión intestinal.
- Concentración de pancreatina y sales biliares ( $C_{\text{Panocr}}$ ,  $X_7$ ;  $C_{\text{Biliar}}$ ,  $X_8$ ): La digestión intestinal se realizó adicionando a la muestra 10 mL de una solución de pancreatina y sales biliares. Para la pancreatina porcina (Sigma P-1750) se seleccionaron para el nivel bajo (-1) y alto (+1) 100 y 180 mg de pancreatina/100 g de muestra, respectivamente. Para las sales biliares (Sigma B-8756) se seleccionó una concentración de baja (-1) y alta (+1) de 100 y 1000 mg/100 g de muestra. Las sales biliares son fundamentales para favorecer la formación de micelas y para incorporar el licopeno a la fase micelar. Como la pancreatina y las sales biliares se adicionan de forma conjunta se prepararon cuatro soluciones con diferentes concentraciones de estos factores, adicionando a la muestra 10 mL de la solución correspondiente según el ensayo.
  - a. Solución A para muestras con 100 mg de pepsina y 100 mg de sales biliares.
  - b. Solución B para muestras con 100 mg de pepsina y 1000 mg de sales biliares.

- c. Solución C para muestras con 180 mg de pepsina y 1000 mg de sales biliares.
  - d. Solución D para muestras con 180 mg de pepsina y 100 mg de sales biliares.
- 
- Presencia/ausencia de colipasa pancreática ( $C_{\text{Colip}}$ ,  $X_9$ ): La colipasa pancreática es un factor que favorece la digestión de las grasa cuando la muestra lleva aceite por lo que puede ser considerado un factor determinante en la formación de micelas y en la disponibilidad del licopeno. Se ha propuesto como modificación al método inicial, adicionando durante la digestión intestinal en los ensayos con un nivel alto (+1) 1 mL de una 50  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{NaHCO}_3$  0.1M. Por el contrario en los ensayos con nivel bajo (-1) no se adicionó colipasa pancreática.
  - Tiempo de digestión intestinal ( $\text{Tiempo}_{\text{ID}}$ ,  $X_{10}$ ): Una vez adicionada las diferentes soluciones enzimáticas los botes se mantuvieron en el baño termostático a 37°C para realizar el proceso de digestión intestinal. De acuerdo a la bibliografía científica se seleccionaron dos tiempos de digestión intestinal 60 min para el nivel bajo (-1) y 120 min para el nivel alto (+1).
  - Velocidad de agitación ( $\text{Vel}_{\text{ID}}$ ,  $X_{11}$ ): Durante el tiempo de digestión las muestras se mantuvieron en agitación constante, en posición horizontal, utilizando dos velocidades. Aunque en otros trabajos científicos no se especifica la velocidad de agitación, este puede ser un factor importante en la fase de digestión intestinal, ya que la acción mecánica puede favorecer la formación de micelas y la incorporación del licopeno a las mismas. Por ello las muestras se mantuvieron durante el tiempo de incubación en agitación a 40 rpm (en los ensayos de un nivel bajo, -1) y a 80 rpm (en los ensayos de un nivel alto, +1).

Transcurrida la ID, se recogieron  $\approx 20$  g de muestra digerida para el análisis de licopeno y de sus isómeros y el resto de muestra se utilizó para separar la fase micelar.

### 3) Separación de la fase micelar

Para la obtención de la fase micelar, 10 mL de la muestra obtenida tras la ID se dejaron en reposo y oscuridad durante 16 horas a temperatura ambiente, centrifugando posteriormente a 5000 rpm durante 20 minutos y a 4°C (Granado-Lorenzo *et al.*, 2007b).

Todas las muestras de las distintas fracciones (muestra inicial, GD, ID y fase micelar) fueron introducidas en un tarro de cristal opaco, en atmósfera de N<sub>2</sub> y almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis. En todas las fracciones se determinó el contenido total de licopeno y sus isómeros mediante el método de HPLC descrito anteriormente.

## *EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES*

La extracción y determinación de volátiles en tomate se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Tandon *et al.* (2003).

### I. Equipos y aparatos

- Agitador de tubos Heidolph (Schwabach, Germany).
- Centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5804 R (Hamburg, Germany).
- Homogenizador Ika-Werke (Staufen, Germany).
- Rotavapor Heidoph Laborota 4002 (Schwabach, Germany).
- Bomba de vacío Trivac Leybold-Heraeus (Mellor Road, USA).
- Cromatógrafo de gases CG Thermo Trace TM GC Ultra con detector de ionización de llama asociado a un espectrómetro de masas Termo DSQ.
- Columna capilar HP-INNOWAX (Agilent-Technologies, Colorado, USA) de 30 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de fase estacionaria.
- Fibra Supelco (Pennsylvania, USA) DVB (divinil-benceno) / CAR (carboxeno) / PDMS (polidimetilsiloxano), para la fase de adsorción.

## II. Reactivos

- Solución saturada de CaCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Germany).
- NaCl (Panreac, Barcelona, Spain).

## III. Patrones

- Patrón interno: Solución de 2-Octanol (Fluka, Steinheim, Germany) en etanol de una concentración 16.4 µg/mL.
- Patrones externos: Hexanal, *E*-2-Hexenal, 6-Metil-5-Hepten-2-ona, 1-Hexanol, 3-Hexenol, 2-Isobutiliazol, 6-Metil-5-Hepten-2-ol, β-ionona, *Z*-3-Hexanal, *E,E*-2-4-Hexadienal (Aldrich, St Louis, USA).

## IV. Preparación de la muestra

A 40 mL de zumo de tomate refrigerado se le adicionaron 10 mL de la solución saturada de CaCl<sub>2</sub>, y la mezcla fue homogeneizada durante 10 s, con el objetivo de inactivar las enzimas presentes en el zumo. A continuación la muestra se filtró al vacío y para, posteriormente, ser centrifugada durante 15 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante fue recogido tras la centrifugación y se almacenó a -20°C hasta ser utilizado para el análisis de los compuestos volátiles.

## V. Procedimiento

En un tubo de ensayo con tapón de rosca y septum incorporado se pesaron 0.7gr de NaCl. Posteriormente se adicionaron 3 mL de la muestra previamente atemperada a temperatura ambiente (muestra o el extracto de muestra obtenido anteriormente), y se dejó durante 30 min en agitación a temperatura ambiente. A continuación se introdujo la fibra DVB/CAR/PDMS para iniciar la fase de adsorción de compuestos volátiles al espacio de cabeza, dejándola durante 30 min. La fibra se colocó en el punto de inyección del cromatógrafo de gases y se mantuvo durante 4 min a 240°C. Los parámetros y condiciones de funcionamiento del cromatógrafo de gases se describen a continuación:

- Helio como gas portador a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>.
- Temperatura del detector: (FID) 300°C.
- Temperatura del inyector: 240°C.
- Temperatura del horno: Se utilizó la siguiente rampa de temperatura
  - o 40°C durante 5 min.
  - o Incremento de 5°C/min hasta 150°C.
  - o Incremento hasta 250°C a razón de 20°C min<sup>-1</sup>.
  - o Mantenimiento a 250°C durante 10 min.

La identificación de los compuestos volátiles se llevó a cabo mediante espectrometría de masas acoplada al cromatógrafo de gases. Las condiciones en las que se mantuvo el espectrómetro de masas fueron:

- Temperatura de ionización: 200°C.
- Ionización de impacto electrónico: 70 eV.

Finalmente se procedió a la comparación de espectros de masas con la biblioteca Willey6, NISTDEMO, MAINLIB y REPLIB, cuantificándose los compuestos volátiles mediante el uso de curvas de calibrado que respondían a la siguiente ecuación:

#### **Área cromática= Factor de respuesta FID x Concentración**

El área mínima integrable fue de 20-40 unidades arbitrarias de señal cromatográfica.

#### ***TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS***

La extracción y determinación de las enzimas LOX y HPL se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Aguiló-Aguayo *et al.* (2010).

## I. Equipos y aparatos

- Agitador de tubos (Heidolph, Schwabach, Germany).
- Envasadora al vacío Franke modelo EVE-120, Barcelona, España).
- Espectrofotómetro UV-Visible modelo Evolution 300 (ThermoScientific, England).
- Centrífuga refrigerada modelo 5804 R (Eppendorf, Hamburg, Germany).

## II. Reactivos

- Tampón fosfato de sodio 0.5 mol/L (pH 6.5).
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).
- Tampón fosfato de sodio 0.2 mol/L (pH 6.5).
- Hidróxido de sodio 0.05 mol/L.
- NADH 10mmol/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).
- Solución de ADH (Alcohol Dehydrogenase from yeast) de 5 unidades/ $\mu$ L (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).
- Ácido linoleico (Sigma, St. Louis, USA).
- Tween 20 (Sigma, St. Louis, USA).

## III. Preparación de la muestra

Los tomates fueron lavados, secados, cortados y homogeneizados. El zumo resultante fue filtrado para eliminar pieles y semillas. Para conservar mejor la actividad enzimática fueron sellados al vacío en bolsas de plástico de polietileno. El tratamiento térmico al que fue sometido el triturado de tomate consistió en una pasterización rápida a 96°C durante 30 s y posterior envasado en frío y en tetrabrik.

## IV. Procedimiento

LOX y HPL fueron extraídas mezclando 5 mL de la muestra de zumo de tomate con 2 mL de tampón fosfato de sodio 0.5 mol/L (pH 6.5) y 5 g/L de Tritón X-100 en un tubo de centrífuga. El homogeneizado fue centrifugado a 10000 x g durante 15 min a 4°C, desechando el precipitado obtenido.

- *Medida de actividad LOX*

La actividad LOX se determinó mediante monitorización continuada de la formación de dienos conjugados a partir del ácido linoleico. El sustrato estuvo constituido por:

- 10  $\mu\text{L}$  de ácido linoleico.
- 4 mL de agua destilada (libre de oxígeno).
- 1 mL de Hidróxido de sodio  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$ .
- 5  $\mu\text{L}$  de Tween 20.

La mezcla se agitó y diluyó hasta 25 mL con agua destilada. La medida de actividad fue medida a  $25^{\circ}\text{C}$ . Cada cubeta de cuarzo contuvo:

- 2.7 mL de tampón fosfato  $0.2 \text{ mol/L}$  (pH 6.5).
- 40  $\mu\text{L}$  de sustrato (Incubar 10 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$ ).

La reacción comenzó con la adición de 100  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y el incremento en la absorbancia fue seguido espectrofotométricamente a 234 nm durante 4 minutos a  $22^{\circ}\text{C}$ . El blanco se preparó con 0.5 mL de agua destilada y 3 mL de sustrato. La actividad LOX se determinó a partir de la pendiente de la porción lineal de la curva obtenida. Una unidad de actividad LOX es definida como el cambio de  $0.001$  unidades de absorbancia  $\text{min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$  de extracto enzimático a  $22^{\circ}\text{C}$ .  $\epsilon=25.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

- *Medida de la actividad HPL*

Este ensayo se lleva a cabo mediante la oxidación de la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), un cofactor de la alcohol deshidrogenasa (ADH), el cual cataliza la conversión de los productos aldehídicos de la actividad HPL hacia alcoholes. La mezcla contendrá:

- 2.7 mL de tampón fosfato de sodio  $0.2 \text{ mol/L}$  (pH 6.5).
- 30  $\mu\text{L}$  de NADH  $10 \text{ mmol/L}$ .
- 30  $\mu\text{L}$  de la solución de ADH de 5 unidades/ $\mu\text{L}$  (o 15  $\mu\text{L}$  de una solución ADH de 10 Uds/ $\mu\text{L}$ ).
- 250  $\mu\text{L}$  de sustrato [mantener durante 10 min (tiempo de equilibrado)].
- 150  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático.

La actividad HPL se midió en ausencia de enzima con el fin de excluir la capacidad de oxidación del NADH. La reacción es controlada durante 5 minutos a 22°C siguiendo el descenso de la absorbancia a 340 nm. Una unidad de actividad HPL es definida como la cantidad de enzima que consume 1 mL de sustrato NADH por minuto.  $\epsilon=6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

- *Actividad residual relativa*

Los porcentajes de actividad residual (RA) de LOX y HPL fueron calculados como:

$$\text{RA (\%)} = (\text{At/Ao}) \times 100$$

Donde At es la actividad enzimática de la muestra después del tratamiento y Ao es la actividad de la enzima de la muestra sin tratar.

### *PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS*

Para completar el estudio de las características de los zumos durante el almacenamiento se determinaron el pH y los grados Brix como propiedades físicas, las cuales fueron evaluadas a lo largo del estudio de almacenamiento (Experiencia 2).

#### I. Equipos y aparatos

- pH-metro Crison Micro pH 2000 (Crison, Barcelona, España).
- Refractómetro LeicaAbbeMark II (Leica, Buffalo, Nueva York).

#### II. Reactivos

- NaOH 0.1 N a pH 8.2.

### III. Procedimiento

Se llevó a cabo el análisis del pH con un pH-metro, la acidez titulable (expresado como porcentaje de ácido cítrico), que fue analizada mediante la titulación del producto con NaOH 0.1 N hasta alcanzar una valor de pH 8.2, y los sólidos solubles, expresados como grados Brix fueron cuantificados mediante un refractómetro manual siguiendo los procedimientos previamente establecidos por Shams y Thompson (1987).

## **ESTUDIO ESTADÍSTICO**

### *EXPERIENCIA N°1*

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) empleando un intervalo de confianza del 95% (considerando diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ ) para establecer diferencias entre las distintas muestras y distintos tratamientos. Para la comparación de medias, en los casos en que se rechazó la hipótesis de igualdad de medias, se aplicó un test de separación de medias según la técnica de Tukey. Para analizar correlaciones entre variables se efectuó un análisis de correlación de Pearson. Los resultados de cada determinación se muestran como media  $\pm$  desviación típica del triplicado.

### *EXPERIENCIA N°2*

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows. Para estudiar la variación de los compuestos analizados, en función del tiempo y la temperatura de almacenamiento, se realizó un análisis de dos factores de la varianza (ANOVA) usando el modelo lineal general (GLM). La prueba de Tukey para comparaciones a pares se utilizó para determinar diferencias significativas en los diferentes compuestos analizados para cada zumo a lo largo de las diferentes medidas tomadas durante la vida comercial. Las relaciones entre las variables se analizaron mediante coeficientes de correlación de Pearson. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Los resultados de los distintos parámetros se muestran como media  $\pm$  desviación típica del triplicado.

### *EXPERIENCIA N°3*

Cada muestra, tanto de la actividad relativa de las enzimas LOX y HPL como de la cuantificación de compuestos volátiles y concentración de licopeno, se analizó por triplicado, mostrando los resultados como el valor promedio y su desviación típica. Los datos se trataron estadísticamente con el paquete estadístico SPSS 15.0 mediante análisis de varianza (ANOVA), test de Tukey y determinación de correlación

mediante el análisis de Pearson, siendo considerados los valores de  $p < 0.05$  estadísticamente significativos.

#### *EXPERIENCIA N°4*

Para esta última experiencia fue utilizado el paquete estadístico Statistica software package (StatSoft, Inc., Tulsa). El diseño experimental de PB fue generado y los análisis de licopeno fueron realizados por triplicado en cada uno de los experimentos y para cada una de las fracciones estudiadas durante la digestión *in vitro* (fracción de digestión gástrica, digestión intestinal y fracción micelar). Los resultados obtenidos fueron analizados con el test de "t-Student" para establecer la significación estadística. Fueron seleccionados como factores influyentes (IF) aquellos con una significación estadística  $p \leq 0.20$ .



---

# *Resultados y discusión*

---

## EXPERIENCIA 1: EFECTO DEL TRATAMIENTO ULTRAVIOLETA EN LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS EN TOMATES

### TOMATES ROJOS

La concentración de licopeno total, así como las de sus isómeros, de las muestra no tratadas (inicial, ciclo día/noche y oscuridad) y de las tratadas con luz ultravioleta durante 1, 3 y 12 horas, son presentadas en la **Tabla 18**.

**Tabla 18.** Contenido de  $\beta$ -Caroteno, *all-trans*-Licopeno, *cis*-Licopeno y Licopeno Total en tomates rojos (expresado como mg/Kg peso fresco).

	<i><math>\beta</math>-Caroteno</i>	<i>all-trans-Licopeno</i>	<i>cis-Licopeno</i>	<i>Licopeno Total</i>
<b>Inicio</b>	2.32±0.07 <sup>e</sup>	27.87±0.09 <sup>c</sup>	3.98±0.21 <sup>b</sup>	31.75±0.15 <sup>c</sup>
<b>Control 1</b>	4.08±0.27 <sup>a</sup>	54.55±1.07 <sup>b</sup>	2.86±0.01 <sup>c</sup>	56.96±0.63 <sup>b</sup>
<b>Control 2</b>	3.32±0.07 <sup>b</sup>	52.95±2.29 <sup>b</sup>	4.04±0.04 <sup>b</sup>	56.99±2.32 <sup>b</sup>
<b>UV 1 h</b>	2.78±0.07 <sup>c</sup>	60.23±1.55 <sup>a</sup>	3.34±0.02 <sup>c</sup>	63.61±1.59 <sup>a</sup>
<b>UV 3 h</b>	2.52±0.11 <sup>cd</sup>	52.08±0.54 <sup>b</sup>	3.22±0.20 <sup>c</sup>	55.30±0.73 <sup>b</sup>
<b>UV 12 h</b>	2.42±0.08 <sup>cd</sup>	52.50±1.05 <sup>b</sup>	8.19±0.47 <sup>a</sup>	61.41±1.37 <sup>a</sup>

En tomates rojos, el licopeno total, cuantificado como la suma de los isómeros *cis* y *trans*, incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) en las muestras expuestas a los tratamientos UV-C 1h y 12h con una concentración final de 63.61 y 61.41 mg/Kg de peso fresco, respectivamente. Tras el almacenamiento durante dos días a temperatura ambiente, las muestras control aumentaron el contenido inicial de licopeno total hasta

un 80%, mientras que los tomates expuestos a UV-C 1h y 12h incrementaron su contenido alrededor de un 100% del contenido inicial. Como el *all-trans*-licopeno es el isómero mayoritario (**Tabla 18**), este compuesto aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) tras la exposición a la UV-C durante 1h, desde un valor medio próximo a los 53 mg/Kg en los grupos control (Ciclo día/noche y oscuridad) hasta 60.23 mg/Kg de peso fresco en tomates expuestos durante 1h. Sin embargo, los tomates con mayores dosis de radiación UV-C mostraron valores más reducidos de *all-trans*-licopeno (52.50 mg/Kg de peso fresco). En lo que respecta a los isómeros *cis* del licopeno, la mayor cantidad fue detectada en las muestras tratadas con UV-C durante 12h. También se encontraron diferencias significativas entre las muestras control (Ciclo día/noche y oscuridad) debido probablemente a la bioacumulación de pro-licopeno (7, 9, 7', 9'-*tetracis*-licopeno), un precursor del licopeno que es transformado en el *all-trans*-licopeno por acción de una caroteno isomerasa, proceso favorecido por las condiciones de luz (Pirrello *et al.*, 2009), disminuyendo así el contenido de isómeros *cis* del licopeno en las muestras control 1 (ciclo día/noche). Además, nuestros resultados indican que la exposición a radiaciones UV-C durante largos periodos de tiempo induce la isomerización del licopeno, y por lo tanto, aumentan el contenido de isómeros *cis*. Este aumento significativo provoca un aumento en el contenido en licopeno total tras el tratamiento bajo luz UV-C de los tomates, principalmente cuando fue aplicado por más de 3h, lo cual podría ser considerado como un efecto beneficioso desde un punto de vista nutricional, dado que los *cis*-isómeros del licopeno son mejor absorbidos en el intestino delgado del hombre (Unlu *et al.*, 2007). De la misma forma, también existió un incremento en el contenido de licopeno total en las muestras tratadas durante 1h, pero esta vez debido a un incremento en la cantidad de *all-trans*-licopeno. Estos resultados podrían indicar un posible efecto potenciador de la UV-C en la síntesis del más importante de los carotenoides en el tomate.

En relación al contenido en  $\beta$ -caroteno, también encontramos diferencias significativas entre las muestras control y las tratadas con UV-C (**Tabla 18**). A lo largo del almacenamiento el contenido de este carotenoide aumentó, encontrándose en un intervalo entre 2.32 y 4.08 mg/Kg de peso fresco, siendo este último valor el correspondiente a la muestra Control 1. Esto podría estar relacionado con la síntesis de carotenoides y la conversión del licopeno a  $\beta$ -caroteno mediante enzimas licopeno- $\beta$ -ciclasas, proceso que es estimulado por la luz (Pizarro y Stange, 2009). De forma contraria, los tratamiento con UV-C provocaron una disminución en el  $\beta$ -caroteno, tal y como ocurre cuando es aplicada una alta intensidad de luz (Young, 1993).

En la literatura científica no hay estudios sobre el efecto de la luz UV-C en tomates rojos, únicamente en tomates verdes, estado previo a la maduración. Liu *et al.* (2009) observaron un mayor contenido de licopeno en los tomates sometidos a tratamientos hórnicos ( $13.7 \text{ kJ/m}^2$  durante 5 minutos), observando un incremento de 1.4 a 1.8 veces el contenido en licopeno presente en tomates verdes en los días 15 y 21 de almacenamiento a  $12\text{-}14^\circ\text{C}$ , respectivamente, comparadas con las muestras control almacenadas en oscuridad. Por el contrario, Jagadeesh *et al.* (2009) observaron una disminución en el contenido de licopeno en tomates expuestos a UV-C, almacenados en una cámara refrigerada durante 10, 20 y 30 días y permitiendo su maduración bajo condiciones ambientales (temperatura media:  $23^\circ\text{C}$ ) durante 7 y 14 días.

Las respuestas de frutas y vegetales son dependientes de muchos factores, como el cultivo, el estado de maduración, estado fisiológico y época de recolección (Charles y Arul, 2007). Además, las características del equipamiento, el modo de actuación, la dosis total de UV-C y las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura) durante la post-cosecha también juegan papeles importantes (Shama, 2007; Jagadeesh *et al.*, 2009).

Una vez evaluado y analizado el efecto de los tratamientos UV-C en los principales carotenoides del tomate, se procedió a determinar como podrían afectar dichos tratamientos sobre los contenidos en compuestos fenólicos totales e individuales (**Tabla 19**). Existió un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en estos compuestos bioactivos cuando las muestras fueron irradiadas con UV-C durante periodos superiores a 1h, alcanzando un contenido final incrementado en un 20% aproximadamente. Esto podría ser considerado como un mecanismo de aclimatación del tomate frente al estrés provocado por el tratamiento UV-C que provocó una acumulación de estos compuestos en la fruta. Este efecto positivo en los compuestos fenólicos totales también fue observado en tomates por otros autores como Luthria *et al.* (2006) y Jagadeesh *et al.* (2009). Existe evidencia científica de que los daños en el ADN provocados por la UV-C inducen la acumulación de flavonoides y otros compuestos fenólicos, predominantemente en los tejidos epidérmicos de las frutas. Este efecto es debido a la estimulación de la síntesis de la enzima fenilalanina amoniliasa, clave en la producción de fenilpropanoides, lo cual da lugar a un incremento en fenoles, fitoalexinas y ligninas (Ryalls, 1996).

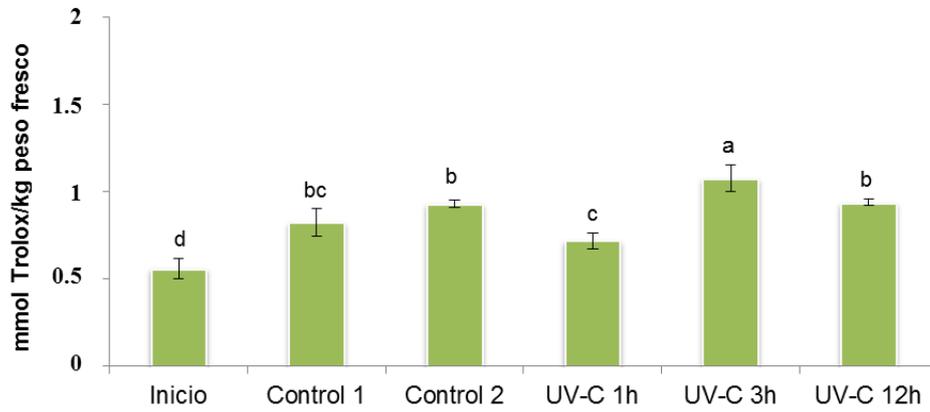
Los resultados en cuanto a los compuestos fenólicos individuales también son presentados en la **Tabla 19**. El ácido clorogénico, la rutina y la naringenina fueron los principales compuestos fenólicos encontrados, ya que ellos son los principales compuestos de esta naturaleza presentes en esta planta (Martínez-Valverde, 2002; García-Valverde *et al.*, 2011). El ácido hidroxicinámico más abundante encontrado en estas muestras fue el ácido clorogénico, variando su concentración entre 16.47 y 30.14 mg/Kg, mostrando la mayor cantidad en los tomates expuestos durante 3h a UV-C. Tanto el ácido clorogénico como el ferúlico son dos compuestos que disminuyen su concentración con la maduración del fruto aunque ambos incrementaron sus valores en un 38% y 18% respectivamente, con respecto a los tratamientos control, cuando las muestras fueron sometidas a tratamientos UV-C de 3h. Por otro lado, tanto la naringenina como la rutina incrementaron con el proceso de maduración aunque parece no existir un efecto claramente estimulador de los tratamientos con UV-C sobre estos compuestos. De hecho, el tratamiento de UV-C 12h provocó su disminución significativa, lo cual apoyaría la teoría sobre la foto-oxidación por la cual un aumento de EROS podría disminuir el contenido de compuestos con actividad antioxidante (Rice-Evans, 1997).

Los resultados de la actividad antioxidante hidrofílica se muestran en la **Figura 22**. Los tomates expuestos durante 3 h a la acción de la luz UV-C son los que mostraron un valor más elevado y estadísticamente significativo que el resto de tratamientos y controles (1.07 mM Trolox/Kg). Estos resultados podrían indicar un efecto positivo de determinadas dosis de luz UV-C sobre tomates rojos en cuanto a la actividad antioxidante hidrofílica. Además, la actividad antioxidante medida mediante el ensayo TEAC fue positivamente correlacionada ( $p < 0.01$ ) con los compuestos fenólicos totales ( $r = 0.767$ ), coincidiendo a su vez con un aumento significativo en la concentración de compuestos fenólicos individuales como el ácido clorogénico y rutina tras la aplicación del tratamiento de luz UV-C durante 3 h, aunque sin una correlación significativa (**Tabla 19**). Estos resultados están de acuerdo con los propuestos por otros estudios donde también se sugiere que la irradiación incrementa el contenido en compuestos fenólicos y actividad antioxidante de endivias, lechugas tipo “iceberg” y “romana” (Fan, 2005), así como un incremento de los compuestos fenólicos en tomates (Jagadeesh *et al.*, 2009).

**Tabla 19.** Concentración de los distintos compuestos fenólicos en tomates rojos. Los compuestos fenólicos totales fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE)/Kg peso fresco, mientras que los compuestos fenólicos individuales como mg/Kg de peso fresco <sup>1</sup>.

Tomates rojos	Inicio	Control 1	Control 2	UV-C 1h	UV-C 3h	UV-C 12h
<b>Compuestos fenólicos totales</b>	145.71±0.92 <sup>bc</sup>	140.99±3.32 <sup>c</sup>	155.71±2.94 <sup>b</sup>	153.85±5.94 <sup>bc</sup>	180.30±1.95 <sup>a</sup>	180.32±0.80 <sup>a</sup>
<b>Ácido clorogénico</b>	28.66±0.79 <sup>b</sup>	21.53±0.22 <sup>c</sup>	21.78±0.56 <sup>c</sup>	19.94±0.09 <sup>d</sup>	30.14±0.12 <sup>a</sup>	16.47±2.28 <sup>e</sup>
<b>Derivados del ácido clorogénico</b>	10.56±0.82 <sup>d</sup>	10.84±0.21 <sup>d</sup>	13.28±0.29 <sup>c</sup>	16.50±0.23 <sup>a</sup>	15.26±0.17 <sup>b</sup>	13.89±0.16 <sup>c</sup>
<b>Ácido ferúlico</b>	1.18±0.05 <sup>a</sup>	0.76±0.01 <sup>cd</sup>	0.70±0.03 <sup>e</sup>	0.88±0.10 <sup>bc</sup>	0.90±0.05 <sup>b</sup>	0.66±0.03 <sup>e</sup>
<b>Derivados del ácido ferúlico</b>	0.72±0.01 <sup>a</sup>	0.37±0.07 <sup>cd</sup>	0.44±0.01 <sup>c</sup>	0.66±0.02 <sup>a</sup>	0.32±0.01 <sup>d</sup>	0.53±0.01 <sup>b</sup>
<b>Naringenina</b>	3.27±0.11 <sup>c</sup>	4.12±0.07 <sup>b</sup>	4.92±0.04 <sup>a</sup>	2.57±0.19 <sup>d</sup>	1.97±0.06 <sup>e</sup>	1.70±0.07 <sup>e</sup>
<b>Derivados de la naringenina</b>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Ácido cafeico</b>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Derivados del ácido cafeico</b>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Rutina</b>	4.36±0.10 <sup>b</sup>	5.07±0.21 <sup>b</sup>	6.15±0.59 <sup>a</sup>	4.32±0.11 <sup>b</sup>	5.99±0.25 <sup>a</sup>	3.43±0.06 <sup>c</sup>
<b>Derivados de la rutina</b>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Ácido coumárico</b>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Derivados del ácido coumárico</b>	1.88±0.11 <sup>cd</sup>	2.10±0.07 <sup>b</sup>	2.02±0.03 <sup>bc</sup>	2.51±0.02 <sup>a</sup>	1.76±0.01 <sup>d</sup>	2.57±0.04 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Los datos se explican como la media ± desviación estándar (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0.05). nd no detectado



**Figura 22.** Ensayo TEAC en tomates rojos, expresado como mMol de Trolox/Kg de peso fresco. Los datos son expresados como la media  $\pm$  DS (n=3). Valores con diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

## **TOMATES VERDES**

La experiencia en tomates verdes se desarrolló posteriormente por lo que se incluyeron algunos análisis con el objetivo de completar y entender aun más el efecto de los tratamientos UV-C sobre la actividad antioxidante en tomate. Las determinaciones llevadas a cabo fueron encaminadas a la determinación de licopeno,  $\beta$ -caroteno, compuestos fenólicos totales e individuales, actividad antioxidante hidrofílica (TEAC y FRAP) y lipofílica (TEAC).

El licopeno total y sus isómeros, *all-trans*-licopeno y *cis*-licopeno (expresado como la suma de los isómeros (5Z)-, (9Z)-, (13Z)- y (15Z)-licopeno), además del contenido en  $\beta$ -caroteno de los tomates verdes sometidos a tratamientos UV-C son mostrados en la **Tabla 20**. El contenido en licopeno total aumentó significativamente en todas las muestras cuando fueron almacenadas durante 8 días a temperatura ambiente. Sin embargo, el incremento fue mayor en aquellas muestras sometidas a la luz ultravioleta, las cuales alcanzaron un contenido hasta 8 veces mayor que el grupo control inicial en muestras sometidas a UV-C 1h y 3h, con valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ). Este efecto está determinado en mayor medida a la síntesis de licopeno asociada al proceso de maduración de los tomates. La acumulación de licopeno en el pericarpo está influenciada por mecanismos tanto dependientes como independientes de la luz que incida sobre el fruto. La ruta de síntesis puede ser estimulada por la luz, aunque la luz no es necesaria para inducirla (Raymundo *et al.*, 1976). Liu *et al.* (2009) encontró que tras el estadio verde inmaduro de los tomates, la luz no es esencial para la activación de la síntesis de licopeno. En nuestro estudio, usamos tomates verdes maduros, esperando que la síntesis de licopeno fuese inducida. Sin embargo, este proceso parece ser estimulado por los tratamientos post-cosecha con UV-C. En cuanto al contenido en licopeno total, se observó cómo los tratamientos con dosis más bajas ejercieron un efecto positivo, siendo todo lo contrario para el tratamiento UV-C 12h. Estos resultados sugieren que un tratamiento hórmino durante un largo periodo de tiempo puede afectar a las enzimas responsables de la síntesis de licopeno, retrasando la formación del color rojo característico de tomates. De hecho, la luz UV induce la oxidación de amino ácidos, reduciendo la funcionalidad de proteínas (Raymundo *et al.*, 1976). Se sugiere también que el licopeno podría estar involucrado en mecanismos de protección del cloroplasto frente a la foto-oxidación provocada por la luz UV, lo cual podría llevar a una degradación de licopeno y clorofilas (Carrasco-Rios, 2009). Los cambios observados en el contenido en licopeno total están altamente influenciados por el efecto de la luz UV-C en el *all-trans*-licopeno,

ya que como se ha comentado anteriormente, es el isómero mayoritario. El contenido en *cis*-licopeno también aumentó en todas las muestras durante el almacenamiento debido a la síntesis de este pigmento, mostrando diferencias significativas en el control 2 y las muestras expuestas a la luz UV-C. Dentro de este grupo, los mayores valores se encontraron en las muestras almacenadas en oscuridad y las expuestas a UV-C 12 h, con valores de incremento próximos al 18%. También existieron diferencias significativas en el contenido de las muestras de los controles 1 (ciclo día/noche) y 2 (oscuridad), las cuales podría estar debidas, al igual que en tomates rojos, a la acumulación de pro-licopeno. Anteriormente ha sido establecido que la luz podría ayudar a este proceso de transformación (Pirrello *et al.*, 2009), disminuyendo así la concentración de los *cis*-isómeros en las muestras de tomate del grupo control 1. A pesar del hecho de que la luz UV pueda aumentar el licopeno total en tomates verdes expuestos durante 1 y 3 h, el porcentaje de isómeros *cis* se mantuvo estable, con valores próximos al 12%. Este porcentaje aumento únicamente en muestras expuestas durante 12 h, lo cual podría estar asociado con una posible foto-isomerización inducida por UV-C, ya que la exposición a la luz puede provocar isomerización del *all-trans*-licopeno (Godwin, 1985).

**Tabla 20.** Contenido de  $\beta$ -Caroteno, *all-trans*-Licopeno, *cis*-Licopeno y Licopeno Total en tomates verdes (expresado como mg/Kg peso fresco).

	<i><math>\beta</math>-Caroteno</i>	<i>all-trans-Licopeno</i>	<i>cis-Licopeno</i>	<i>Licopeno Total</i>
<b>Inicio</b>	0.55±0.01 <sup>d</sup>	5.00±0.19 <sup>c</sup>	1.70±0.13 <sup>c</sup>	6.94±0.10 <sup>d</sup>
<b>Control 1</b>	1.40±0.04 <sup>a</sup>	31.40±1.18 <sup>b</sup>	4.18±0.63 <sup>b</sup>	35.25±1.13 <sup>c</sup>
<b>Control 2</b>	1.23±0.02 <sup>b</sup>	34.20±0.82 <sup>b</sup>	7.81±0.20 <sup>a</sup>	42.02±0.88 <sup>b</sup>
<b>UV 1 h</b>	0.75±0.03 <sup>c</sup>	51.80±2.22 <sup>a</sup>	7.77±0.56 <sup>a</sup>	59.91±1.47 <sup>a</sup>
<b>UV 3 h</b>	0.76±0.03 <sup>c</sup>	55.68±2.23 <sup>a</sup>	7.16±0.36 <sup>a</sup>	63.17±1.90 <sup>a</sup>
<b>UV 12 h</b>	0.79±0.05 <sup>c</sup>	34.56±3.21 <sup>b</sup>	8.00±0.83 <sup>a</sup>	42.56±2.42 <sup>b</sup>

En cuanto al contenido en  $\beta$ -caroteno, fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas entre las muestras control y las tratadas con UV-C (**Tabla 20**). Este carotenoide incrementó su contenido durante el almacenamiento

obteniéndose valores entre 0.75 hasta 1.40 mg/Kg peso fresco, correspondiendo este último al grupo control 1. Este fenómeno podría estar relacionado con la síntesis de carotenoides y la conversión de licopeno a  $\beta$ -caroteno, proceso estimulado por la luz (Pizarro y Stange, 2009). Por esta razón, los tomates verdes maduros madurados bajo el ciclo día/noche (control 1) mostraron un menor contenido en licopeno (35.25 mg/Kg) y una mayor cantidad de  $\beta$ -caroteno. Por otro lado, los tratamientos UV-C disminuyeron su contenido, probablemente debido a un incremento de la síntesis de licopeno causada por activación de las enzimas relacionadas con su ruta de síntesis (por ejemplo, la caroteno isomerasa) o por inhibición de enzimas como la  $\beta$ -ciclasa implicada en la formación de  $\beta$ -caroteno, tal y como ocurre durante el proceso de maduración (van den Berg *et al.*, 2000). Por otra parte, también podría haber ocurrido que la alta intensidad de luz provocara un fenómeno de foto-blanqueamiento y la consecuente destrucción del  $\beta$ -caroteno (Young, 1993), disminuyendo así su contenido en los tomates tratados con UV-C.

En la línea de nuestros resultados, Liu *et al.* (2009) describieron un incremento en el contenido de licopeno total en tomates tras la aplicación de una dosis hórmica de 13.7 kJ/m<sup>2</sup> durante 5 min. En este caso se observó un aumento de 1.4 a 1.8 veces en el contenido en licopeno de tomates verdes maduros en el día 15 y 21 de almacenamiento a 12-14°C, respectivamente, comparados con las muestras control almacenadas en oscuridad. En este estudio se observó también un incremento cercano al 100% tras el tratamiento de los tomates y posterior almacenamiento durante 8 días a temperatura ambiente. Los resultados muestran que el tratamiento UV-C tiene un efecto positivo en la síntesis de licopeno en tomates almacenados a temperatura ambiente y bajo condiciones de refrigeración. Este hecho indicaría que la luz UV-C podría ser un regulador específico de la síntesis y acumulación de carotenoides bajo diferentes condiciones de almacenamiento post-recolección. Por otro lado, nuestros resultados difieren de los encontrados por Jagadeesh *et al.* (2009), quienes encontraron una disminución del contenido en licopeno de tomates tras la exposición a la luz UV-C, y almacenados en una cámara refrigerada durante 10, 20 y 30 días, y permitiendo su maduración bajo condiciones ambientales ( $\approx$ 23°C) por 7 y 14 días. Este trabajo proporciona nueva información relacionada con el efecto de la luz UV-C en los isómeros del licopeno. En general, los distintos efectos de este tipo de tratamiento encontrados en la bibliografía científica deberían ser considerados, ya que las respuestas hórnicas de la fruta dependen de varios factores, como el cultivo, el estado de madurez, el estado fisiológico y la época de recolección (Charles y Arul, 2007).

Los efectos de los tratamientos con UV-C sobre los compuestos fenólicos totales e individuales se presentan en la **Tabla 21**. Si se comparan los resultados de todos los grupos en cuanto a compuestos fenólicos totales, existe un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de estos compuestos bioactivos cuando las muestras fueron irradiadas por periodos superiores a 3 h. El contenido final de estos compuestos alcanzó un incremento del 42% en los tomates expuestos a 12 h de tratamiento UV-C. Estos resultados indican que el tratamiento induce estrés y una posterior acumulación de compuestos fenólicos en la fruta debido a la activación de su ruta de biosíntesis. Resultados similares fueron encontrados por otros autores (Luthria *et al.*, 2006; Jagadeesh *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012) poniendo de manifiesto el efecto positivo de la luz UV sobre los compuestos fenólicos en tomates. Este efecto también ha sido observado en otras frutas como las manzanas (Arakawa, 1988; Bakhshi y Arakawa, 2006), uvas (Cantos *et al.*, 2000; González-Barrio *et al.*, 2009) y mangos (González-Aguilar *et al.*, 2007).

Jagadeesh *et al.* (2009) y Liu *et al.* (2012) encontraron un aumento en el contenido de compuestos fenólicos en tomates tras la aplicación de tratamientos con luz UV-C, pero este efecto no ha sido ampliamente estudiado en los compuestos fenólicos individuales. Algunos autores, como Liu *et al.* (2012), observaron un aumento en algunos de estos compuestos (como el ácido gálico, ácido clorogénico y quercetina) tras al tratamiento de luz UV-C y 35 días de almacenamiento. Durante la investigación, el efecto de dosis hórmicas de luz UV-C en los compuestos fenólicos individuales fue analizado para determinar los cambios en ácidos hidroxicinámicos y flavonoides (**Tabla 21**). En los tomates verdes, el ácido clorogénico puede alcanzar el 75% del total de los compuestos fenólicos (García-Valverde *et al.*, 2011). Este porcentaje disminuye durante la maduración del fruto, debido al efecto mismo de la maduración (Carrillo-López y Yahia, 2009; García-Valverde *et al.*, 2011). Por esta razón, el contenido de ácido clorogénico disminuyó en los controles maduros y los tratados con luz UV-C en comparación con el control inmaduro inicial. En concreto, los tomates almacenados en oscuridad y los expuestos a una hora de luz UV-C mostraron la mitad de la concentración que el grupo control inicial, valores significativamente más altos que el resto de tratamientos. El efecto de la oscuridad sobre el ácido clorogénico podría explicarse dado que la oscuridad es reconocida como una de las condiciones de almacenamiento que protege frente a la degradación de los compuestos fenólicos durante la maduración. La principal causa de este fenómeno es que la luz puede provocar fenómenos de foto-oxidación mediante la generación de EROS (Foyer *et al.*, 1994) y consecuente degradación de compuestos fenólicos. Las diferencias en el

contenido entre los distintos tratamiento UV-C podría ser atribuido al efecto del estrés provocado por la luz UV-C sobre las enzimas de la ruta de los fenilpropanoides, tal y como se ha descrito anteriormente. Los derivados del ácido clorogénico también disminuyeron con la maduración, aunque existe un incremento significativo cuando el tratamiento UV-C 1 h fue aplicado. De esta manera, la concentración aumento desde 0.66 mg/Kg (ciclo día/noche) hasta 3.25 mg/Kg, no siendo detectados ningún derivado de este ácido en los grupos de oscuridad, UV-C 3 h y 12 h. No parece existir por tanto un efecto claro de la radiación UV-C para el resto de compuestos fenólicos individuales.

El uso de la luz UV-C parece presentar un efecto potenciador tanto en compuestos fenólicos totales como en la capacidad antioxidante, pero este efecto parece no estar muy claro en todos los compuestos fenólicos analizados. Los compuestos fenólicos individuales han sido determinados usando el método de Folin-Ciocalteu, y es conocido que este método puede sobrestimar el total de los compuestos fenólicos debido a su baja especificidad y porque es influenciado por interferencia de otros compuestos como el ácido ascórbico, sulfitos y aminoácidos (Singleton *et al.*, 1974). En este estudio, la hidrólisis de las muestras para la determinación de estos compuestos favorecería la eliminación de este tipo de sustancias capaces de interferir en la determinación, evitando así la sobrestimación. La metodología usada para determinar los compuestos fenólicos individuales ofrece información sobre los principales compuestos fenólicos y algunos derivados, aunque no permite la identificación y cuantificación de todos ellos. Así pues, el efecto de la radiación UV-C sobre los compuestos fenólicos individuales no puede ser determinada de una forma clara. Además, se ha encontrado que los compuestos fenólicos localizados en aquellos tejidos vegetales expuestos a la luz UV pueden cambiar su forma química debido a la sobre-expresión de diferentes enzimas relacionadas con el metabolismo de estos metabolitos secundarios (Carrasco-Rios. 2009), aumentando de esta forma la dificultad del procedimiento analítico.

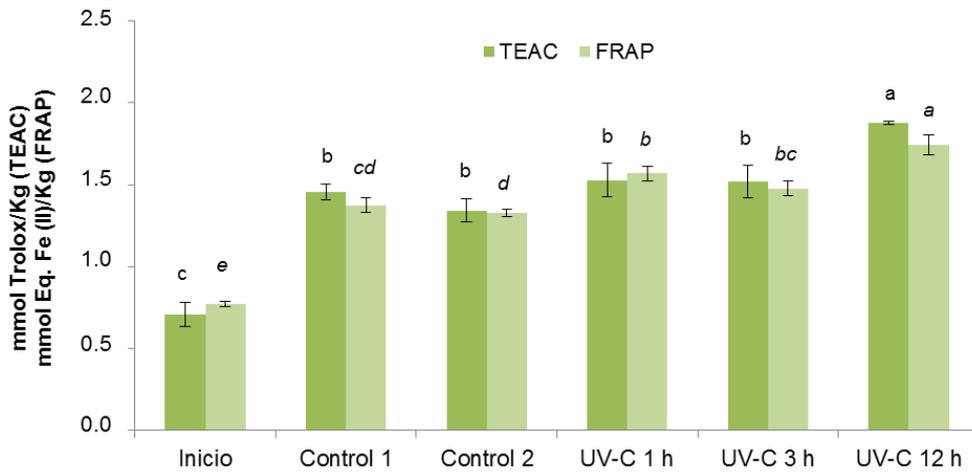
**Tabla 21.** Concentración de los distintos compuestos fenólicos en tomates verdes. Los compuestos fenólicos totales fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE)/Kg de peso fresco, mientras que los compuestos fenólicos individuales como mg/Kg de peso fresco<sup>1</sup>.

Tomates verdes	Inicio	Control 1	Control 2	UV-C 1 h	UV-C 3 h	UV-C 12 h
<b>Compuestos fenólicos totales</b>	258.75±18.04 <sup>b</sup>	244.45±29.79 <sup>b</sup>	238.02±11.06 <sup>b</sup>	233.73±5.39 <sup>b</sup>	222.83±26.88 <sup>b</sup>	366.45±16.32 <sup>a</sup>
<b>Ácido clorogénico</b>	23.91±0.48 <sup>a</sup>	2.22±0.75 <sup>e</sup>	10.24±0.07 <sup>b</sup>	10.35±0.23 <sup>b</sup>	4.17±0.43 <sup>c</sup>	3.27±0.23 <sup>d</sup>
<b>Derivados del ácido clorogénico</b>	5.90±0.02 <sup>a</sup>	0.66±0.03 <sup>c</sup>	nd	3.25±0.12 <sup>b</sup>	nd	nd
<b>Ácido ferúlico</b>	0.87±0.11 <sup>b</sup>	0.82±0.05 <sup>b</sup>	0.60±0.02 <sup>d</sup>	1.41±0.07 <sup>a</sup>	0.62±0.03 <sup>cd</sup>	0.81±0.09 <sup>bc</sup>
<b>Derivados del ácido ferúlico</b>	0.56±0.06 <sup>a</sup>	0.65±0.11 <sup>a</sup>	0.44±0.01 <sup>a</sup>	nd	0.49±0.15 <sup>a</sup>	nd
<b>Naringenina</b>	0.32±0.03 <sup>a</sup>	0.32±0.02 <sup>a</sup>	0.19±0.09 <sup>bc</sup>	0.22±0.02 <sup>ab</sup>	0.08±0.01 <sup>c</sup>	nd
<b>Derivados de la naringenina</b>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Ácido cafeico</b>	nd	nd	nd	0.32±0.02	nd	nd
<b>Derivados del ácido cafeico</b>	nd	nd	0.57±0.07 <sup>c</sup>	1.04±0.03 <sup>a</sup>	0.8±0.09 <sup>b</sup>	nd
<b>Rutina</b>	1.78±0.07 <sup>ab</sup>	1.16±0.22 <sup>c</sup>	2.08±0.19 <sup>a</sup>	1.43±0.05 <sup>bc</sup>	1.84±0.09 <sup>ab</sup>	1.6±0.26 <sup>bc</sup>
<b>Derivados de la rutina</b>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Ácido coumárico</b>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Derivados del ácido coumárico</b>	1.53±0.04 <sup>a</sup>	nd	0.34±0.01 <sup>c</sup>	0.46±0.02 <sup>b</sup>	0.06±0.00 <sup>d</sup>	nd

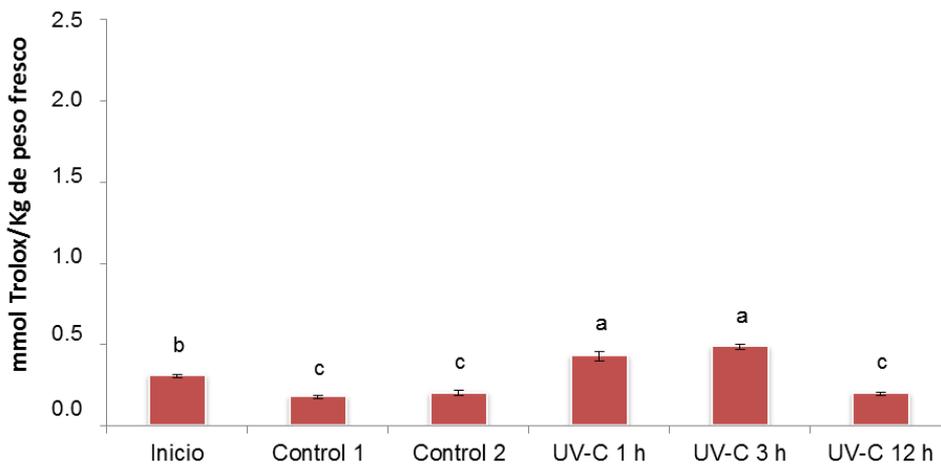
<sup>1</sup>Los datos se explican como la media ± desviación estándar (n=3). Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0.05). nd no detectad

Por último, los datos obtenidos para los ensayos FRAP y TEAC hidrofílico y TEAC lipofílico se muestran en las **Figuras 23 y 24**, respectivamente. La AA hidrofílica de las muestras de tomate mostró el mismo comportamiento tras la exposición a la luz UV-C, alcanzando los mayores valores cuando el tratamiento de 12 h fue aplicado (1.74 mmol Eq. Fe (II)/Kg y 1.88 mmol Trolox/Kg para el FRAP y TEAC respectivamente). El análisis de correlaciones también estableció una correlación significativa y positiva ( $r=0.877$ ,  $p<0.05$ ) entre estos análisis. Los resultados indican por lo tanto un efecto positivo de la luz UV-C en la AA hidrofílica, hallazgos realizados por otros autores, en el caso también de los tomates (Liu *et al.*, 2012), y otras frutas como mangos (González-Aguilar *et al.*, 2007) y arándanos (Perkins-Veazie *et al.*, 2008). Este efecto podría explicarse por el incremento de compuestos fenólicos y flavonoides totales (Carrillo-López y Yahia, 2009) tal y como podría demostrar las correlaciones significativas y positivas encontradas entre el FRAP y TEAC con los compuestos fenólicos totales ( $r=0.729$  y  $0.826$ , respectivamente). Por otro lado, la actividad antioxidante lipofílica de los tomates verdes inmaduros mostró los mayores valores tras los tratamientos UV-C de 1 y 3 h (0.43 y 0.48 mmol Trolox/Kg, respectivamente). La correlación entre el contenido en licopeno y la AA lipofílica también resultó significativa y positiva ( $r=0.985$ ,  $p<0.05$ ). De esta forma, la AA lipofílica en tomates podría estar altamente determinada por el contenido en licopeno, componente lipofílico mayoritario. También fueron encontrados altos niveles de AA lipofílica en el control inicial (0.31 mmol Trolox/Kg), debido probablemente a la mayor concentración de clorofilas, las cuales son reconocidas por presentar propiedades antioxidantes lipofílicas. Aunque las clorofilas no son consideradas como antioxidantes dietéticos, podrían contribuir a la actividad antioxidante *in vitro* de vegetales, incluyendo los tomates (Hunter y Flecher, 2002; Periago *et al.*, 2009).

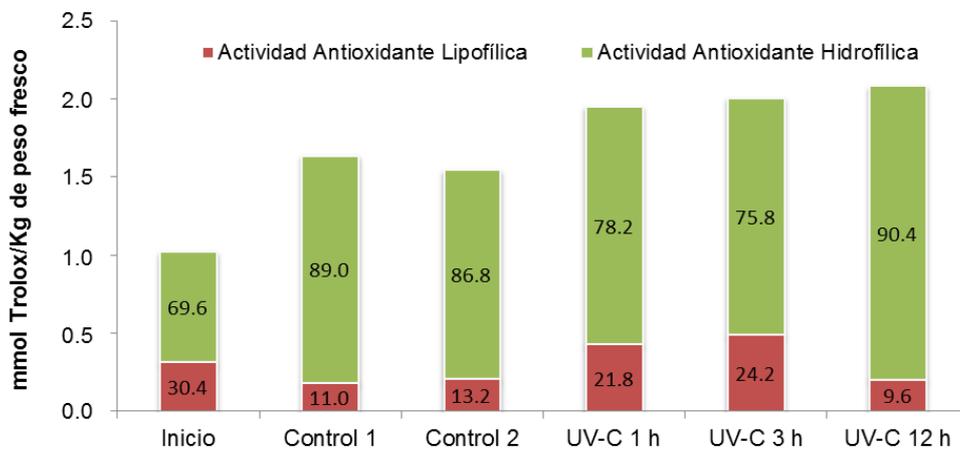
La contribución a la AA de cada tipo de actividad antioxidante, hidrofílica y lipofílica se resumen en la **Figura 25**. Los tratamientos de luz UV-C 1 y 3 h mostraron los mayores valores de AA lipofílica, superiores incluso que al tratamiento de 12 h, hecho que podría estar relacionado con el incremento del contenido total de licopeno. La AA de tomates tratados con UV-C 12 h se mantuvo igual que la de tomates tratados con los tratamientos más cortos, sin embargo, la proporción de las AA hidrofílica y lipofílica fue diferente. En este caso, un incremento de los compuestos fenólicos y la disminución del licopeno total, podría causar las variaciones en la AA, tal y como se ha descrito anteriormente.



**Figura 23.** Actividad antioxidante hidrofílica representada mediante el ensayo TEAC (valores expresados en mmol Trolox/Kg de peso fresco) y FRAP (valores expresados como mmol Eq. Fe (II)/Kg de peso fresco). Los datos son mostrados como la media  $\pm$  la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran valores con diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ).



**Figura 24.** Actividad antioxidante lipofílica representada mediante el ensayo TEAC. Los datos son mostrados como la media  $\pm$  la desviación estándar (n=3). Diferentes letras muestran valores con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 25.** Contribución relativa de la fracción hidrosoluble y liposoluble a la actividad antioxidante total de los extractos de tomate. Los valores en el interior de las columnas expresan porcentajes.

## EXPERIENCIA 2: EVOLUCIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Con el objetivo de identificar y correlacionar aquellos parámetros que pudiesen influir en la evolución de los compuestos bioactivos del tomate durante el almacenamiento, se procedió al análisis de pH, acidez titulable y sólidos solubles de zumos de tomate envasados en tetrabrik y en cristal, cuyos resultados son mostrados en la **Tabla 22**. Para ambos tipos de muestras, los parámetros evaluados se mostraron muy estables a lo largo de todo el experimento. Por esta razón únicamente se muestran el inicio, 6 y 12 meses de la experiencia.

**Tabla 22.** Cambios en el pH, Acidez titulable (% de ácido cítrico) y Sólidos solubles (°Brix) de zumos almacenados a temperaturas diferentes.

<i>Tiempo</i>	<i>Tetrabrik</i>			<i>Botella de cristal</i>		
	8°C	22°C	37°C	8°C	22°C	37°C
<b>pH</b>						
0 meses	–	3.93	–	–	3.93	–
6 meses	4.01	4.01	3.99	4.01	4.01	3.97
12 meses	4.00	4.00	3.97	3.99	3.99	3.94
<b>Acidez titulable</b>						
0 meses	–	0.406	–	–	0.452	–
6 meses	0.407	0.417	0.421	0.443	0.442	0.439
12 meses	0.427	0.423	0.418	0.418	0.454	0.425
<b>Sólidos solubles</b>						
0 meses	–	5.37	–	–	5.76	–
6 meses	5.40	5.39	5.36	5.4	5.69	5.86
12 meses	5.27	5.28	5.26	5.27	5.80	5.73

Las **Tablas 23 y 24** muestran la evolución del contenido en licopeno total y los niveles de isomerización *cis* en zumos de tomate envasados en tetrabrik y botella de cristal y diferenciando entre tres temperaturas de almacenamiento (8,22 y 37°C). Tal y como muestra la **Tabla 23**, el contenido en licopeno total se mantuvo relativamente estable a lo largo de los 12 meses de almacenamiento variando entre 99 y 120 mg/Kg en zumos de tomate envasados en tetrabrik y desde 96 a 115 mg/Kg en zumos envasados en botella de cristal. Para ambos tipos de muestras no parece existir un efecto claro de la temperatura tal y como se reveló en el análisis estadístico relacionado con el ritmo de pérdida de licopeno total [ $p > 0.05$  (**Tabla 25**)], el cual estuvo únicamente afectado por el tiempo de almacenamiento [ $p < 0.05$  (**Tabla 25**)]. Al final del tiempo de almacenamiento las pérdidas en el contenido de licopeno total variaron entre un 11 y un 17%, y entre un 7 y 15% en muestras envasadas en tetrabrik y cristal respectivamente.

El contenido en licopeno observado en las muestras fue similar a los valores encontrados por otros investigadores (Lin y Chen 2005; Sánchez-Moreno *et al.*, 2006; Odriozola-Serrano *et al.*, 2008; Ordóñez-Santos *et al.*, 2009; Pérez-Conesa *et al.*, 2009). Cabe señalar que las ligeras diferencias observadas en el contenido de licopeno entre zumos al comienzo del estudio se deben a la variabilidad del puré de tomate (obtenido mediante proceso *hot break*) utilizado como materia prima para la elaboración de cada tipo de zumo. En las muestras, el *all-trans*-licopeno fue el principal isómero detectado, alcanzando alrededor del 90% del contenido de licopeno total. Por otro lado, fueron identificados tres isómeros *cis* del licopeno: 13-*cis*-licopeno, 15-*cis*-licopeno y el 9-*cis*-licopeno. Este perfil de isómeros de licopeno es consistente con lo observado por otros autores en diferentes productos derivados del tomate, alcanzando el *all-trans*-licopeno valores alrededor del 80% y siendo los isómeros 13 -, 15 -, y 9-*cis*-licopeno los principales isómeros *cis* detectados.

Tabla 23. Evolución del contenido en licopeno total (*cis* + *trans*) durante el almacenamiento a diferentes temperaturas en dos tipos de envases.

Tiempo	Tetrabrik			Botella de Cristal		
	8°C	22°C	37°C	8°C	22°C	37°C
0 meses		118.97±1.68 a			113.71±2.53 a	
2 meses	120.79±2.20 a	116.22±1.17 a	111.65±8.31 a	113.37±9.58 a	107.16±3.82 a	113.98±0.75 a
4 meses	114.48±3.36 a	112.70±6.07 a	112.00±4.61 a	114.76±6.59 a	111.81±5.81 a	114.54±3.80 a
6 meses	114.55±6.38 a	114.02±6.28 a	112.36±10.27 a	115.32±5.13 a	114.57±0.88 a	110.20±4.64 a
8 meses	115.45±6.20 a	111.56±4.38 a	111.90±5.37 a	104.70±4.96 a	108.85±4.09 a	111.54±1.67 a
10 meses	117.91±2.09 a	111.36±3.52 a	105.83±7.32 a	101.00±4.27 a	109.14±3.16 a	112.85±1.07 a
12 meses	100.82±0.55 a	105.68±5.01 a	99.10±4.53 b	103.82±3.34 a	105.49±1.79 a	96.04±7.12 b

Tabla 24. Cambios en los porcentajes de isomerización *cis* en zumos de tomate almacenados en Tetra pack y botellas de cristal durante 12 meses.

Tiempo	Tetrabrik			Botella de Cristal		
	8°C	22°C	37°C	8°C	22°C	37°C
0 meses		4.69±0.07 b			3.80±0.25 b	
2 meses	5.03±0.92 b	4.22±0.37 b	5.57±0.13 b	5.10±0.66 b	4.09±0.12 b	4.09±0.12 b
4 meses	6.30±0.16 b	6.64±0.94 b	6.36±1.55 b	5.09 ±0.88 ab	4.73±1.21 b	4.52±0.66 ab
6 meses	6.25±0.47 b	6.49±0.24 b	6.35±0.03 b	4.84±0.34 ab	4.83±0.57 b	4.03±0.57 b
8 meses	6.31±0.42 b	6.10±0.70 b	6.31±0.32 b	5.17±1.25 ab	4.49±0.70 b	4.46±0.94 b
10 meses	5.76±0.73 b	6.27±0.65 b	6.83±0.49 b	7.58±0.72 ab	4.17±0.36 b	5.39±0.32 b
12 meses	10.06±1.28 a	11.98±2.34 a	11.93±0.92 a	6.23±0.64 a	6.04±1.36 b	6.70±2.16 b

**Tabla 25.** Valores de significancia para cada factor obtenidos en una ANOVA de dos factores mediante el uso de un modelo lineal general.

<b>Variable</b>	<b>Tiempo</b>		<b>Temperatura</b>		<b>Tiempo x Temperatura</b>	
	<i>Tetrabrik</i>	<i>Cristal</i>	<i>Tetrabrik</i>	<i>Cristal</i>	<i>Tetrabrik</i>	<i>Cristal</i>
<b>Licopeno total</b>	0.000	0.009	0.094	0.912	0.782	0.400
<b><i>all-trans</i>-licopeno</b>	0.000	0.001	0.094	0.723	0.782	0.252
<b><i>cis</i>-licopeno</b>	0.000	0.002	0.814	0.135	0.730	0.642
<b>% isómeros <i>cis</i></b>	0.000	0.001	0.235	0.078	0.630	0.251
<b>Comp. fenólicos</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>Flavonoides</b>	0.000	0.008	0.329	0.260	0.398	0.131
<b>AA hidrofílica</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>AA lipofílica</b>	0.570	0.024	0.495	0.469	1.000	0.850
<b>Ác. ascórbico <sup>a</sup></b>	0.000	–	0.000	–	0.000	–

<sup>a</sup> El ácido ascórbico no fue detectado en las muestras almacenadas en envase de cristal

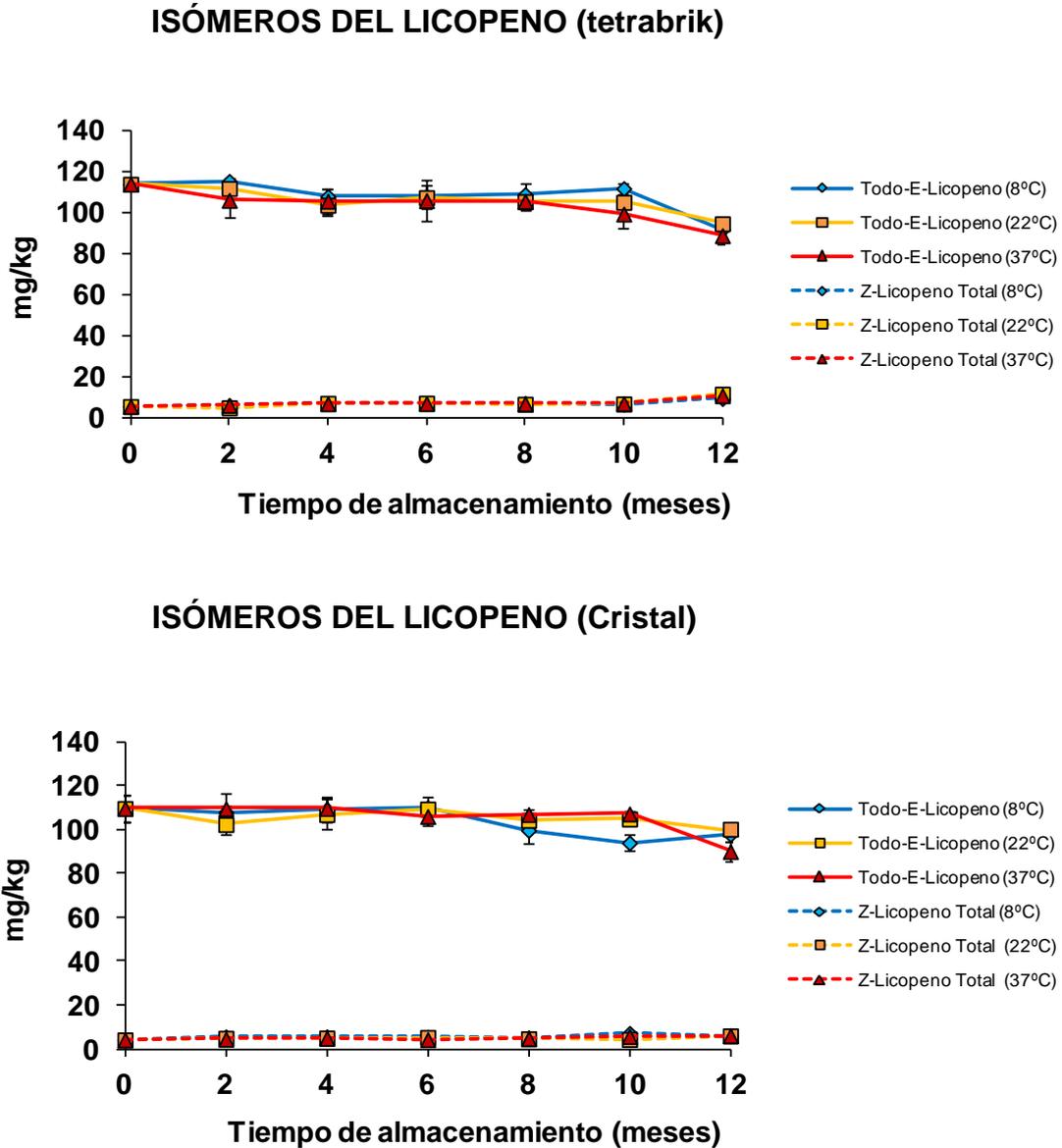
En este experimento la estabilidad del licopeno fue mayor que la encontrada por otros autores, obteniendo pérdidas que nunca superaron el 20% del contenido en licopeno total. Por ejemplo, Odriozola-Serrano *et al.* (2008) observaron pérdidas finales de un 70% aproximadamente en zumos de tomate almacenados a 4°C durante tres meses en botellas de polipropileno. De forma similar, en zumos de tomate estabilizados térmicamente o procesados mediante campos de pulso eléctrico, Min *et al.* (2003) encontraron pérdidas en el contenido en licopeno entre el 60-65% después de almacenar las muestras durante 3.7 meses a 4°C en envases de polipropileno. Por otra parte, Lin y Chen, (2005), observaron pérdidas del 65% aproximadamente en el contenido de licopeno en zumo de tomate enlatado almacenado a las temperaturas de 4,25 y 37°C durante 3 meses, y pérdidas cercanas al 75% cuando los zumos fueron almacenados en envases de cristal (independiente de la exposición a la luz). Además, similares patrones de degradación de licopeno (37-75%) han sido observados durante el almacenamiento de pasta de tomate (Giovanelli y Paradiso, 2002). Por otro lado, y en la línea de nuestras investigaciones, Ordoñez-Santos *et al.* (2009) analizaron la estabilidad del licopeno en pulpa de tomate almacenada a 20°C, aunque debido a su periodo de almacenamiento, el cual no sobrepasó los 3 meses, los resultados no son comparables. La mayor estabilidad de licopeno observada en nuestro estudio puede deberse a la presencia y estabilidad de otros componentes antioxidantes tales como los compuestos fenólicos y/o por la inactivación térmica de enzimas oxidantes durante

el procesado del tomate, tal y como sugieren otros investigadores (Takeoka *et al.*, 2001; Sánchez-Moreno *et al.*, 2006; Ordoñez-Santos *et al.*, 2009).

La **Figura 26** muestra las variaciones en el contenido del *all-trans*-licopeno y *cis*-licopeno total en muestras almacenadas durante 12 meses a tres temperaturas distintas (8,22 y 37°C). Como se puede ver en la figura, el contenido en del isómero mayoritario, *all-trans*-licopeno, disminuyó ligeramente hacia el final del periodo de almacenamiento en función del tiempo [ $p < 0.05$  (**Tabla 25**)]. El contenido de este isómero varió a lo largo de todo el periodo de almacenamiento entre 88 y 115 mg/Kg en las muestras envasadas en tetrabrik y desde 90 a 110 mg/Kg en muestras envasadas en cristal. Por otro lado, el contenido total de *cis*-licopeno incrementó ligeramente, siendo la variable tiempo la que afectó significativamente a su concentración [ $p < 0.05$  (**Tabla 25**)] en ambos tipos de envases, variando desde 5-11 mg/Kg en tetrabrik y entre 4-7 mg/Kg en cristal. En la **Tabla 24** se puede observar como incrementó ligeramente el porcentaje de isomerización *cis* con el tiempo de almacenamiento [ $p < 0.05$  (**Tabla 25**)] en ambos tipos de muestras aunque siempre por debajo del 12%.

En este estudio, hemos prestado especial atención a la isomerización del licopeno, ya que algunos estudios en humanos han puesto de manifiesto los beneficios del consumo de tomate con un incremento en la concentración de isómeros *cis*-licopeno, los cuales, al parecer son mejor absorbidos en el intestino (Boileau *et al.*, 1999; Unlu *et al.*, 2007; Failla *et al.*, 2008) además de presentar una mayor actividad antioxidante que la forma *trans* (Böhm *et al.*, 2002). En nuestro estudio se observó hacia el final del periodo de almacenamiento un ligero aumento del contenido en isómeros *cis* del licopeno, acompañado de un ligero descenso en la concentración del *all-trans*-licopeno. Estos resultados están de acuerdo con los presentados por Lin y Chen, (2005), quienes observaron un aumento de los isómeros *cis*, particularmente 9-*cis* y 13-*cis*, en el almacenamiento de zumos de tomate durante 3 meses. Curiosamente también se vio acompañado por una disminución en el contenido del *all-trans*-licopeno. La explicación dada por estos investigadores a este fenómeno fue que la isomerización es un factor importante que conduce a la pérdida de licopeno durante el almacenamiento. Esto ocurre porque el *all-trans*-licopeno puede ser convertido a 13-*cis*-licopeno, y este, posteriormente, en otros isómeros *cis*. Esto podría explicar los cambios observados en nuestro estudio en relación a la isomerización *cis* del licopeno y las pérdidas de *all-trans*-licopeno hacia el final del experimento. No obstante, la *Z*-isomerización es un fenómeno extremadamente complicado y puede variar

dependiendo de las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura), humedad y acidez del producto (Lin y Chen, 2005).



**Figura 26.** Evolución en el contenido de *all-trans*-licopeno y *cis*-licopeno total durante el almacenamiento de 12 meses del zumo de tomate.

Aunque en nuestro estudio las condiciones de almacenamiento incrementaron el grado de isomerización del licopeno, el porcentaje de isómeros *cis* se mantuvo por debajo del 12% durante todo el estudio. Esta cantidad de isómeros *cis*-licopeno está dentro del intervalo observado por otros autores, generalmente entre el 5 y el 20%

para el tomate y productos derivados (Schierle *et al.*, 1997; Porrini *et al.*, 1998; Lin y Chen, 2005). Por lo tanto, no hay ventajas nutricionales adicionales en el consumo de los zumos. Únicamente la ingesta de productos derivados del tomate que contienen más del 40% en forma de isómeros *cis* parece tener un efecto claro en la mejora de la absorción (Unlu *et al.*, 2007; Failla *et al.*, 2008).

La **Figura 27 y 28** muestra los cambios en el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales siguiendo los mismos criterios de almacenamiento. En ambos tipos de zumos estos dos parámetros se mantuvieron virtualmente constantes, aunque el análisis estadístico reveló que los compuestos fenólicos totales estuvieron influidos tanto por el tiempo como por la temperatura de almacenamiento [ $p < 0.05$  (**Tabla 25**)], mientras que el contenido en flavonoides solo estuvo determinado por el tiempo de almacenamiento [ $p < 0.05$  (**Tabla 25**)]. En relación al zumo envasado en tetrabrik, los compuestos fenólicos totales variaron en un rango entre 260-300 mg GAE/Kg y los flavonoides totales entre 98-108 mg de CE/Kg. Niveles muy similares fueron encontrados en los zumos envasados en botellas de cristal, variando entre 240-285 mg de GAE/Kg el contenido en compuestos fenólicos totales y entre 100-107 mg de CE/Kg el de flavonoides totales.

El contenido en compuestos fenólicos totales determinado en las muestras analizadas se mantiene en el intervalo observado por otros autores en tomates y productos derivados (100-500 mg/Kg) (Dewanto *et al.*, 2002; Martínez-Valverde *et al.*, 2002; Gahler *et al.*, 2003; Odriozola-Serrano *et al.*, 2008; Pérez-Conesa *et al.*, 2009). De forma similar ocurre con los flavonoides, variando el contenido de estudios previos entre 2-200 mg/Kg (Dewanto *et al.* 2002; Martínez-Valverde *et al.* 2002). En general, los compuestos fenólicos se mantuvieron estables a lo largo del estudio, aunque un ligero incremento tuvo lugar en las muestras envasadas en tetrabrik almacenadas a 37°C y después de los 8 meses de almacenamiento. Los compuestos fenólicos presentes en zumo de tomate son bastante estables durante el almacenamiento a 4°C durante 3 meses (Odriozola-Serrano *et al.*, 2008), ocurriendo de la misma manera en el almacenamiento de pulpa de tomate a 4 y 20°C durante 3 y 5 meses (Giovanelli y Paradiso, 2002). Además, Giovanelli y Paradiso (2002) también observaron un aumento en el contenido en compuestos fenólicos cuando las muestras de pulpa de tomate fueron almacenadas a 37°C, y los investigadores asumieron que este fenómeno fue debido, no a un incremento real de los compuestos fenólicos, sino al hecho de que los productos de las reacciones de Maillard generados como consecuencia del procesado, eran capaces de reaccionar con el reactivo de Folin-

Ciocalteu. Esta explicación podría atribuirse también al incremento encontrado en las muestras de zumo de tomate almacenadas a 37°C, aunque no debería descartarse la posibilidad de que este incremento pudiera deberse a un aumento en la liberación de los compuestos fenólicos desde la matriz debido al tiempo y temperatura de almacenamiento. Además de los productos de Maillard, el ácido ascórbico también puede interferir con el reactivo de Folin-Ciocalteu, dando lugar a una sobrestimación en el contenido de compuestos fenólicos. Sin embargo, estudios previos han demostrado que el ácido ascórbico es completamente degradado durante la hidrólisis de las muestras de tomate que tiene lugar previamente a la determinación de los compuestos fenólicos (datos no mostrados).

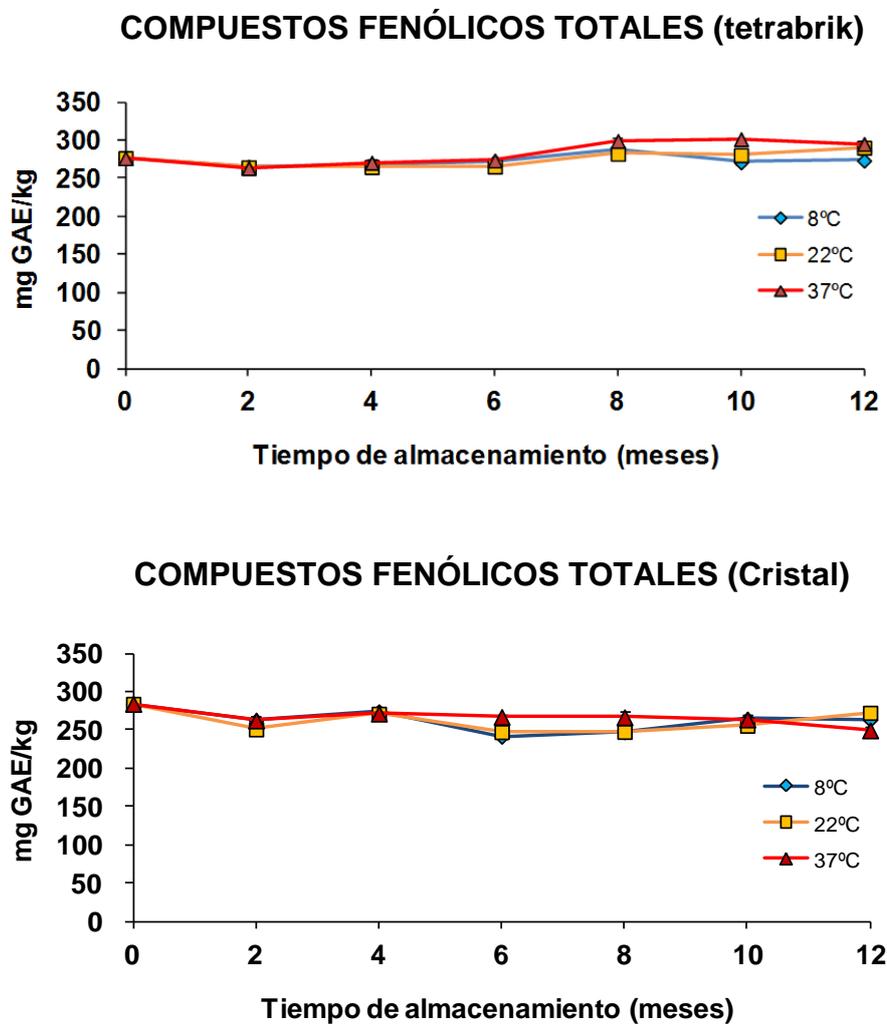
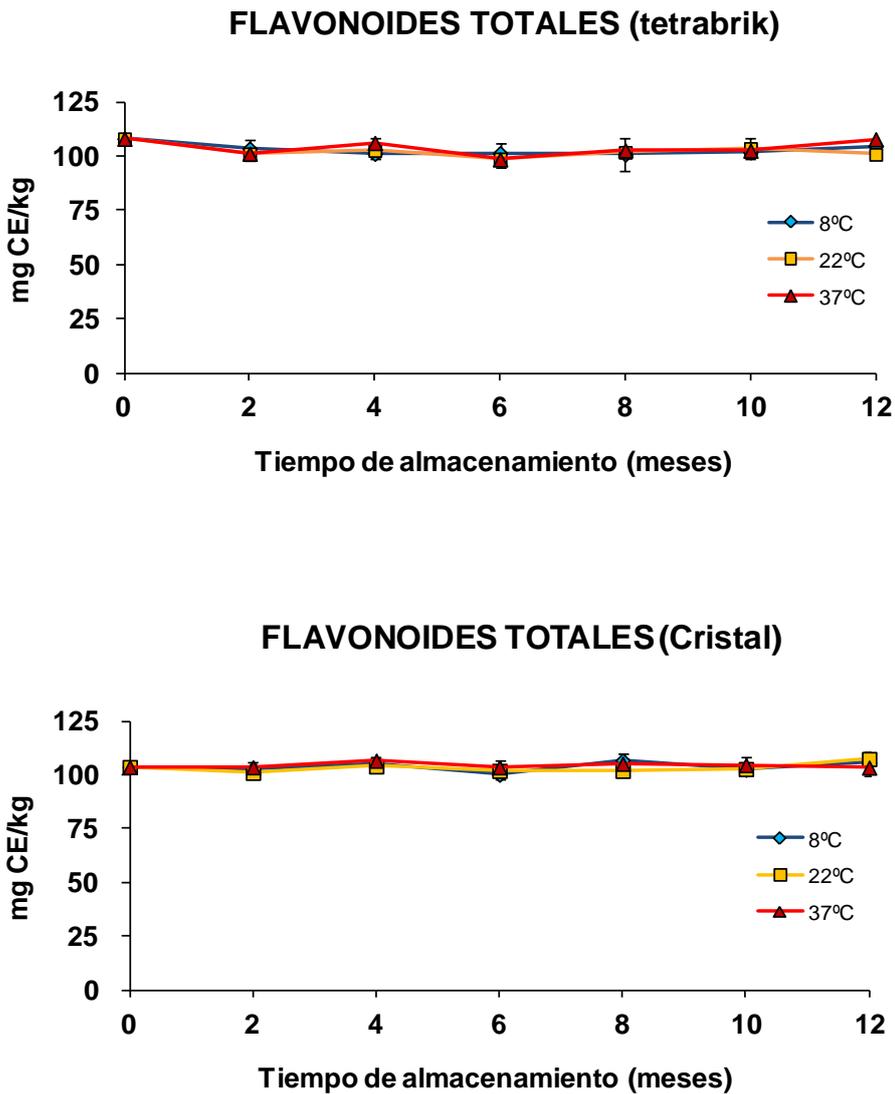


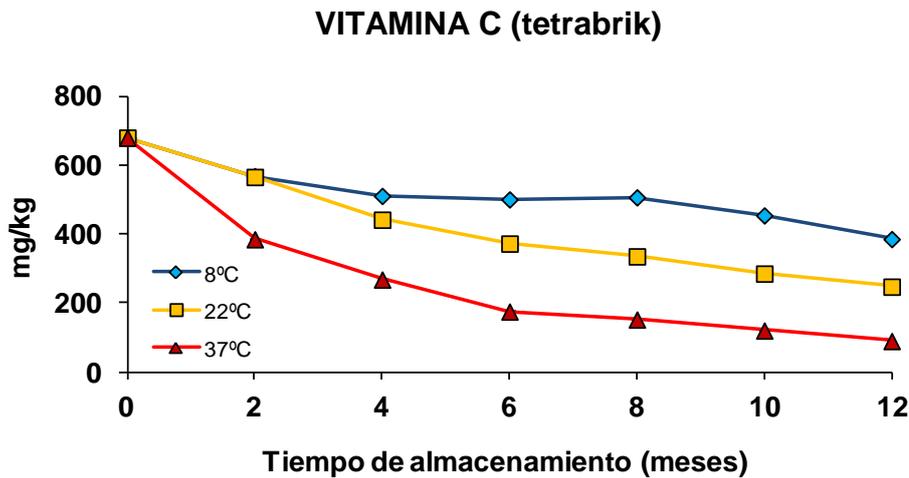
Figura 27. Evolución en el contenido de compuestos fenólicos totales durante el almacenamiento durante 12 meses de zumo de tomate.



**Figura 28.** Evolución en el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales durante el almacenamiento durante 12 meses de zumo de tomate.

En la **Figura 29** se destaca la evolución de la vitamina C bajo las mismas condiciones de almacenamiento, envasado y temperatura. La concentración inicial de ácido ascórbico en zumos de tomate envasados en tetrabrik fue de 680 mg/Kg. Sin embargo, no se detectó esta vitamina en los zumos envasados en botellas de cristal. Es importante señalar que en el caso de los zumos envasados en tetrabrik la vitamina C fue adicionada como un ingrediente, hecho que fue reflejado en su etiqueta. En el gráfico se observa como el contenido en ácido ascórbico disminuye en función del tiempo y la temperatura [ $p < 0.05$  (**Tabla 25**)], teniendo lugar las mayores pérdidas

cuando las muestras fueron almacenadas a 37°C, disminuyendo su contenido aproximadamente un 50% tras dos meses de almacenamiento. Sin embargo, estas pérdidas de hasta el 50% no se observaron hasta el 8 y 12 mes de almacenamiento para muestras mantenidas a 22 y 8°C respectivamente.



**Figura 29.** Evolución en el contenido de vitamina C en zumo de tomate durante 12 meses de almacenamiento.

El ácido ascórbico es un compuesto reactivo, y es particularmente vulnerable al procesado y las condiciones de almacenamiento. Aunque el ácido ascórbico es un antioxidante natural presente en tomates (Martínez-Valverde *et al.* 2002; Periago *et al.*, 2009) el tratamiento térmico aplicado durante el procesado de los zumos provoca una degradación total del mismo, ya que no fue encontrado resto alguno de ácido ascórbico en las muestras de zumo envasadas en botella de cristal. En relación a las muestras envasadas en tetrabrik, a las cuales se les adicionó ácido ascórbico, los datos confirmaron la disminución provocada por las condiciones de almacenamiento. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores (Min *et al.*, 2003; Odriozola-Serrano *et al.*, 2008; Ordoñez-Santos *et al.*, 2009). Se ha sugerido que el ácido ascórbico y otros antioxidantes, como los compuestos fenólicos, podrían ayudar a prevenir la oxidación de otros componentes como el licopeno durante el almacenamiento (Takeoka *et al.*, 2001; Sánchez-Moreno *et al.*, 2006). Sin embargo, en base a estos resultados parece que el ácido ascórbico juega un papel minoritario en

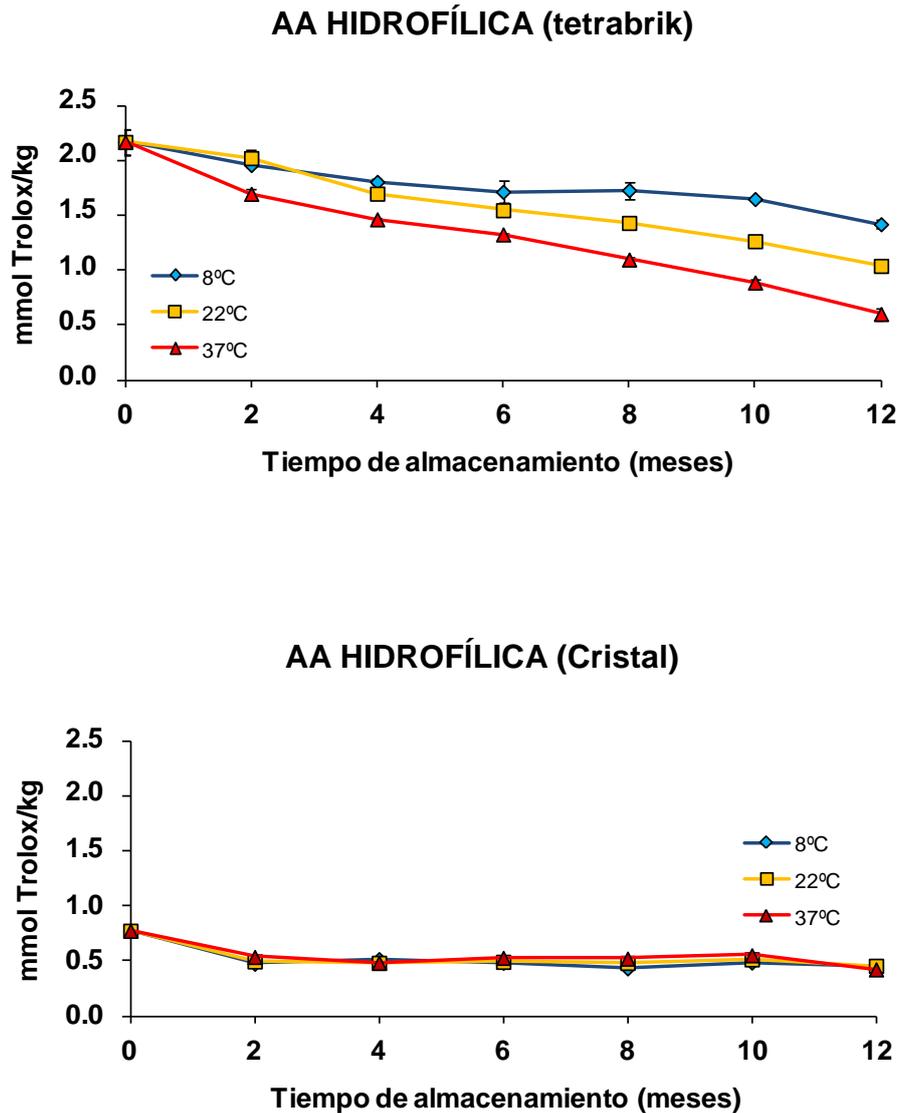
este efecto preventivo, conclusión obtenida a partir de el hecho de que el licopeno se mantuvo igualmente estable en muestras envasadas en tetrabrik y cristal, independiente del ácido ascórbico añadido en la formulación de los zumos. Así pues como los compuestos fenólicos (compuestos fenólicos totales y flavonoides) apenas sufrieron cambios durante el almacenamiento, es razonable asumir que estos compuestos desempeñan un papel importante en la prevención de las pérdidas de licopeno.

Por último, las **Figura 30 y 31** ilustra los cambios que tienen lugar en la AA tanto hidrofílica como lipofílica de los zumos analizados. Respecto a las muestras envasadas en tetrabrik, la AA hidrofílica cayó de forma clara en función del tiempo y la temperatura [ $p < 0.05$  (**Tabla 25**)], perdiendo un 30, 50 y 70% de su contenido en las muestras sometidas a 8,22 y 37°C respectivamente. Por otro lado, la AA lipofílica disminuyó ligeramente en los primeros dos meses variando desde 0.4 a 0.2 mmol de Trolox/Kg, manteniéndose relativamente constante durante el resto del periodo de almacenamiento, independientemente del tiempo y la temperatura [ $p > 0.05$  (**Tabla 25**)]. En los zumos envasados en botellas de cristal la AA hidrofílica estuvo afectada por el tiempo y la temperatura [ $p < 0.05$  (**Tabla 25**)], disminuyendo desde 0.77 a 0.5 mmol de Trolox/Kg en los dos primeros meses y manteniéndose constante durante el resto del almacenamiento. En cuanto a la AA lipofílica en muestras envasadas en cristal, el análisis estadístico reveló que los valores estuvieron determinados por el tiempo de almacenamiento [ $p < 0.05$  (**Tabla 25**)] aunque se mantuvo relativamente estable durante todo el experimento.

Generalmente es bien aceptado que el ácido ascórbico, junto con los compuestos fenólicos, es el mayor contribuidor a la AA hidrofílica (Arnao *et al.*, 2001; Dewanto *et al.*, 2002; Martínez-Valverde *et al.*, 2002; Periago *et al.*, 2009). Cuando se analizó el comportamiento de la AA en zumos envasados en tetrabrik se observó que estaba muy relacionado con la evolución del ácido ascórbico, encontrando coeficientes de correlación superiores a 0.900 ( $p < 0.05$ ). Una tendencia similar fue observada por Odriozola-Serrano *et al.* (2008) durante el almacenamiento en refrigeración de zumos de tomate por un periodo de tres meses.

En el caso de las muestras envasadas en botellas de cristal, los valores de AA hidrofílica fueron menores que los hallados para las muestras en tetrabrik, demostrando claramente la contribución del ácido ascórbico a la AA hidrofílica, ya que los compuestos fenólicos totales y los flavonoides totales contenidos en ambos tipos

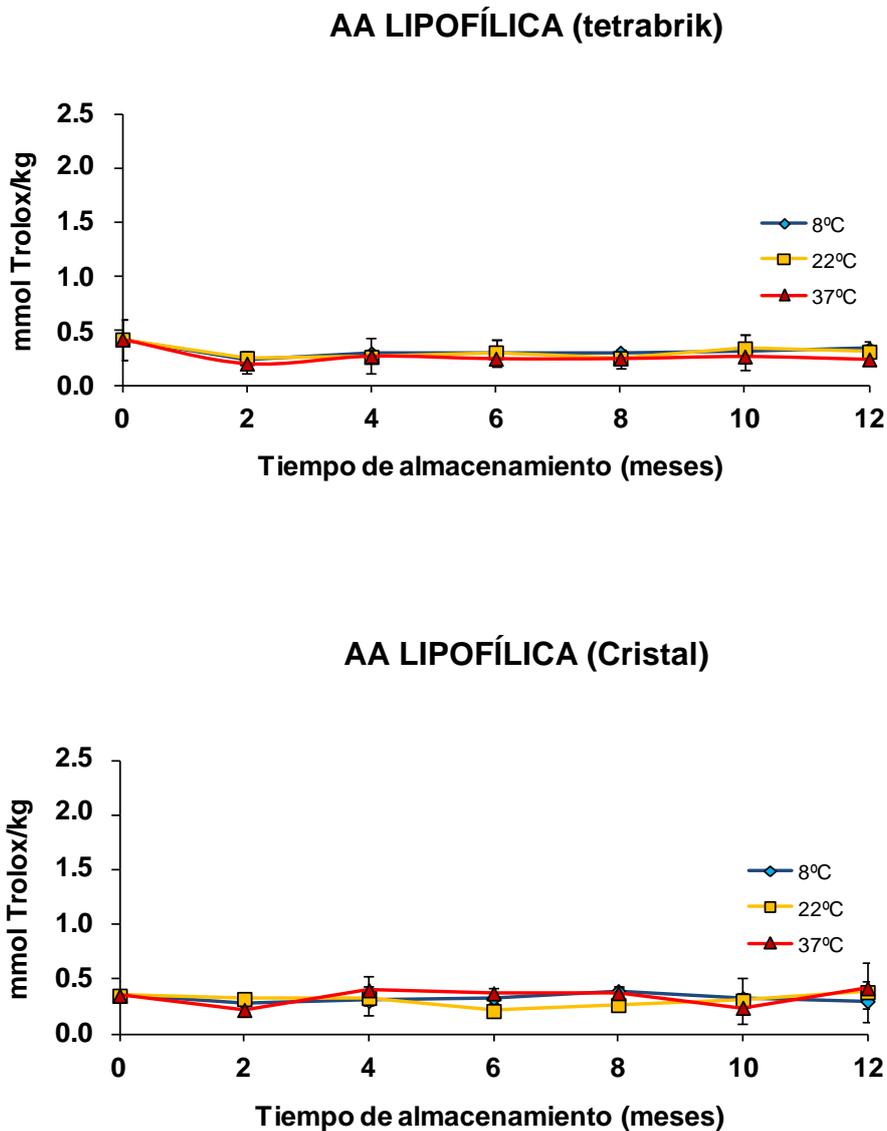
de envases fueron muy similares. De esta forma, está también claro que las muestras envasadas en cristal, la AA hidrofílica se basó en el contenido en compuestos fenólicos. De hecho, los cambios en la AA hidrofílica durante el almacenamiento mostraron una tendencia similar a la de los compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, con coeficientes de correlación mayores de 0.600 ( $p < 0.05$ ).



**Figura 30.** Evolución de la actividad antioxidante hidrofílica en zumos de tomate durante 12 meses de almacenamiento en dos tipos de envase (tetrabrik y cristal).

A diferencia de la AA hidrofílica, las relaciones establecidas entre los cambios en el contenido en licopeno y la AA lipofílica no fueron tan claras como se esperaba,

ya que no se observó una correlación significativa, aunque esos parámetros fueron muy estables durante el experimento. De esta forma es razonable asumir que pueden existir otros antioxidantes, como compuestos fenólicos lipófilos que puedan contribuir al mantenimiento de la AA lipofílica de las muestras durante el almacenamiento.



**Figura 31.** Evolución de la actividad antioxidante lipofílica en zumos de tomate durante 12 meses de almacenamiento en dos tipos de envase (tetrabrik y cristal).

Compuestos lipofílicos como el licopeno son responsables de la actividad antioxidante lipofílica en tomates, pero la contribución de tales compuestos se considera pequeña. En general, la actividad antioxidante hidrofílica supone más del

90% de la AA de frutas y vegetales (Wu *et al.*, 2004). En los tomates, la fracción hidrofílica muestra mayor actividad antioxidante que la fracción lipofílica, aunque la diferencia depende del método analítico utilizado. Por ejemplo, la actividad hidrofílica representó alrededor de 92% de la AA cuando fue determinado mediante el ensayo que determina la capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC) (Wu *et al.*, 2004) y el ensayo que analiza la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox (TEAC) (Toor y Savage, 2005), del 87% cuando se midió mediante el sistema xantina oxidasa/xantina, y prácticamente el 100% cuando fue evaluada usando el sistema mieloperoxidasa/NaCl/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lavelli *et al.*, 2000). En consecuencia, se observó que los valores de AA hidrofílica fueron siempre mayores que los de las fracciones lipófilas, con valores que oscilaron entre el 70-84% de la AA en las muestras almacenadas en cristal y tetrabrik, respectivamente. En este sentido, Toor y Savage (2005) sugirieron que la baja actividad antioxidante presente en los extractos lipofílicos del tomate, medidos mediante ensayo TEAC, es debida probablemente a los bajos niveles de compuestos fenólicos lipófilos.

### EXPERIENCIA 3: EVOLUCIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS VOLÁTILES RESPONSABLES DEL AROMA, ENZIMAS Y LICOPENO DURANTE LA FABRICACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE UN ZUMO DE TOMATE COMERCIAL

#### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

En esta experiencia se procedió a la cuantificación de la actividad relativa de las enzimas LOX y HPL en un zumo de tomate refrigerado durante la fabricación y el tiempo de duración de su vida comercial. Los resultados obtenidos se muestran en las **Figuras 32 y 33**. El porcentaje de actividad relativa de la enzima LOX disminuyó significativamente durante el procesado del zumo de tomate alcanzando valores residuales cercanos al 3% de la actividad inicial. Durante el almacenamiento los valores residuales de actividad se mantuvieron constantes, sin observar diferencias significativas entre las diferentes medidas realizadas durante el almacenamiento. De igual forma, el porcentaje de actividad relativa de la enzima HPL mostró una disminución significativa durante el procesado, reduciendo la actividad en un 80%. La actividad residual de la HPL disminuyó gradualmente durante la vida comercial, mostrando diferencias significativas en los 22 primeros días de almacenamiento y disminuyendo su actividad relativa inicial hasta un valor próximo a un 90% al final de la vida comercial.

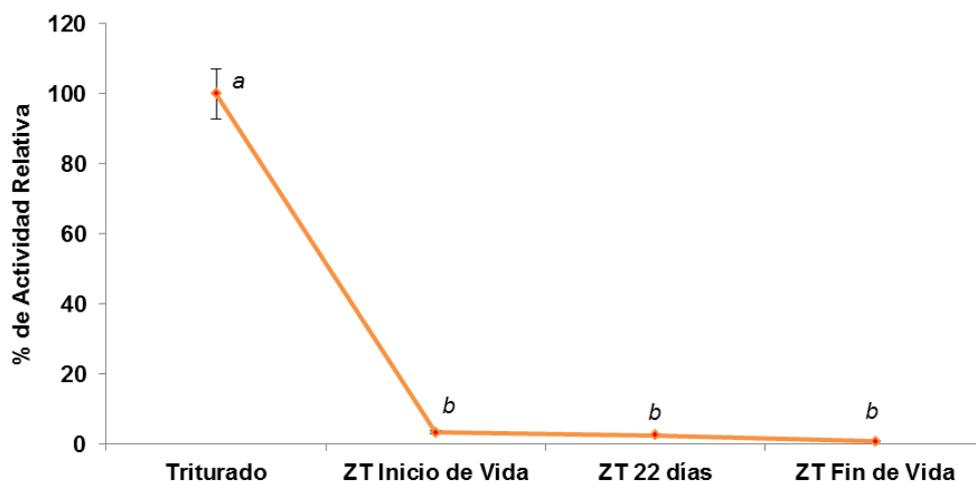
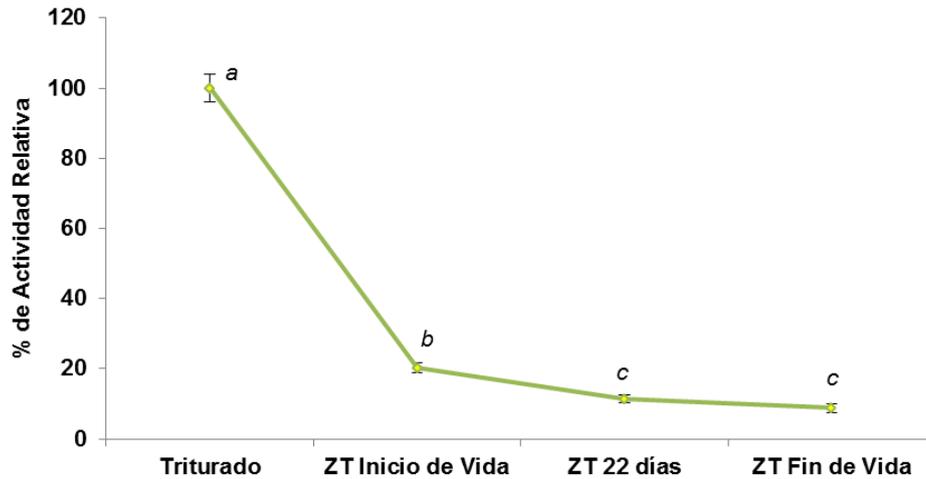


Figura 32. Efecto del procesado y almacenamiento en la actividad LOX de un zumo de tomate.



**Figura 33.** Efecto del procesado y almacenamiento en la actividad HPL de un zumo de tomate.

Los resultados mostrados son similares a los publicados por Min *et al.*, (2003), quienes observaron una inactivación total de la enzima LOX tras aplicar el tratamiento térmico de 92°C durante 90 s en zumo de tomate. Por el contrario, Anese y Sovrano (2006), determinaron una reducción de la actividad de la enzima LOX de un 60%, tras aplicar un tratamiento térmico de 90°C durante 60 s a un extracto de tomate. Igualmente, otros autores también han descrito la inactivación de estas enzimas en zumos de tomate con tratamiento térmicos superiores a los 60°C y por periodos más largos de tiempo que podrían llegar hasta los 12 min (Anthon y Barret, 2003; Rodrigo *et al.*, 2006).

En nuestras muestras se observa que la actividad de las enzimas LOX y HPL se ve reducida significativamente por el tratamiento térmico (96°C durante 30s) aplicado al zumo de tomate refrigerado, lo que demuestra que las enzimas son termolábiles inactivándose en casi su totalidad. Sin embargo, en ambos casos se mantiene una actividad enzimática residual, debido probablemente, a la presencia de distintas isoenzimas más termorresistentes, tal como ha sido descrito para la enzima LOX y sus isoenzimas, que presentan diferente estabilidad térmica (Anese y Sovrano, 2006). No obstante, la existencia de una actividad enzimática residual podría estar provocada por una baja tasa de penetración del calor debido a la viscosidad del zumo, que origina una inadecuada distribución de la temperatura, evitando la desnaturalización de la enzima.

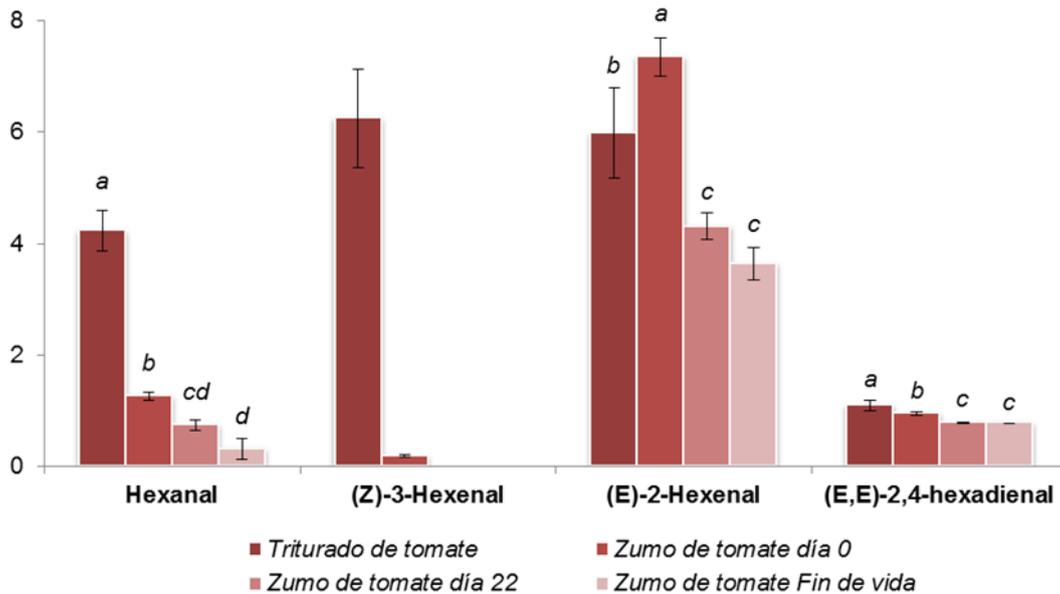
## COMPUESTOS VOLÁTILES

En el estudio de los principales compuestos aromáticos del zumo de tomate refrigerado, los resultados confirmaron la presencia de hexanal, (*Z*)-3-hexenal, (*E*)-2-hexenal, (*E,E*)-2,4-hexadienal, 1-hexanol, (*Z*)-3-hexenol, 6-metil-5-hepten-2-ona y 6-metil-5-hepten-2-ol en las muestras de triturado y procesado de tomate, los cuáles han sido previamente identificados como importantes contribuidores al aroma del tomate (Buttery *et al.*, 1993; Tikunov *et al.*, 2005).

En la **Figura 34** se muestran las concentraciones de los aldehídos hexanal, (*Z*)-3-hexenal, (*E*)-2-hexenal y (*E,E*)-2,4-hexadienal durante las distintas fases del estudio. El hexanal sufrió una disminución en torno al 70% tras el tratamiento térmico aplicado durante el procesado del zumo de tomate, pérdidas que se fueron incrementando de forma significativa durante la vida comercial hasta llegar a una reducción del 93% al final de la vida comercial. La concentración de (*Z*)-3-hexenal también mostró una disminución significativa ( $p < 0.05$ ), llegando a pérdidas de hasta el 97% de su concentración tras el procesado, y no siendo detectado a los 22 días de almacenamiento, ni al final de la vida comercial. De igual forma, el (*E*)-2-hexenal y el (*E,E*)-2,4-hexadienal disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ) tras el almacenamiento en refrigeración durante su vida comercial, pero sin llegar a valores tan marcados como el hexanal y (*Z*)-3-hexenal. Sin embargo, sus respuestas frente al tratamiento térmico mostraron tendencias diferentes, ya que mientras el (*E*)-2-hexenal aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) alrededor de un 23%, el (*E,E*)-2,4-hexadienal disminuyó un 13% tras el tratamiento térmico.

Analizando de forma individual la evolución de los distintos compuestos volátiles, hay que destacar el hecho de que tanto el (*Z*)-3-hexenal como el (*E*)-2-hexenal, moléculas asociadas al aroma a tomate verde fresco (Yilmaz, 2001a), se mostraron como los compuestos más abundantes tras el triturado del tomate fresco. Tras el tratamiento térmico, la concentración del (*Z*)-3-hexenal disminuyó drásticamente, fenómeno que coincidió en el tiempo con un incremento en la concentración del (*E*)-2-hexenal, hecho que demuestra una posible reacción de isomerización asociada al tratamiento térmico y la presencia de ácidos libres en el tomate, ya que el calor y los ácidos orgánicos es uno de los factores que puede originar el paso de isómeros *trans* a *cis* o viceversa (Kazeniak y Hall, 1970). Por otro lado el aldehído (*E,E*)-2,4-hexadienal, compuesto generado de forma natural mediante auto-oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, disminuyó de forma progresiva y

significativa su concentración a lo largo del estudio, estando afectada esta tanto por el tratamiento térmico como por el almacenamiento en refrigeración de los zumos de tomate. En este caso, la enzima LOX también podría mediar la formación del (*E,E*)-2,4-hexadienal a partir de ácidos grasos polinsaturados en el triturado de tomate. De hecho, la máxima actividad enzimática coincide con la máxima concentración de este compuesto, y al desaparecer casi totalmente la actividad enzimática de la LOX, no se genera más (*E,E*)-2,4-hexadienal. Además, se observa una disminución significativa ( $p < 0.05$ ), pero que no superó el 20% de la cantidad inicial, al final de la vida comercial como consecuencia de la reducida actividad enzimática al final de la vida comercial (Figura 34).



**Figura 34.** Evolución de los principales aldehídos volátiles responsables del aroma, tras el procesado del triturado de tomate y hasta el fin de la vida comercial del zumo a los 44 días de fabricación. Los resultados son expresados como partes por millón (ppm). Diferentes letras en las barras para cada compuesto indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Para analizar las relaciones existentes entre la actividad enzimática y los compuestos volátiles, se realizó un estudio de correlación de Pearson. En la **Tabla 26** se muestran los coeficientes de correlación entre los aldehídos hexanal, (*Z*)-3-hexenal, (*E*)-2-hexenal, (*E,E*)-2-4-hexadienal y la actividad residual (AR) de las enzimas LOX y HPL, mostrando en casi todos los casos una correlación positiva y con significancia estadística ( $p < 0.01$ ). Estos resultados muestran que las AR de las enzimas LOX y HPL

están íntimamente ligadas a la producción de estos compuestos volátiles. Únicamente en el caso de el (*E*)-2-hexenal no se observó una correlación significativa con la actividad enzimática de LOX y HPL. Este hecho puede estar justificado porque el (*E*)-2-hexenal es un isómero más estable del (*Z*)-3-hexenal, que se forma mediante dos vías a partir de este aldehído, una enzimática en la que interviene una enzima isomerasa, y otra no enzimática (Bai *et al.*, 2011), inducida probablemente por el tratamiento térmico asociado al procesado y las condiciones ácidas del zumo de tomate. En este sentido, Kazeniak y Hall (1970) determinaron que el (*Z*)-3-hexenal se mostraba bastante inestable en condiciones de calor y medios ácidos, isomerizándose hacia el (*E*)-2-hexenal. De este hecho podría derivarse la explicación del aumento del (*E*)-2-hexenal en el “zum de tomate a día 0” por encima de los niveles iniciales, coincidiendo según esta hipótesis con la disminución del (*Z*)-3-hexenal, tal y como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, estas observaciones no coinciden con las publicadas por otros autores como Aguiló-Aguayo *et al.* (2009), quienes observaron una disminución del (*E*)-2-hexenal tras los tratamientos térmicos a 90°C aplicados durante 30 y 60 s, aunque en sus muestras estudio no estudiaron el efecto de los tratamientos térmicos sobre el isómero (*Z*)-3-hexenal.

**Tabla 26.** Correlaciones mediante análisis de correlación de Pearson entre la AR de la enzimas LOX y HPL, y los compuestos volátiles analizados.

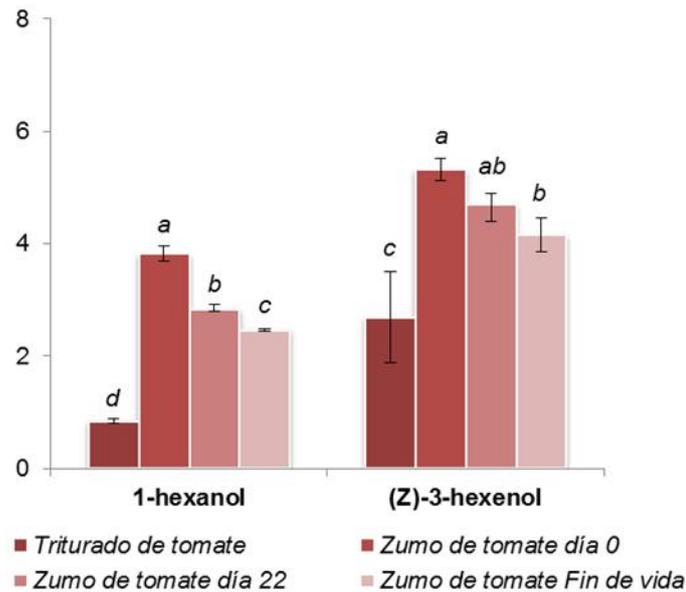
	AR LOX	AR HPL
<b>Hexanal</b>	0.965 *	0.987 *
<b>(Z)-3-Hexenal</b>	0.980 *	0.969 *
<b>(E)-2-Hexenal</b>	0.245	0.453
<b>(E,E)-2-hexadienal</b>	0.767 *	0.836 *

\*. La correlación es significativa  $p < 0.01$ .

La reducción enzimática de los aldehídos hexanal y (*Z*)-3-hexenal provoca la aparición de sus correspondientes alcoholes 1-hexanol y (*Z*)-3-hexenol, dos de los compuestos más importantes en el aroma del tomate (Buttery y Ling, 1993b). La evolución de los mismos tras el procesado y su posterior almacenamiento se muestran en la **Figura 35**. La concentración de estos compuestos volátiles es más elevada tras el tratamiento térmico, alcanzando valores cuatro veces superiores al contenido inicial para el 1-hexanol, y duplicando su concentración para el (*Z*)-3-hexenol. Por otro lado,

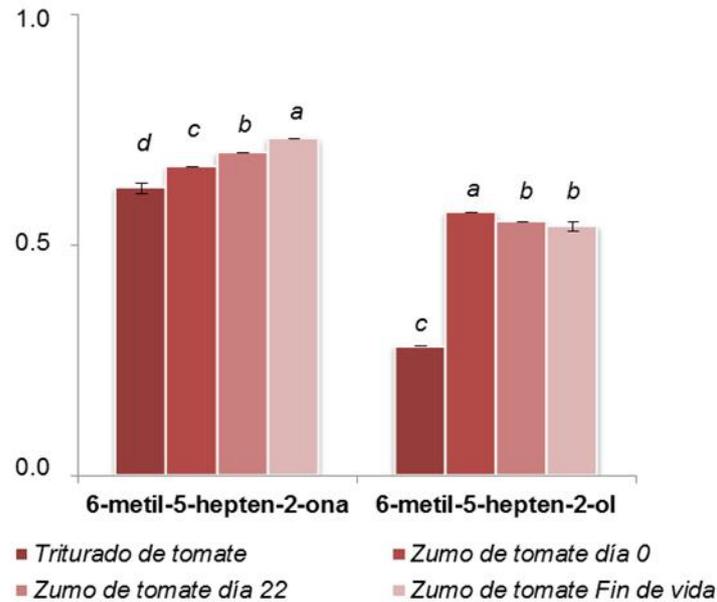
tras el almacenamiento en refrigeración de los zumos durante la vida comercial, el 1-hexanol y (Z)-3-hexenol disminuyeron mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). No obstante, hay que destacar que las concentraciones finales de ambos compuestos en los diferentes tiempos de almacenamiento fueron superiores a las obtenidas para la muestra de triturado de tomate.

Es destacable el hecho de que se produzca un incremento en los compuestos 1-hexanol y (Z)-3-hexenol tras el tratamiento térmico. Aunque el procesado disminuye significativamente la actividad de las enzimas encargadas de la reducción de los aldehídos precursores de estos compuestos, los resultados muestran una actividad enzimática residual que puede derivar en un aumento significativo de la concentración de estos alcoholes. Sin embargo, la hipótesis más plausible podría ser que tras el triturado del tomate, haya transcurrido el tiempo necesario antes del tratamiento térmico, como para favorecer la producción del 1-hexanol y (Z)-3-hexenol en mayores concentraciones que en las encontradas en el estadio inicial, ya que la disrupción de los tejidos en el producto homogenizado es un factor determinante para poner en contacto las enzimas con sus sustratos. Si esto fuese así, estos compuestos se formarían en cantidades suficientes para mostrar valores como los observados tras el tratamiento térmico, manteniéndose en concentraciones superiores a las iniciales durante el almacenamiento. Estos dos compuestos no pueden ser correlacionados directamente con la enzima encargada de su generación, puesto que la ADH no era objeto de este estudio. Por otro lado si se estableció la correlación entre estos compuestos volátiles y sus precursores. Así pues, se detectaron correlaciones negativas y significativas entre el hexanal y el 1-hexanol ( $r = -0.759$   $p < 0.01$ ), y del (Z)-3-hexenal con el (Z)-3-hexenol ( $r = -0.873$   $p < 0.01$ ).



**Figura 35.** Evolución de los principales alcoholes volátiles responsables del aroma, tras el procesado del triturado de tomate y hasta el fin de vida del zumo a los 44 días de fabricación. Los resultados son expresados como partes por millón (ppm). Diferentes letras en las barras para cada compuesto indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Para completar el estudio se determinó la evolución de los compuestos volátiles derivados de uno de los principales compuestos bioactivos del tomate, el licopeno. Entre ellos destacan la 6-metil-5-hepten-2-ona y el 6-metil-5-hepten-2-ol (Buttery *et al.*, 1987, 1988; Caris-Veyrat *et al.*, 2003). Durante el tratamiento térmico correspondiente al procesado se produjo un aumento en la concentración de ambos compuestos volátiles, más acusada en el caso del alcohol, duplicándose su concentración. Por el contrario, las tendencias en la concentración de estos compuestos volátiles durante el almacenamiento fueron opuestas, incrementándose para la cetona y disminuyéndose ligeramente pero de forma significativa para el alcohol. (**Figura 36**).



**Figura 36.** Evolución de los compuestos volátiles derivados del licopeno tras el procesado del triturado de tomate y hasta el fin de la vida comercial del zumo a los 44 días de fabricación. Los resultados son expresados como partes por millón (ppm). Las diferentes letras dentro de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

La 6-metil-5-hepten-2-ona se produce a partir del licopeno mediante fenómenos de co-oxidación (Buttery y Ling, 1993a) entre los que podría estar involucrada la enzima LOX (Robinson *et al.*, 1995). De esta forma, la enzima favorecería la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y los productos de oxidación de la actividad enzimática (radicales peroxilo) reaccionarían con carotenoides como el licopeno (Whitaker, 1991). Por otro lado, esta cetona también podría derivar de otros procesos como la hidrólisis térmica de glicósidos del tomate, los cuales pueden liberar grandes cantidades de este compuesto (Salles, 2008). Este fenómeno podría explicar el aumento en la concentración de este compuesto volátil tras el tratamiento térmico aunque no explicaría el aumento a lo largo del tiempo de almacenamiento. En este caso, la degradación del licopeno mediante procesos de oxidación podría ser el agente causante del aumento de la concentración de esta cetona, procesos en los que podrían estar la actividad LOX residual encontrada en el zumo de tomate almacenado en refrigeración. Esta enzima puede ser activa incluso a temperaturas por debajo de 0°C (Calligaris *et al.*, 2002).

El 6-metil-5-hepten-2-ol es otro de los volátiles producidos a partir de la degradación del licopeno (Ishida *et al.* 1993). De igual forma que para los alcoholes 1-hexanol y (*Z*)-3-hexenol, aunque por mecanismos todavía desconocidos, el aumento

significativo de la concentración de el 6-metil-5-hepten-2-ol entre la muestra de tomate triturado y el zumo de tomate procesado podría estar motivado por la formación de este compuesto durante el tiempo que transcurre entre el triturado de tomate y su posterior tratamiento térmico. Gao *et al.* (2008) observaron el incremento en la concentración de el 6-metil-5-hepten-2-ol a partir de la 6-metil-5-hepten-2-ona con respecto al tiempo, provando la capacidad reductora de los discos de tomate utilizados para el ensayo. De esta manera, el tiempo transcurrido entre el triturado de tomate y su posterior tratamiento térmico puede ejercer un papel muy importante en la generación de compuestos volátiles, ya que cuanto más tiempo transcurra, más se alterarían las concentraciones de los compuestos volátiles. Este hecho pone de manifiesto que el 6-metil-5-hepten-2-ol podría originarse mediante dos vías, una por degradación del licopeno y la otra por reducción de la 6-metil-5-hepten-2-ona.

En la actualidad son desconocidos muchos de los mecanismos mediante los cuales se originan los compuestos volátiles derivados de carotenoides, pero a la luz de los resultados parece que el tratamiento térmico disminuiría la actividad enzimática asociada a la formación de este alcohol, lo que provoca que no aumente su concentración durante el almacenamiento del zumo de tomate en refrigeración. De hecho se produce una disminución en la concentración del 6-metil-5-hepten-2-ol a lo largo del almacenamiento, inducido probablemente por fenómenos de oxidación que podrían originar la cetona correspondiente, es decir la 6-metil-5-hepten-2-ona. Para corroborar esta afirmación se realizó un estudio de correlación de Pearson entre ambos compuestos durante el almacenamiento y se observó una correlación negativa y estadísticamente significativa ( $r = -0.916$ ,  $p < 0.01$ ).

## LICOPENO

Como la formación de la 6-metil-5-hepten-2-ona y el 6-metil-5-hepten-2-ol están relacionadas con la degradación enzimática del licopeno, se estudió la evolución del contenido de licopeno en el zumo de tomate tras el tratamiento térmico y durante el almacenamiento en refrigeración, realizando un estudio de correlación entre la producción de estos compuestos volátiles y el contenido en licopeno. La **Tabla 27** muestra el contenido de los isómeros *all-trans* y *cis* del licopeno, así como el contenido de licopeno total en la muestra de tomate triturado, zumo de tomate al día 0 y zumo de tomate a los 22 días y al final de la vida comercial, tras el almacenamiento en refrigeración. Tal y como se puede observar la concentración de licopeno total así

como la del isómero mayoritario, *all-trans*-licopeno, aumentó significativamente tras el procesado del zumo de tomate, observando una pérdida significativa durante la vida comercial del zumo de tomate. En el caso del licopeno total se observa un incremento de licopeno de 19.76 a 27.25 mg/Kg, mientras que para el *all-trans*-licopeno los valores incrementaron tras el tratamiento térmico desde 18.04 a 25.55 mg/Kg. Para la suma total de los isómero *cis* del licopeno, el comportamiento fue exactamente el mismo, aumentando tras el tratamiento térmico 1 mg/Kg (1.73 vs 2.78 mg/Kg), y disminuyendo durante el almacenamiento en refrigeración a lo largo de vida comercial. El incremento tras el procesado en la cantidad de licopeno y sus isómeros se debe principalmente al hecho de que el tratamiento térmico favorece la rotura de las estructuras celulares y facilita el proceso de extracción, aumentando la cuantificación (Pérez-Conesa *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2010). También el tratamiento térmico del puré de tomate, durante la elaboración del zumo, trae consigo una ligera concentración por evaporación del agua de constitución (Pérez-Conesa *et al.*, 2009), lo que incrementa las concentración de este carotenoide. Sin embargo, la disminución significativa del licopeno observada durante el almacenamiento estaría justificada por la degradación oxidativa de este compuesto, ya que la actividad residual de las enzimas puede mantenerse activa incluso a temperaturas de refrigeración o congelación (Calligaris *et al.*, 2002).

**Tabla 27.** Contenido de licopeno, expresado en mg/Kg, en el zumo de tomate tras el tratamiento térmico y durante el almacenamiento en refrigeración durante su vida comercial.

	<i>all-trans</i> -Licopeno	<i>cis</i> -Licopeno	Licopeno Total
<b>Triturado de Tomate</b>	18.04±0.84 <sup>d</sup>	1.73±0.03 <sup>d</sup>	19.76±0.86 <sup>d</sup>
<b>Zumo Tomate día 0</b>	24.55±0.20 <sup>a</sup>	2.78±0.03 <sup>a</sup>	27.25±0.10 <sup>a</sup>
<b>Zumo de Tomate día 22</b>	23.85±0.11 <sup>ab</sup>	2.52±0.04 <sup>b</sup>	26.41±0.17 <sup>ab</sup>
<b>Zumo de Tomate Fin de Vida</b>	23.18±0.38 <sup>b</sup>	1.94±0.11 <sup>c</sup>	25.19±0.38 <sup>b</sup>

Los valores se definen como la media±SD y son expresados como mg/Kg de peso fresco. Las diferentes letras dentro de cada columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

La degradación oxidativa del licopeno puede conducir a un aumento en la concentración de la 6-metil-5-hepten-2-ona (Dávila-Aviña *et al.*, 2011), que ha sido

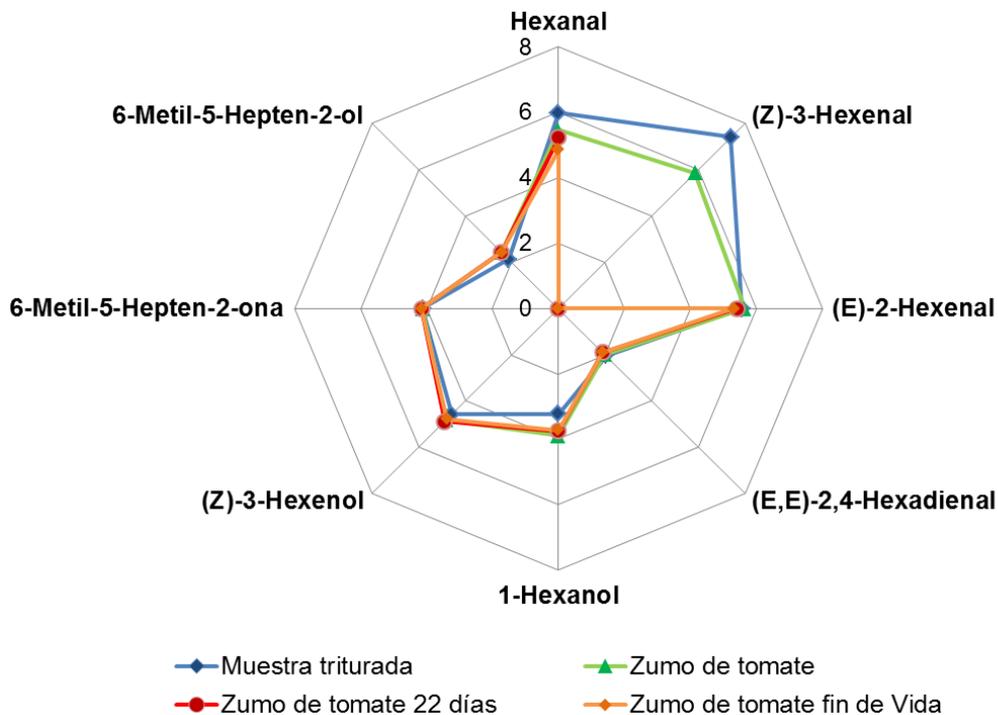
observado y descrito anteriormente. Aunque las enzimas pueden estar involucradas en el ligero incremento de la 6-metil-5-hepten-2-ona durante el almacenamiento, otros factores como pueden ser la presencia de agentes oxidantes (como los restos de peróxido de hidrógeno usado para esterilizar el envase de tetrabrik en el que es envasado del zumo) o el la presencia de microorganismos (estamos ante un producto refrigerado que no es estéril), pueden también favorecer la degradación oxidativa del licopeno, originando, mediante esta vía, la 6-metil-5-hepten-2-ona. Tal y como muestran los resultados, la degradación del licopeno durante el almacenamiento es progresiva y estadísticamente significativa a lo largo del tiempo (**Tabla 27**), lo que explicaría el aumento observado (estadísticamente significativo,  $p < 0.05$ ) en la concentración de esta cetona durante el almacenamiento (**Figura 36**).

Estos resultados se encuentran contrastados por los obtenidos en el estudio de correlación ya que se observa una correlación negativa y significativa entre la concentración de la cetona y licopeno en el zumo de tomate durante el almacenamiento ( $r = -0.955$ ,  $p < 0.01$ ). Sin embargo, durante el tratamiento térmico se observó una correlación positiva significativa enmascarada por el hecho de que se produce la liberación del licopeno desde la matriz y una ligera concentración debido a la pérdida de agua de constitución.

### *PERFIL AROMÁTICO*

El análisis de los diferentes compuestos volátiles analizados en las muestras de tomate triturado y posteriormente en el zumo nos permite establecer un perfil con los diferentes compuestos responsables del aroma. La **Figura 37** representa los perfiles aromáticos asociados al triturado y zumo de tomate en sus distintas fases, desde el inicio hasta el final de su vida comercial. De forma general, tanto el procesado como el almacenamiento de los zumos de tomate supusieron una pérdida en el perfil de compuestos volátiles relacionados con las notas definidas como fresco y verde, disminuyendo así su calidad aromática. El hexanal, (*Z*)-3-hexenal y (*E*)-2-hexenal son los compuestos más importantes, por concentración y umbral de percepción, que potencian el aroma verde característico del tomate (Yilmaz *et al.*, 2001ab). Su disminución a lo largo del estudio justificaría en gran medida la pérdida de calidad aromática de los zumos de tomate, tras el tratamiento térmico y al final de su vida comercial. Kazeniak y Hall (1970), explicaron que la disminución de estos tres aldehídos asociados a las notas de olor “verde” podrían ser la causa de la aparición de

las notas a “cocinado” características de los productos de tomate que han sufrido un tratamiento térmico. En este sentido, la disminución de otros compuestos volátiles como el (*E,E*)-2-4-hexadienal, positivamente correlacionado con los sabores dulce y afrutado (Galiana-Balaguer *et al.*, 2004), o el aumento de la 6-metil-5-hepten-2-ona, correlacionado, en altas concentraciones, con la pérdida de las notas aromáticas típicas del tomate y sabores insípidos (Rowley, 2003) o con la sensación de picor y astringencia (Abegaz *et al.*, 2004), también podrían contribuir a la disminución de la calidad organoléptica de estos procesados de tomate al final de su vida comercial. Estos cambios han sido descritos anteriormente durante el almacenamiento del zumo de tomate lo que demuestra la pérdida en la calidad organoléptica en el zumo de tomate con respecto al tomate recién triturado.



**Figura 37.** Contribución relativa al aroma del tomate de cada uno de los compuestos volátiles analizados. Su cálculo se realizó a través del log de las unidades de olor, definidas estas como la concentración del compuesto volátil dividido entre su umbral de percepción (Buttery, 1993; Van de Gemert, 2003).

En general, tanto el procesado como el almacenamiento de los zumos de tomate suponen una pérdida gradual de aquellos compuestos relacionados con el aroma fresco del tomate. La disminución en la concentración de hexanal, (*Z*)-3-

hexenal, (*E*)-2-hexenal, (*E,E*)-2-4-hexadienal, 1-hexanol, y (*Z*)-3-hexenol sólo puede ser el resultado, o bien de una disminución continua de ácidos grasos que actúan como sustrato o debido a la disminución de la actividad enzimática, provocada en mayor medida por el tratamiento térmico a 96°C durante 30 s.

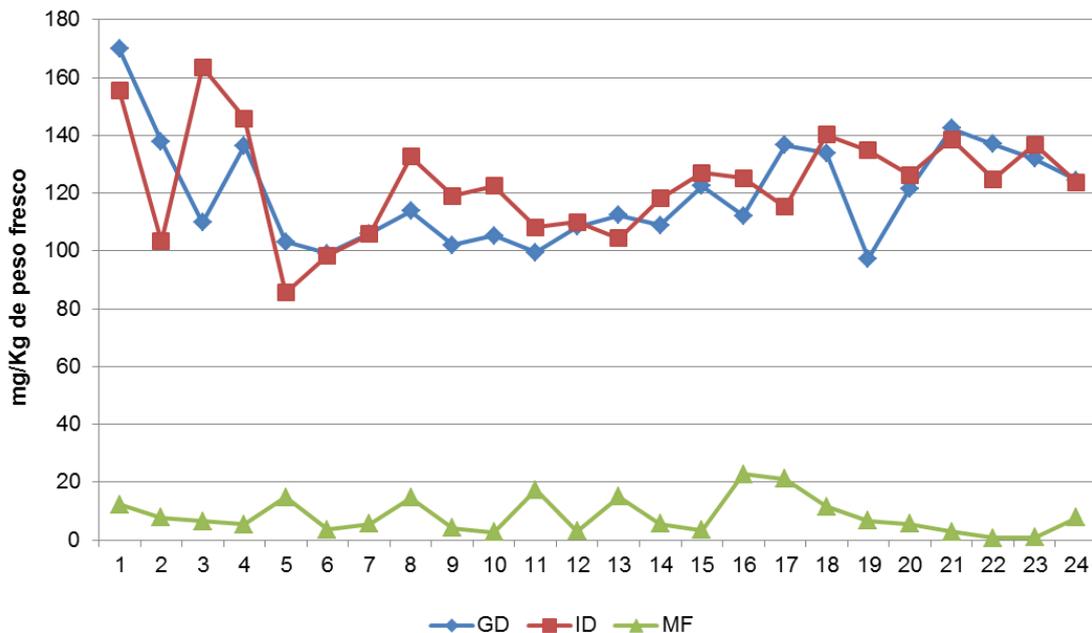
Si consideramos que los compuestos analizados en este estudio dependen su formación de la actividad enzimática de las enzimas LOX y HPL, esta solo tendrá lugar fundamentalmente durante el triturado de tomate, fase en la que las enzimas mantienen toda su actividad. Puesto que la generación de compuestos volátiles dependerá de una secuencia enzimática, los primeros compuestos en formarse serían los aldehídos hexenal y (*Z*)-3-hexenal. En consecuencia, compuestos como los alcoholes hexanol o (*Z*)-3-hexenol se formarían más tarde, y la hipótesis de que estos compuestos se generen durante el tiempo transcurrido entre la toma de muestra del triturado de tomate y su posterior tratamiento térmico cobra especial relevancia.

Otra forma de explicar los resultados obtenidos sería planteando el hecho de que la formación de compuestos volátiles dependerá tanto de los sistemas enzimáticos como no enzimáticos, como podría ser la temperatura o el pH. La formación de estos compuestos tendría lugar incluso durante el del tratamiento térmico, mediante la hidrólisis y descomposición de los ésteres de ácidos grasos, tal y como ya sugería hace 30 años Chung *et al.* (1983), cuando observó incrementos en los volátiles (*E*)-2-hexenal y (*Z*)-3-hexenol en zumos de tomate tratados térmicamente a 90-96°C con respecto a los tomates en fresco.

Aunque todos los compuestos volátiles analizados intervienen, en mayor o menor medida, en el aroma a fresco del tomate, parece ser que los compuestos hexenal y (*Z*)-3-hexenal son los responsables directos de la pérdida de esta cualidad aromática.

#### EXPERIENCIA 4: ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN A LA DISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE UN PURÉ DE TOMATE

El tomate tipo “passata” fue analizado para determinar la cantidad de licopeno total y de sus isómeros. El valor medio de licopeno total fue de 173.2 mg/Kg de peso fresco, con un 5.9% de isómeros *cis* del licopeno (datos no mostrados). La estabilidad del licopeno durante la digestión *in vitro* fue calculada en función del licopeno total cuantificado en las fracciones de la digestión gástrica (GD) y la digestión intestinal (ID) de las diferentes muestras (**Figura 38**), mostrando una mayor estabilidad tras la digestión gástrica que tras la intestinal. En general, entre un 99% y un 60% del licopeno total del tomate tipo “passata” fue recuperado en la GD, mientras que en la ID, estos valores alcanzaron valores entre el 97% y el 50%. Granado-Lorencio (2007a) describió que la estabilidad de los carotenoides durante las fases salivar, gástrica y duodenal fue, de media, mayor de un 80%, datos que coinciden con los encontrados en el presente estudio.



**Figura 38.** Estabilidad del licopeno total tras la digestión gástrica (GD) e intestinal (ID), y la cantidad de licopeno total solubilizado en la fracción micelar (MF). Los datos son expresados como el valor medio de tres determinaciones.

Las **Tablas 29 y 30** muestran el contenido de los isómeros del licopeno, *cis* y *all-trans*, además del porcentaje de isomerización después de cada una de las etapas de digestión de tomate tipo “passata”. Aunque algunos autores (Granado-Lorencio *et al.*, 2007a; Richelle *et al.*, 2010) mostraron que la relación *cis/trans* de alimentos procesados era aparentemente inalterable durante las fases gástrica y duodenal, en este estudio se ha observado un comportamiento distinto. En la fracción GD (**Tabla 29**) el contenido de *all-trans*-licopeno mostró valores que oscilaron entre 74.75 y 155.01 mg/Kg, mientras que la cantidad de isómeros *cis* se mantuvo entre 9.43 y 37.82 mg/Kg. En algunas de las muestras, los porcentajes de *cis*-licopeno fueron significativamente mayores, alcanzando valores cercanos al 30%, lo cual podría estar relacionado con el pH. Es un hecho conocido que la presencia de medios ácidos podría inducir las reacciones de isomerización del licopeno en los alimentos (Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995), así como bajo condiciones de simulación de una digestión gástrica (Re *et al.*, 2001; Moraru *et al.*, 2005). De hecho, ha sido descrito en un modelo a pH gástrico (1.5) que el *all-trans*-licopeno disminuye su concentración conforme aumenta la del 13-*cis*-licopeno, siendo esta una reacción reversible, ya que estos isómeros *cis* isomerizan predominantemente a las formas *all-trans* (Moraru *et al.*, 2005). De acuerdo con estos autores, el pH conduce a una isomerización que es responsable, al menos en parte, en la alta proporción de *cis*-licopeno encontrada en el cuerpo humano, ya que los isómeros *cis* pueden ser formados en el estómago.

Tras la ID (**Tabla 30**), el mayor contenido de *all-trans*-licopeno fue detectado en el ensayo número 3, con un valor medio de 157.11 mg/Kg, mientras que la concentración más pequeña se encontró en la muestra número 5, con un valor medio de 72.63 mg/Kg. En cuanto a los valores de los isómeros *cis*, estos fueron significativamente menores que los descritos para la GD, mostrando un intervalo de resultados que varió desde 5.16 a 17.22 mg/Kg, lo cual representa menos de un 17% de isómeros *cis*. Aunque algunos autores no han observado porcentajes de isomerización del licopeno significativos bajo condiciones intestinales (Granado-Lorencio 2007a, Richelle *et al.*, 2010), los resultados de este estudio muestran un ligero incremento de los isómeros *cis* comparados con la concentración inicial de *cis*-licopeno del tomate tipo “passata”. Por otra parte, la menor proporción de isómeros *cis* encontrados en las muestras de ID comparadas con las GD, muestran que las reacciones de isomerización provocadas por el pH, implican procesos reversibles (Moraru *et al.*, 2005). De esta forma, cuando se alcanza un pH más neutral en las muestras de ID, tienen lugar cambios conformacionales que aumentan el contenido de las formas *all-trans* del licopeno.

El contenido de licopeno y sus isómeros en la fracción micelar (MF) se muestra en la **Tabla 31** y la **Figura 38**. Tal y como se puede observar, el licopeno total que se incorpora a las micelas es una pequeña proporción del licopeno total (valores entre el 2 y el 12%), ya que se obtuvo una baja concentración de este carotenoide en todos los ensayos (**Figura 38**). La concentración de *all-trans*-licopeno varió desde 0.64 hasta 19.75 mg/Kg, mientras que para los isómeros *cis* todos los valores eran inferiores a 3 mg/Kg, incluso indetectables en algunos ensayos (**Tabla 31**). Estos resultados están de acuerdo con otros mostrados previamente en la literatura científica; Reboul *et al.* (2006) determinó que el licopeno del puré de tomate es el carotenoide menos bioaccesible, en comparación con la luteína de la espinaca o el  $\beta$ -caroteno de las zanahorias, mostrando índices inferiores de solubilización en las micelas. Además, Huo *et al.* (2007) mostraron que la proporción de licopeno incorporado en las micelas de una ensalada rica en carotenoides osciló entre 1.1% y 5.6%. Esta incorporación se hace en base a tres principios, según describen estos autores: la presencia de aceite, la longitud de cadena y grado de saturación de los ácidos grasos. Sin embargo, hay que mencionar que, en algunos estudios, los porcentajes de isomerización fueron ligeramente mayores tras la digestión intestinal, alcanzando valores en torno al 20%, demostrando que los isómeros *cis* del licopeno se incorporan en micelas de forma preferencial a los isómeros *all-trans* del licopeno (Boileau *et al.*, 2002).

Para determinar los factores más críticos en cuanto a la disponibilidad *in vitro* del licopeno, las concentraciones de los distintos isómeros cuantificados en los 24 ensayos correspondientes a las DG, DI y MF fueron relacionados con las diferentes condiciones utilizadas en los mismos. Los resultados obtenidos en la fase de selección puede ser discutidos en base a tres principios empíricos: el principio de escasez (sólo serán críticos un pequeño número de factores), el principio de jerarquía (los efectos primarios son más propensos a ser críticos que los efectos secundarios generados a partir de interacciones de dos factores, que a su vez son más propensas a ser críticos que la interacción de tres factores, y así sucesivamente), y el principio de la herencia (para una interacción es inusual ser crítica a menos que, al menos uno de los factores que intervienen, tenga un efecto crítico activo primario). Sobre la base de estos principios, claramente establecido por Miller y Sitter (2001), el nivel de confianza de  $p < 0.20$  fue el utilizado para identificar los principales efectos más importantes, descartando información sobre las interacciones proporcionadas por diseños factoriales fraccionados. La **Tabla 32** muestra el efecto de los once factores codificados en las respuestas medidas (mg de *all-trans*- y *cis*-licopeno) en DG, DI y MF con el objetivo de determinar los factores que se consideran los más influyentes

para la disponibilidad *in vitro* licopeno. Con una  $p < 0.20$  el factor fue considerado como un factor de influencia (IF).

Para la GD solo pudieron ser considerados los efectos de los factores codificados desde el  $X_1$  hasta el  $X_5$ , debido fundamentalmente a que el resto de factores están relacionados con las condiciones de ID y por lo tanto, los factores desde  $X_6$  hasta  $X_{11}$  no tienen efecto en las muestras de GD, ya que han sido tomadas antes de aplicar las distintas condiciones y añadir las enzimas relacionadas con la digestión intestinal. Así pues, después de GD sólo dos factores pueden ser considerados como factores de influencia. El tratamiento térmico ( $X_1$ ) aplicado al puré de tomate tiene un efecto negativo sobre el contenido de *all-trans*-licopeno, hecho que podría estar asociado a cambios conformacionales en las moléculas de licopeno asociadas al tratamiento térmico. Sin embargo, estos cambios no se asocian con el aumento de los isómeros *cis*, ya que ningún IF fue identificado para el contenido de *cis*-licopeno después de la digestión gástrica de tomate tipo "passata". En general, los cambios en los carotenoides, y por lo tanto en el licopeno, podrían ser provocados mediante procesos de isomerización y oxidación (Meléndez-Martínez et al., 2004b). Shi et al. (2003) y Zanoni et al. (2003) determinaron que en los productos de tomate cocinados a temperaturas superiores a 100°C, el proceso de degradación tuvo lugar más rápidamente que el de isomerización, aumentando esta relación en función del tiempo de cocción. Dado que los productos de oxidación de licopeno no se miden en este estudio, el efecto negativo del tratamiento térmico podría conducir a una reducción de *all-trans*-licopeno asociada a las reacciones de oxidación. El otro factor significativo fue la adición de aceite de oliva ( $X_2$ ), que puede ser considerado como un IF con un efecto positivo en el contenido total de *all-trans*-licopeno. Este efecto puede estar relacionado con el hecho de que la presencia de aceite o grasa facilite la solubilización del licopeno. Tras la digestión gástrica el licopeno es separado de los complejos proteicos a los que se mantiene unido de forma natural (During y Harrison, 2004), y la presencia de aceite o grasa podría mejorar su solubilización debido a su carácter lipófilo (Tyssandier et al., 2001). A pesar de que fueron cuantificados una proporción mayor de isómeros *cis* en las muestras de GD, ningún factor fue considerado como IF para la concentración de *cis*-licopeno tras la digestión gástrica, ni siquiera el pH. Esto podría explicarse porque las reacciones de isomerización dependen de los valores de pH. Así pues, en los modelos *in vitro* que simulan el estado de ayuno *in vivo*, el rango de pH utilizado es bastante bajo, en torno a 1.5-2 (Re et al., 2001; Moraru et al., 2005), mientras que aquellos que usan valores más elevados de pH gástrico simulan las condiciones del estómago tras la ingesta de comida, ya que después de una comida

rica en vegetales los rangos de pH se encuentran entre 5.8 tras la comida, y 3 a las 3 horas de la ingesta (Tyssandier *et al.*, 2003; Reboul *et al.*, 2006). En modelos *in vitro* llevados a cabo posteriormente la isomerización debida al pH no fue estudiada (Reboul *et al.*, 2006; Richelle *et al.*, 2010), y por esta razón no fue determinada la influencia del pH gástrico. En nuestro estudio fueron seleccionados dos valores de pH de acuerdo con las diferentes condiciones fisiológicas, el estado de ayuno y el posterior a la ingesta de comida.

Para las muestras de ID y MF, 7 de los 11 factores resultaron ser IF para la concentración del *all-trans*-licopeno y *cis*-licopeno. El tratamiento térmico ( $X_1$ ) fue considerado como IF debido a su efecto negativo sobre el contenido de *all-trans*-licopeno y positivo para la concentración de isómeros *cis* detectados en la ID. Este hecho podría deberse a que el tratamiento térmico, seguido de la digestión gástrica, conduce a una isomerización del *all-trans*-licopeno, aumentando así la concentración del *cis*-licopeno (Moraru *et al.*, 2005). Aunque, la pasteurización industrial de algunos productos de tomate no provoca un aumento del porcentaje de isomerización (Pérez-Conesa *et al.*, 2009), el cocinado doméstico si podría inducir la isomerización, ya que el tomate es cocinado a temperaturas más altas y en presencia de oxígeno (Jacob *et al.*, 2010). Por otra parte, la oxidación de licopeno podría aparecer más rápidamente que la isomerización durante el calentamiento (Shi *et al.*, 2003; Zaroni *et al.*, 2003) disminuyendo el *all-trans*-licopeno. El tiempo de digestión gástrica ( $X_4$ ) también es considerado como un IF, debido a su efecto negativo sobre el contenido de *all-trans*-licopeno y positivo para la concentración de isómeros *cis* que alcanzan el intestino delgado y que se incorporan a las micelas. Este hecho podría deberse a que, bajo las condiciones de pH gástrico, el *all-trans*-licopeno tiende a descomponerse o isomerizarse (Moraru *et al.*, 2005), lo cual podría determinar una menor actividad (**Tabla 30**) en las muestras de ID (**Figura 38**). Además, el porcentaje de isomerización en la ID y MF aumentó en relación al tiempo de digestión gástrica. Este efecto se relaciona, tal y como se ha descrito anteriormente, con la isomerización provocada por el pH (Re *et al.*, 2001; Moraru *et al.*, 2005). La composición de los alimentos también determina el tiempo que el alimento está en el estómago durante la digestión. La presencia de proteínas y grasas, favorece la secreción de ácido clorhídrico en la mucosa del estómago y aumenta el tiempo de digestión con respecto a un estómago vacío. En este estudio se han considerado dos tiempos de digestión gástrica, 15 y 60 min, en contraste con los 30 min considerados por otros autores (Reboul *et al.*, 2006). Quince minutos representan el tiempo en el que el tomate tipo “passata” permanecería en el estómago si fuese consumido solo, y 60 min si este fuera consumido junto a

otros alimentos, aumentando así el tiempo de digestión. En base a los resultados obtenidos en este estudio, cuando el tomate tipo “passata” es sometido a una digestión gástrica durante 60 min, existe un mayor porcentaje de *cis*-licopeno en la ID y también en las micelas, aumentando su bioaccesibilidad.

En el intestino grueso son muchos los factores que van a afectar la biodisponibilidad de carotenoides. Según Tyssandier *et al.* (2001), valores de pH intestinal entre 6 y 7, la presencia de aceite y la concentración de sales biliares, son los principales factores que determinan la solubilización de carotenoides antes de su absorción. Especialmente, las sales biliares secretadas en presencia de grasas facilitan la formación de micelas en el lumen intestinal durante la digestión, y cuando los carotenoides llegan a este punto, son solubilizados junto con la grasa en las micelas (Tyssandier *et al.*, 2001). Huo *et al.* (2007) observaron que la presencia de grasa o aceite en los alimentos debía estar entre un 0.5-1% para favorecer así la solubilización de los carotenoides en las micelas. La adición de aceite de oliva ( $X_2$ ) es considerado un IF durante la ID y MF, ya que el aceite de oliva facilita la solubilización del licopeno, ejerciendo un efecto positivo en la cuantificación de ambos isómeros durante la ID, aunque con un efecto contrario en el caso de la MF. La cantidad de aceite presente en las muestras fue mayor que el porcentaje recomendado (Huo *et al.*, 2007), lo que resulta en un efecto positivo en la cantidad cuantificada de licopeno durante la ID, pero disminuyendo la solubilización del licopeno en las micelas. Este comportamiento podría ser debido al hecho de que un mayor contenido de aceite necesita de más sales biliares para formar las micelas, por lo que en los ensayos con alto nivel de aceite, la solubilización del licopeno en la fase micelar se ve probablemente disminuida porque la cantidad de sales biliares no es suficiente para la formación de micelas (Tyssandier *et al.*, 2001). Otro factor que es considerado como IF para *all-trans*-licopeno cuantificado en la MF, es la adición de pepsina ( $X_8$ ). Una alta concentración de pepsina durante la digestión gástrica favorece la rotura de los complejos licopeno-proteína, resultando en una mejor cuantificación del licopeno presente en los alimentos. Durante la digestión *in vitro* la concentración de sales biliares ( $X_8$ ) mostró un efecto negativo y significativo sobre la cantidad de isómeros *cis* de licopeno en la ID y en el porcentaje de isomerización de la MF. Reboul *et al.* (2006) determinaron que las sales biliares favorecen la disponibilidad *in vitro* de licopeno y otros carotenoides, mediante el aumento de la solubilización en la fase micelar. Sin embargo, la concentración de las sales biliares no tuvo influencia significativa sobre *all-trans*-licopeno, en ninguna de las fracciones analizadas (ID y MF), aunque si tienen que ser considerados como un IF con efecto negativo para el *cis*-licopeno, lo cual sería

asociado con una reducción de la disponibilidad de licopeno. Aunque se ha detectado un porcentaje mayor de isómeros *cis* en las micelas, en comparación con las muestras de ID, el alto nivel de sales biliares no favorece este fenómeno, y la solubilización puede estar favorecida por las formas químicas. La adición de colipasa ( $X_9$ ) tiene un efecto negativo sobre la cantidad de *all-trans*-licopeno después de la ID, porque este co-factor proteico activa la lipasa pancreática favoreciendo la hidrólisis de la grasa y dificultando la solubilización del licopeno en la fase micelar. La lipasa pancreática es inactivada por las sales biliares, dado que impiden la adsorción de la lipasa a las micelas, y la función de la colipasa parece ser para reactivarla favoreciendo esta unión (Borgstrom y Erlanson, 1973; Maylie *et al.*, 1973). El tiempo de la ID también se considera como un IF para el contenido total de *all-trans*-licopeno en la ID y en el porcentaje de isomerización de la MF, ya que cuanto más largo es el periodo de digestión más se aumenta el porcentaje de isomerización en las micelas (Tyssandier *et al.*, 2001). Sin embargo, la velocidad ( $X_{11}$ ) aplicada durante la digestión *in vitro* no tienen efecto sobre las respuestas medidas, ya sea en ID o MF.

Teniendo en cuenta la  $R^2$  (**Tabla 5**), durante la GD los factores considerados como IF ( $X_1$  y  $X_2$ ) tienen un bajo efecto en las respuestas medidas, con unos valores de  $R^2$  de 0.32, 0.14 y 0.10 para el *all-trans*-licopeno, los isómeros *cis* y el porcentaje de isomerización respectivamente. Sin embargo, los IF de la ID ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_4$ ,  $X_8$ ,  $X_9$  y  $X_{10}$ ) explicaron la variación del 60% de *all-trans*-licopeno, del 65% de *cis*-licopeno y del 62% del porcentaje de isomerización. Para el contenido de licopeno en la MF, los valores de  $R^2$  fueron 0.44, 0.37 y 0.51 para el *all-trans*-licopeno, *cis*-licopeno y para el porcentaje de isomerización. Estos datos mostraron que los factores que afectan a la disponibilidad de licopeno durante la digestión *in vitro* están relacionados con la digestión intestinal, tal y como se ha descrito en los estudios *in vivo*.

De este estudio se concluye que muchos de los factores relacionados con la digestión intestinal afectan a la disponibilidad *in vitro* del licopeno, incluyendo los principales factores que han sido descritos en condiciones fisiológicas. El modelo *in vitro* podría ser usado como método para estimar la accesibilidad y la disponibilidad del licopeno para ser absorbido, teniendo en consideración las reacciones de isomerización, aunque las condiciones deben ser estandarizadas para obtener resultados comparables entre diferentes estudios. Este estudio representa un primer paso para optimizar este método *in vitro* a fin de estandarizar este procedimiento de análisis.

**Tabla 29.** Contenido en *all-trans*-licopeno (R<sub>1</sub>) y *cis*-licopeno (R<sub>2</sub>) expresado como mg/Kg de peso fresco y porcentaje de isomerización (R<sub>3</sub>) tras la digestión gástrica (Muestras de GD).

Muestra	Ensayo	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
13	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	155.01	14.84	9.59
22	2	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	100.10	37.82	37.80
2	3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	74.75	35.12	46.98
5	4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	104.70	31.75	30.32
28	5	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	79.82	23.30	29.20
4	6	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	86.69	12.49	14.40
12	7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	88.10	17.86	20.27
20	8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	101.80	11.98	11.77
29	9	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	92.57	9.43	10.19
32	10	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	92.70	12.65	13.64
17	11	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	84.59	14.83	17.52
9	12	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	76.15	32.28	42.39
3	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	82.71	29.61	35.80
15	14	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	99.45	9.48	9.53
1	15	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	108.20	14.32	13.24
7	16	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	98.46	13.69	13.90
21	17	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	115.30	21.35	18.52
25	18	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	120.70	13.26	10.99
30	19	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	84.87	12.43	14.64
6	20	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	110.20	11.22	10.19
16	21	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	132.40	9.96	7.53
23	22	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	120.80	16.16	13.38
27	23	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	120.40	11.56	9.61
31	24	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	112.60	11.80	10.48

<sup>1</sup>Valores medios de tres medidas

**Tabla 30.** Resultados obtenidos para *all-trans*-licopeno (R<sub>1</sub>), *cis*-licopeno (R<sub>2</sub>) y porcentaje de isomerización (R<sub>3</sub>) tras la digestión intestinal (Muestras de ID), donde los datos son expresados en mg/Kg de peso fresco.

Muestra	Ensayo	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
13	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	148.30	7.21	4.86
22	2	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	97.66	5.55	5.68
2	3	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	157.11	6.49	4.13
5	4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	131.10	14.54	11.07
28	5	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	72.63	12.99	17.88
4	6	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	90.45	7.96	8.80
12	7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	100.73	5.16	5.12
20	8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	126.12	6.65	5.28
29	9	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	112.20	6.84	6.09
32	10	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	116.10	6.31	5.43
17	11	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	101.91	6.28	6.17
9	12	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	95.27	14.78	15.52
3	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	95.27	9.11	9.56
15	14	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	101.20	17.22	17.04
1	15	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	110.33	16.71	15.14
7	16	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	115.84	9.42	8.14
21	17	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	106.34	9.01	8.48
25	18	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	129.41	10.85	8.39
30	19	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	122.32	12.58	10.29
6	20	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	117.54	8.70	7.40
16	21	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	127.91	10.65	8.33
23	22	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	111.73	13.12	11.75
27	23	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	127.24	9.64	7.58
31	24	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	114.71	9.12	7.95

<sup>1</sup> Valores medios de tres medidas

**Tabla 31.** Resultados obtenidos para *all-trans*-licopeno (R1), *cis*-licopeno (R2) y porcentaje de isomerización (R3) en la fracción micelar (Muestras de MF), donde los datos son expresados en mg/Kg de peso fresco.

Muestra	Ensayo	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
13	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	11.78	0.38	3.22
22	2	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	7.48	0.14	1.91
2	3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	6.22	0.23	3.7
5	4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	5.15	0.24	4.6
28	5	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	13.77	0.92	6.67
4	6	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	3.47	0	0
12	7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	5.18	0.41	7.9
20	8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	13.56	1.04	7.64
29	9	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	3.63	0.4	10.97
32	10	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	2.27	0.3	13.09
17	11	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	15.81	1.5	9.46
9	12	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	2.41	0.65	26.94
3	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13.51	1.47	10.89
15	14	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	4.65	0.9	19.28
1	15	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	3.06	0.38	12.37
7	16	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	19.75	2.98	15.1
21	17	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	19.18	2	10.44
25	18	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	10.26	1.2	11.72
30	19	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	5.26	1.43	27.19
6	20	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	4.95	0.65	13.24
16	21	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	2.48	0.36	14.35
23	22	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.64	0	0
27	23	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	0.85	0	0
31	24	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	6.72	1.01	15.01

<sup>1</sup> Valores medios de tres medidas

**Tabla 32.** Efectos de los distintos factores sobre el licopeno (mg/Kg) extraído y determinado tras la digestión gástrica (GD), digestión intestinal (ID) y en la fracción micelarizada (MF), en términos de *all-trans*-licopeno (E), *cis*-licopeno (Z) y porcentaje de isomerización (%). Un factor fue considerado como Factor de Influencia (IF) cuando  $p < 0.200$ .

Factores	Respuestas								
	GD			ID			MF		
	E	Z	%	E	Z	%	E	Z	%
X <sub>1</sub>	-1.71			-1.74	0.39	4.04			
X <sub>2</sub>	1.03			1.18	0.28		-0.41	-0.05	
X <sub>3</sub>									
X <sub>4</sub>				-1.04		1.47			4.10
X <sub>5</sub>							0.46		
X <sub>6</sub>									
X <sub>7</sub>									
X <sub>8</sub>					-0.17				-3.87
X <sub>9</sub>				-0.99					
X <sub>10</sub>				0.91					3.13
X <sub>11</sub>									
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.32</b>	<b>0.14</b>	<b>0.10</b>	<b>0.60</b>	<b>0.65</b>	<b>0.62</b>	<b>0.44</b>	<b>0.37</b>	<b>0.51</b>

---

# Conclusiones

---

## EXPERIENCIA N°1

- El tratamiento con radiación UV-C tiene un efecto beneficioso sobre el contenido de licopeno, los compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante del tomate, tanto en frutos inmaduros como maduros. Sin embargo, no se puede describir un efecto claro del tratamiento UV-C sobre los compuestos fenólicos individuales mayoritarios del tomate.
- Los resultados indican que existe un efecto potenciador de la luz UV-C en la reacción de isomerización del licopeno, por lo que puede considerarse como un tratamiento post-cosecha para incrementar el valor nutricional del tomate y sus productos derivados, al incrementar los isómeros del licopeno con mayor biodisponibilidad.

## EXPERIENCIA N°2.

- La temperatura de almacenamiento no afectan de forma relevante a la estabilidad del licopeno, sus isómeros *all-trans* y *cis*, compuestos fenólicos totales y flavonoides en el zumo de tomate, ya que la concentración se mantiene más o menos constante tras el almacenamiento de vida comercial (12 meses). Desde el punto de vista de calidad que permita garantizar la cantidad de compuestos bioactivos del zumo de tomate, no hay ninguna ventaja en utilizar el almacenamiento en refrigeración durante la vida comercial, considerando el almacenamiento a temperatura ambiente adecuado.
- Al contrario de los otros compuestos antioxidantes, la vitamina C añadida en el zumo de tomate envasado en tetrabrik se degrada de forma proporcional al tiempo y temperatura de almacenamiento, siendo mayor la reducción en las muestras de zumo de tomate almacenadas a 37°C.

- La actividad antioxidante hidrofílica en los zumos enriquecidos con vitamina C disminuye de forma proporcional a la pérdida de este antioxidante. Sin embargo en las muestras de zumo de tomate sin vitamina C añadida, la actividad antioxidante hidrofílica está determinada por el contenido de compuestos fenólicos totales, manteniendo unos valores constantes durante el almacenamiento. La actividad antioxidante lipofílica se mantiene constante a lo largo de la vida comercial, con una pequeña contribución a la actividad antioxidante total.

### EXPERIENCIA N°3

- Las enzimas LOX y HPL son enzimas termolábiles y disminuyen su actividad enzimática tras el procesado térmico del tomate a 96°C durante 30s para elaborar zumo de tomate refrigerado. Sin embargo, queda una reducida actividad residual tras el tratamiento que puede afectar a la calidad organoléptica del zumo de tomate durante su almacenamiento.
- Los cambios observados en los compuestos volátiles están correlacionados con la actividad residual de las enzimas LOX y HPL y con la degradación del licopeno durante el almacenamiento, originando el incremento de la 6-metil-5-hepten-2-ona.
- Los cambios en los compuestos volátiles, principalmente del hexanal y (*Z*)-3-hexenal, determinan la pérdida en la calidad organoléptica de zumo refrigerado de tomate, al disminuir las notas de aroma a tomate fresco, dulce y afrutado.

### EXPERIENCIA N°4

- Las condiciones de pH de la digestión gástrica *in vitro* favorece la formación de isómeros *cis* del licopeno, aunque es un proceso reversible ya que vuelve a aumentar el isómero *trans* cuando se incrementa el pH en la fase de digestión intestinal. Estos resultados hacen pensar que parte de la isomerización *in vivo* puede tener lugar durante la fase de digestión gástrica en el estómago

- La disponibilidad *in vitro* del licopeno evaluada en función del porcentaje de isómeros *cis* está determinada por la presencia de aceite en la dieta y por factores relacionados con la digestión intestinal que afectan a la incorporación de licopeno en la micela, tal y como se ha descrito en estudios *in vivo*.
- Dado que en la bibliografía científica se utilizan diferentes métodos, las condiciones de digestión *in vitro* deberían de ser estandarizadas buscando condiciones fisiológicas con el objetivo de poder comparar los resultados obtenidos en los diferentes estudios.



---

# Resumen

---

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*) es uno de los vegetales más consumidos en el mundo y por lo tanto contribuye a la ingesta de compuestos bioactivos específicos que son importantes para la salud humana. Con independencia de su contenido en potasio o en vitaminas antioxidantes como las vitaminas C o E, el tomate destaca por su contenido en carotenoides, como el licopeno o  $\beta$ -caroteno, y una amplia variedad de compuestos fenólicos, que por su marcado carácter antioxidante hacen de este fruto y de sus productos derivados un alimento importante dentro de la saludable dieta mediterránea.

El objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido el estudio de la optimización del contenido en licopeno y otros compuestos bioactivos en zumo de tomate mediante tratamientos y procedimientos post-cosecha de producto fresco (conservación y radiación ultravioleta), control del almacenamiento de distintos tipos de zumo y la posterior evaluación de los principales factores que afectan a la disponibilidad *in vitro*.

En la primera experiencia se ha estudiado el efecto de la aplicación del tratamiento post-cosecha con radiación UV-C en el contenido de compuestos bioactivos y especialmente en el licopeno, sus isómeros y los compuestos fenólicos individuales, de los tomates verdes maduros y los tomates rojos. La exposición de los tomates a diferentes dosis de radiación UV-C (1, 3 y 12 kJ/m<sup>2</sup>) tiene un efecto positivo en la formación de licopeno total, en sus isómeros *cis* y en el contenido total de compuestos fenólicos por los que puede considerarse como un tratamiento para incrementar las propiedades funcionales del tomate antes de su procesado.

En la experiencia del almacenamiento se ha evaluado la evolución del licopeno, compuestos fenólicos totales, flavonoides y vitamina C en el zumo de tomate envasado en botella de cristal y tetrabrik, a lo largo de los 12 meses de vida comercial y almacenado a diferentes temperaturas (8, 22 y 37°C). En general, todos los compuestos bioactivos antioxidantes se mantienen relativamente constantes durante el periodo de almacenamiento a excepción de la vitamina C que disminuye en los zumos en tetrabrik (con vitamina C añadida) de forma proporcional al tiempo y temperatura de almacenamiento. Igualmente, se observa una correlación entre la

actividad antioxidante y la presencia de compuestos bioactivos hidrofílicos. Además, en zumo de tomate refrigerado hemos estudiado la degradación de licopeno durante la vida comercial (45 días) y su relación con el perfil de compuestos volátiles y las pérdidas de hexanal y el (Z)-3-hexenal que proporcionan las características de producto fresco.

En la última experiencia se han identificado los factores determinantes en la disponibilidad *in vitro* del licopeno y su relación con el grado de isomerización. Los principales factores que afectan a la isomerización del licopeno, hecho que facilita su absorción, están relacionados con la presencia de aceite, el pH gástrico y el proceso de digestión intestinal facilitando así los efectos beneficiosos que tiene el licopeno para la salud.

---

# Summary

---

The tomato (*Solanum lycopersicum L.*) is one of the most consumed vegetables in the world and therefore contributes to intake of specific bioactive compounds that are important to human health. Regardless of its potassium content or antioxidant vitamins such as vitamins C and E, tomato is known for its content of carotenoids, such as lycopene or  $\beta$ -carotene, and a wide variety of phenolic compounds. The antioxidant activity of these compounds provokes tomato and tomato products are considered as an important food in the healthy Mediterranean diet.

The aim of this PhD thesis has been the study of the optimization of lycopene content and other bioactive compounds in tomato juice by postharvest treatments of fresh tomato (conservation and ultraviolet radiation), controlled storage of different types of juice and the subsequent evaluation of the main factors affecting the *in vitro* availability.

In the first experiment we studied the effect of the application of post-harvest treatment with UV-C radiation on the content of bioactive compounds and especially lycopene isomers and individual phenolic compounds, using mature green and red tomatoes. Tomatoes exposed to different doses of UV-C radiation (1, 3 and 12 kJ/m<sup>2</sup>) has a positive effect on the overall formation of lycopene in their *cis* isomers and the total content of phenolic compounds which can be considered as a treatment to increase the functional properties of tomato before processing.

In the experience of storage was evaluated the evolution of lycopene, total phenolic compounds, flavonoids and vitamin C in the packaged tomato juice, using tetrabrik and glass bottle, over the commercial life of 12 months and stored at different temperatures (8, 22 and 37°C). In general, all antioxidants bioactive compounds remain relatively constant during the period of storage with the exception of vitamin C, which decreases in fruit juices stored in tetrabrik (with vitamin C added) according to the storage time and temperature. Likewise, there is a correlation between antioxidant activity and the presence of hydrophilic bioactive compounds. Furthermore, we have studied lycopene degradation during the shelf life (45 days) in refrigerated tomato juice

and its relation with the volatile compounds losses, mainly those that confer fresh characteristics, such as hexanal and the (*Z*)-3-hexenal.

In the last experience we have identified the factors affecting the *in vitro* availability of lycopene and its relationship with the degree of isomerization. The main factors affecting the isomerization of lycopene, which facilitates their absorption, is related to the presence of oil, the pH of gastric and intestinal digestion process, thereby facilitating the beneficial effects of lycopene for health.

---

# *Bibliografía*

---

- Abe C, Ikeda S, Uchida T, Yamashita K, Ichikawa T (2007). Triton WR1339, an inhibitor of Lipoprotein Lipase, decreases vitamin E concentration in some tissues of rats by inhibiting its transport to liver. *J Nutr.* 137:345-50
- Abegaz EE, Tandon KS, Scott JW, Baldwin EA, Shewfelt RL (2004). Partitioning taste from aromatic flavor notes of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill) to develop predictive models as a function of volatile and nonvolatile components. *Postharv. Biol. Technol.* 34:227-235
- Abushita AA, Daood HG, Biacs, PA (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
- Abushita AA, Hebshi EA, Daood H, Biacs PA (1997). Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. *Food Chem.* 60:207-212
- Adalid AM, Roselló S, Nuez F (2010). Evaluation and selection of tomato accessions (*Solanum* section *Lycopersicon*) for content of lycopene,  $\beta$ -carotene and ascorbic acid. *J Food Comp Anal.* 23(6): 613–618
- Agarwal S, Rao AV (2000). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ.* 163(6):739-744
- Agarwal A, Shen H, Agarwal S, Rao AV (2001). Lycopene content of tomato products: its stability, bioavailability and in vivo antioxidant properties. *J Med Food.* 4:9-15
- Aguiló-Aguayo I, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O (2010). Volatile compounds and changes in flavour-related enzymes during cold storage of high-intensity pulsed electric field and heat-processed tomato juices. *J Sci Food Agric.* 90:1597–1604
- Ahuja KDK, Pittaway JK, Ball MJ (2006). Effects of olive oil and tomato lycopene combination on serum lycopene, lipid profile, and lipid oxidation. *Nutrition.* 22:259–265

- Alonso A, García-Aliaga R, García-Martínez S, Ruiz JJ, Carbonell-Barrachina AA (2009). Characterization of Spanish tomatoes using aroma composition and discriminant analysis. *Food Sci Technol Int.* 15(1):47–55
- Alonso FJ, Souza-Egipsy V (1998). En: *Guía completa de hortalizas y verduras. La huerta bella.* Editorial Agata. Madrid, España
- Al-Wandawi H, Abdul-Rahman M, Al Shaikhly K (1985). Tomato processing wastes as essential raw materials source. *J Agric Food Chem.* 33:804–807
- Anese M, Sovrano S (2006). Kinetics of thermal inactivation of tomato lipoxygenase. *Food Chem.* 95:131–137
- Anthon GE, Barrett DM (2003). Thermal inactivation of lipoxygenase and hydroperoxytreinoic acid lyase in tomatoes. *Food Chem.* 81:275-279
- Antony J (2003). Screening designs, In *Design of experiments for engineers and scientists*, p. 44-53. Butterworth-Heinemann, Amsterdam
- Arakawa O (1988). Photoregulation of anthocyanin synthesis in apple fruit under UV-B and light red. *Plant & Cell Physiology*, 29, 1385–1389. Arias R, Lee TC, Logendra L, James (2000). Correlation of lycopene measured by HPLC with the L\*, a\*, b\* colour readings of a hydroponic tomato and the relationship of maturity with colour and lycopene content. *J Agric Food Chem.* 48:1697-1702
- Armendariz R, Macua JI, Lahoz I, Gamica J, Bozal JM (2006). Lycopene content in commercial tomato cultivars for paste in Navarra. *Acta Hort.* 724:259–262
- Arnao MB, Cano A, Acosta M (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* 73:239–244
- Bahorun T, Luximon A, Crozier A, Aruoma O (2004). Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *J Sci Food Agric.* 84:1553-1561
- Bai J, Baldwin EA, Imahori Y, Kostenyuk I, Burns J, Brecht JK (2011). Chilling and heating may regulate C6 volatile aroma production by different mechanisms in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit. *Postharvest Biol Tec.* 60:111–120
- Bakhshi D, Arakawa O (2006). Induction of phenolic compounds biosynthesis with light irradiation in the flesh of red and yellow apples. *JAH.* 8(2):101–104

- Baldwin EA, Goodner K, Plotto A (2008). Interaction of volatiles, sugars and acids on perception of tomato aroma and flavor descriptors. *J Food Sci.* 73:S294-S307
- Baldwin EA, Nisperos-Carriedo MO, Baker R, Scott JW (1991a). Qualitative analysis of flavor parameters in six Florida tomato cultivars. *J Agric Food Chem.* 39:1135-1140
- Baldwin EA, Nisperos-Carriedo MO, Moshonas MG (1991b). Quantitative analysis of flavor and volatiles and for certain constituents of two tomato cultivars during ripening. *J Am Soc Hortic Sci.* 116:265-269
- Baldwin EA, Scott JW, Shewmaker CK, Schuch W (2000). Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *Hortscience.* 35:1013–1022
- Barón L, Romero-Vecchione E, López F, Apitz R (2004). Efecto sinérgico antioxidante de las vitaminas E y C sobre la lipoproteína de baja densidad en fumadores y no fumadores. *Acta Cient Venez.* 55(1):62-73
- Bauernfeind JC (1972). Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *J Agric Food Chem.* 20:456-473
- Baysal T, Demirdöven A (2007). Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme Microb Technol.* 40:491-496
- Beecher GR (1998). Nutrient content of tomatoes and tomato products. *P Soc Exp Biol Med.* 218(2): 98-100
- Belitz HD, Grosch W (1998). *Química de los alimentos*, 2ª ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España
- Ben-Yehoshua S (2003). Effects of postharvest heat and UV applications on decay, chilling injury, and resistance against pathogens of citrus and other fruits and vegetables. *Proc Int Conf Postharvest Unlimited.* B.E. Verlinden, B.M. Nicolai and J. de Berdemaeker (Eds). *Acta Hortic.* 9:159-173
- Benzie IF, Strain JJ (1997). Acute post-ingestion changes in plasma ascorbic acid concentration: relationship to dose and to existing body stores. *Nutr Res.* 17:187–190

- Benzie IF, Strain JJ (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 299:15—27
- Beutner S, Bloedorn B, Frixel S, Blanco IH, Hoffmann T, Martin H, Mayer B, Noack P, Ruck C, Schmidt M, Schulke I, Sell S, Ernst H, Haremza S, Seybold GN, Sies H, Stahl W, Walsh R (2001). Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: Carotenoids, flavonoids, phenols, and indigoids. The role of  $\beta$ -carotene in antioxidant functions. *J Sci Food Agr.* 81:559-568
- Bieger J, Cermak R, Blank R, de Boer VC, Hollman PC, Kamphues J, Wolfram S (2008). Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J Nutr.* 138:1417-1420
- Biesalski HK, Böhles H, Esterbauer H, Fürst P., Gey F, Hundsdörfer G, Kasper H, Sies H, Weisburger J (1997). Antioxidant vitamins in prevention. *Clin Nutr.* 16:151–155
- Biesalski HK, Chichili GR, Frank J, von Lintig J, Nohr D (2007). Conversion of  $\beta$ -Carotene to Retinal Pigment. *Vitam Horm.* 75:117–130
- Biruete GA, Juárez HE, Sierio OE, Romero VR, Silencio B JL (2009). Los Nutraceuticos. Lo que conviene saber. *Rev Mex Ped.* 76(3):136-145
- Böhm V (2001). Use of column temperature to optimise carotenoid isomer separation by C30 high performance liquid chromatography. *J Separ Sci.* 24:955–959
- Böhm V, Puspitasari-Nienaber NL, Ferruzzi MG, Schwartz SJ (2002). Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of R-carotene,  $\beta$ -carotene, lycopene, and zeaxanthin. *J Agric Food Chem.* 50:221-226
- Boileau TWM, Boileau AC, Erdman JW (2002). Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. *Exp Biol Med.* 227:914-919
- Boileau AC, Merchen NR, Wasson K, Atkinson CA, Erdman JW Jr (1999). Cis-Lycopene is more biavailable than *trans*-lycopene in vitro and in vivo lymph-cannulated ferrets. *J Nutr.* 129:1176–1181

- Bolli A, Marino M, Rimbach G, Fanali G, Fasano M, Ascenzi P (2010). Flavonoid binding to human serum albumin. *Biochem Biophys Res Commun.* 398:444-449
- Borgstrom B, Erlanson C, (1973). Pancreatic Lipase and colipase. Interactions and effects of bile salts and other detergents. *Europ J Biochem.* 37:60-68
- Boukobza F, Taylor AJ (2002). Effect of postharvest treatment on flavour volatiles of tomatoes. *Postharv Biol Technol.* 25:321-331
- Box GEP and Hunter JS (1961). The  $2^{k-p}$  fractional factorial designs: part I. *Techometrics.* 3:311-351
- Bramley PM (2000). Is lycopene beneficial to human health?. *Phytochem.* 54:233–6
- Brandt S, Pek Z, Barna E, Lugasi A, Helyes L (2006). Lycopene content and colour of ripening tomatoes as affected by environmental conditions. *J Sci Food Agric.* 86 (4) 568–572
- Brauss MS, Linforth RST, Taylor AJ (1998). Effect of variety, time of eating, and fruit-to-fruit variation on volatile release during eating of tomato fruits (*Lycopersicon esculentum*). *J Agric Food Chem.* 46:2287-2292
- Brigelius-Flohe´ R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg J-M, Azzi A (2002). The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am. J. Clin. Nutr.* 76:703-716
- Britton G (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9:1551–1558
- Schiedt K, Liaaen-Jensen S (1995). Isolation and Analysis. In *Carotenoids*, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H.Pfander. 5(81-107)
- Brown MJ, Ferruzzi MG, Nguyen ML, Cooper DA, Eldridge AL, Schwartz SJ, White WS (2004). Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *Am J Clin Nutr.* 80:396–403
- Bruhn C M, Feldmann N, Garlitz C, Harwood J, Ivans E, Marshall M, Riley A, Thurber D, Williamson E (1991). Consumer perception of quality: apricots, cantaloupes, peaches, pears, strawberries, and tomatoes. *J Food Quality.* 14:187-195

- Bucheli P, Voirol E, de la Torre R, Lopez J, Rytz A, Tanksley SD, Petiard V (1999). Definition of Nonvolatile Markers for Flavor of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as Tools in Selection and Breeding. *J Agric Food Chem.* 47:659-664
- Bugianesi R, Salucci M, Leonardi C, Ferracane R, Catasta G, Azzini E, Maiani G (2004). Effect of domestic cooking on human bioavailability of naringenin, chlorogenic acid, lycopene and  $\beta$ -carotene in cherry tomatoes. *Eur J Nutr.* 43(6):360-6
- Burns J, Paul D, Fraser P, Bramley M (2003). Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry.* 62:939–947
- Burri BJ, Chapman MH, Neidlinger TR, Seo JS, Ishida BK (2009). Tangerine tomatoes increase total and tetra-cis-lycopene isomer concentrations more than red tomatoes in healthy adult humans. *Int Food Sci. Nutr.* 60:1-16
- Buttery RG (1993). Quantitative and sensory aspects of flavor of tomato and other vegetables and fruits. *En Flavor Science: Sensible Principles and Techniques.* Acree TE, Teranishi R. (Eds.). Amer. Chem. Soc., Washington, D.C., pp. 259-281.
- Buttery RG, Ling L (1993a). Enzymatic production of volatiles in tomatoes, in *Progress in Flavor Precursor Studies*, ed. by Schreier P and Winterhalter P. Allured Publishing, Carol Stream, IL, pp. 137–146
- Buttery RG, Ling L (1993b). Volatile components of tomato fruit and plant parts: relationship and biogenesis. In: *Bioactive Volatile Compounds From Plants.* R. Teranishi, R.G. Buttery, and H. Sugisawa (Eds), ACS, Washington, D.C., 22-34
- Buttery RG, Teranishi R, Ling LC (1987). Fresh tomato aroma volatiles: a quantitative study. *J Agric Food Chem.* 35:540-544
- Buttery RG, Teranishi R, Ling LC, Flath RA, Stern DJ (1988). Quantitative studies on origins of fresh tomato aroma volatiles. *J. Agric. Food Chem.* 36:1247-1250

- Cabibel M, Ferry P (1980). Evolution de la teneur en caroténoïdes de la tomate en fonction de la maturation et des conditions culturales. *Ann Techn Agric.* 29(1):27–46
- Cano A, Acosta M, Arnao MB (2003). Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity changes during on-vine ripening of tomatoes (*Lycopersicum esculentum*, Mill.). *Postharv Biol Technol.* 28:59–65
- Cantore V, Boari F, Vanadia S, Pace B, Depalma E, Leo L, Zacheo G (2008). Evaluation of yield and qualitative parameters of high lycopene tomato cultivars. *Acta Hortic.* 789:173–180
- Cantos E, García-Viguera C, de Pascual-Teresa S, Tomás-Barberán FA (2000). Effect of post-harvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *J Agric Food Chem.* 48(10):4606-12
- Cantrell A, McGarvey DJ, Truscott TG, Rancan F, Boehm F (2003). Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. *Arch Biochem Biophys.* 412:47–54
- Calligaris S, Falcone P, Anese (2002). Color changes of tomato purees during storage at freezing temperatures. *J Food Sci.* 67(6):2432-2435
- Caris-Veyrat C, Schmid A, Carail M, Bohm V (2003). Cleavage products of lycopene produced by in vitro oxidations: characterization and mechanism of formation. *J Agric Food Chem.* 51:7318-7325
- Carrasco-Ríos (2009). Effect of ultraviolet-B radiation in plants. *Idesia (Arica).* 27(3):59–76
- Carrillo-Lopez A, Yahia EM (2009). Qualitative and quantitative changes in carotenoids and phenolic compounds in tomato fruit during ripening. *Proceedings of the 6th International Post-harvest Symposium, Antalya, Turkey, 8–12 April, 2009 (pp. 175).*
- Cerdá B, Tomás-Barberán FA, Espín JC (2005). Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *J Agric Food Chem.* 53:227-235

- Charles MT, Arul J (2007). UV treatment of fresh fruits and vegetables for improved quality: A status report. *Stewart Posthar Rev.* 3(6):1–8
- Chen G, R Hackett, D Walker, A Taylor, Z Lin, D Grierson (2004). Identification of specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiol.* 136:2641-2651
- Chung T, Hayase F, Kato H (1983). Volatile Components of Ripe Tomatoes and Their Juices, Purees and Pastes. *Agric Biol Chem.* 47 (2), 343-351
- Cisneros-Zevallos L (2003). The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding-value of fresh fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 68:1560-1565.
- Clifford MN (2004). Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med.* 70:1103-1114
- Clinton SK (1998). Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr Rev.* 56:35-51
- Cody V, Middleton E Jr, Harborne JB (1986). *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships.* New York, Alan Liss, Inc.
- Coodley GO, Coodley MK, Nelson HD (1995). Micronutrients in HIV-infected women. *J Womens Health.* 4:303-311
- Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, Remesy C (2001). Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. *J Nutr.* 131:2109–2114
- Crozier A, Lean ME, Mc Donald MS, Black C (1997). Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. *J Agric Food Chem.* 43:590–595
- D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R (2010). Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int J Mol Sci.* 11:1321-1342

- Davey MW, Van Montagu M, Inze D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, JJ Benzie I (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J Sci Food Agric.* 80:825-850
- Davies JN, Hobson GE (1981). The constituents of tomato fruit - the influence of environment, nutrition, and genotype. *Crit Rev Food Sci.* 15(3):205-280
- Dávila-Aviña JE, González-Aguilar GA, Ayala-Zavala JF, Sepúlveda DR, Olivas GI (2011). Compuestos volátiles responsables del sabor del tomate. *Rev Fitotec Mex.* 34(2):133–143
- Day AJ, Bao Y, Morgan MR, Williamson G (2000a). Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic Biol Med.* 29:1234-1243
- Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, McLauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G (2000b). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 468:166–170
- Del Rio D, Costa LG, Lean ME, Crozier A (2010). Polyphenols and health: What compounds are involved?. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 20:1–6
- Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem.* 50:3010-3014
- Di Mascio P, Kaiser S, Sies H (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys.* 274:532–538
- Dorais M, Ehret DL, Papadopoulos AP (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochem Rev.* 7:231–250
- Dorais M, Papadopoulos A P, Gosselin A (2001). Greenhouse tomato fruit quality. *Hort Rev.* 26:239-319
- Dudareva N, E Pichersky (2008). Metabolic engineering of plant volatiles. *Curr Op Biotechnol.* 19:181-189

- Dufour C, Dangles O (2005). Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 1721:164-173
- Dumas Y, Dadomo M, Di Lucca G, Grolier P (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *J Sci Food Agric* 83(5): 369-382
- During A, Dawson HD, Harrison EH (2005a). Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-B1, NPC1L1 and ABCA1 is down regulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. *J Nutr*. 135:2305–12
- During A, Harrison EH (2004). Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: Insights from cell culture. *Arch Biochem Biophys*. 430:77–88
- During A, Harrison EH (2005b). An in vitro model to study the intestinal absorption of carotenoids. *Food Res Int*. 38:1001–1008
- Duthie GG, Gardner PT, Kyle JAM (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet?. *Proc Nutr Soc*. 62:599-603
- Egea JM (2010) Biodiversidad Agraria, Agroecología Y Desarrollo Rural. El Caso De Tierra De Iberos Y Vegas Del Segura (Murcia). Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Erdman JW Jr (2005). How do nutritional and hormonal status modify the bioavailability, uptake, and distribution of different isomers of lycopene?. *J Nutr*. 135:2046S–2047S
- Esteve MJ, Farré R, Frígola A, López JC, Romera JM, Ramírez M, Gil A (1995). Comparison of voltammetric and high performance liquid chromatographic methods for ascorbic acid determination in infant formulas. *Food Chem*. 52:99–102
- Failla ML, Chitchumroonchokchai C, Ishida BK (2008). In vitro micellarization and intestinal cell uptake of cis isomers of lycopene exceed those of all-trans lycopene. *J Nutr*. 138:482–486
- Fan X (2005). Antioxidant capacity of fresh-cut vegetables exposed to ionizing radiation. *J Sci Food Agric*. 85:995–1000

- Fanasca S, Colla G, Maiani G, Venneria E, Roupael Y, Azzini E, Saccardo F (2006). Changes in Antioxidant Content of Tomato Fruits in Response to Cultivar and Nutrient Solution Composition. *J Agric Food Chem.* 54(12):4319–4325
- FAOSTAT (2010). Agricultural production database. Available at: [http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#\\_anchor](http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#_anchor)
- Fargnoli J, Kim Y, Mantzoros C (2009) Mediterranean Diet in Disease Prevention: Current Perspectives. *Nutrition and Health.* Part 5, 263-278, DOI: 10.1007/978-1-60327-453-1\_14
- Favati F, Lovelli S, Galgano F, Miccolis V, Di Tommaso T, Candido V (2009). Processing tomato quality as affected by irrigation scheduling. *Sci Hortic.* 122(4):562–571, ISSN: 0304-4238
- Favell D, Fletcher J (2000). Review. Plant l-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J Sci Food Agric.* 80:825-860
- Felgines C, Talavera S, Texier O, Gil-Izquierdo A, Lamaison JL, Remesy C (2005). Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *J Agric Food Chem.* 53, 7721–7727
- Fernandez-Garcia E, Carvajal-Lerida I, Jaren-Galan M, Garrido-Fernandez J, Perez-Galvez A, Hornero-Mendez D (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Res Int.* 46(2):438-450
- Fernández-Ruiz V (2003). Selección de índices de calidad para la mejora de tomate. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España
- Fernández-Ruiz V, Cámara M, Quintela JC (2007). Ingredientes bioactivos del tomate: el licopeno. *Nutr Clin Diet Hosp.* 27(3):36-40
- Feruzzi MG, Lumpkin JL, Schwartz SJ, Failla M (2006). Digestive stability, micellarization and uptake of b-carotene isomers by Caco-2 human intestinal cells. *J Agric Food Chem.* 54:2780-2785

- Fielding JM, Rowley KG, Cooper P, O'Dea K (2005). Increases in plasma lycopene concentration after consumption of tomatoes cooked with olive oil. *Asia-Pac J Clin Nutr.* 14:131–136
- FNB (2000). Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Institute of Medicine. National Academy Press. Washington, D.C.
- Foy CJ, Passmore AP, Vahidassr MD, Young IS, Lawson JT (1999). Plasma chain - breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. *QJM.* 92:39–45
- Foyer CH, Descourvieres P, Kunert KJ (1994). Protection against oxygen radicals: An important defense mechanism studied in transgenic plant. *Plant, Cell & Environ.* 17:507–523
- Fraser PD, Truesdale MR, Bird CR, Schuch W, Bramley PM (1994). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (evidence for tissuespecific gene expression). *Plant Physiol.* 105:405-413
- Fröhlich K, Conrad J, Schmid A, Breithaupt DE, Böhm V (2007). Isolation and structural elucidation of different geometrical isomers of lycopene. *Int J Vitam Nutr Res.* 77:369-375
- Frusciante L, Carli P, Ercolano Mr, Pernice R, Di Matteo A, Fogliano V, Pellegrini N (2007). Antioxidant nutritional quality of tomato. *Mol Nutr Food Res.* 51:609–617
- Gahler S, Otto K, Böhm V (2003). Alterations of vitamin C, total phenolics and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. *Food Chem.* 51:7962-7968
- Gann PH, Ma J, Giovannucci E, Willett W, Sacks FM, Hennekens GH, Stampfer MJ (1999). Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: Results of a prospective analysis. *Cancer Res.* 59:1225–1230
- Gao H, Zhu H, Shao Y, Chen A, Lu C, Zhu B, Luo Y (2008). Lycopene accumulation affects the biosynthesis of some carotenoid-related volatiles independent of ethylene in tomato. *J Integr Plant Biol.* 50(8):991-6

- Galiana-Balaguer L, Roselló N, Nuez F (2004). Flavour improvement in tomato. *Recent Res. Devel Crop Sci.* 1:147-163
- García-Alonso FJ, Jorge-Vidal V, Ros G, Periago MJ (2012). Effect of consumption of tomato juice enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids on the lipid profile, antioxidant biomarker status, and cardiovascular disease risk in healthy women. *Eur J Nutr.* 51:415–424
- García-Closas R, Berenguer A, Tormo J, Sánchez J, Quiros JR, Navarro C, Arnaud R, Dorronsoro M, Chilarque D, Barricarte A, Ardanaz E, Amiano P, Martínez C, Aguado A, González CA (2004). Dietary source of vitamin C, vitamin E and specific carotenoids in Spain. *Brit J Nutr.* 91(6):1005-1011
- García-Valverde V, Navarro-González I, García-Alonso J, Periago MJ (2011). Antioxidant Bioactive Compounds in Selected Industrial Processing and Fresh Consumption Tomato Cultivars. *Food Bioprocess Tech.* doi:10.1007/s11947-011-0687-3
- García Herrera P, Sánchez-Mata MC, Cámara M (2010). Nutritional characterization of tomato fiber as a useful ingredient for food industry. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 11:707–711
- Garret DA, Failla ML, Sarama RJ (1999). Development of an in vitro digesttiiiion method to assess carotenoids bioavailability from meals. *J Agric Food Chem.* 47:4301-4309
- Gartner C, Stahl W, Sies H (1997). Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr.* 66:116–22
- George B, Kaur C, Khurdiya DS, Kapper HC (2004). Antioxidants in tomato (*Lycopersicon esculentum*) as a function of genotype. *Food Chem.* 84:45–51
- Giovanelli G, Lavelli V, Peri C, Nobili S (2001). The antioxidant activity of tomato. II. Effects of vine and post-harvest ripening. *Acta Hort. (ISHS)* 542:211-216
- Giovanelli G, Paradiso A (2002). Stability of dried and intermediate moisture tomato pulp during storage. *J Agric Food Chem.* 50:7277–7728
- Giovannoni JJ (2006). Breeding new life into plant metabolism. *Nat Biotechnol.* 24:418–419

- Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, Stampfer MJ, Willett WC (2002). A Prospective Study of Tomato Products, Lycopene, and Prostate Cancer Risk. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 94(5):391-398
- González-Aguilar G A, Villegas-Ochoa MA, Martínez-Téllez MA, Gardea A A, Ayala-Zavala JF (2007). Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *J Food Sci.* 72(3):197–202
- González-Barrio R, Vidal-Guevara ML, Tomás-Barberán FA, Espín JC (2009). Preparation of a resveratrol-enriched grape juice based on ultraviolet C-treated berries. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 10:374–382
- Goñi I, Serrano J, Saura-Calixto F (2006). Bioaccessibility of  $\beta$ -carotene, lutein, and lycopene from fruits and vegetables. *J Agric Food Chem.* 54:5382–5387
- Goodman CL, Fawcett S, Barringer SA (2002). Flavor, viscosity, and color analyses of hot and cold break tomato juices. *J Food Sci.* 67(1):404–408
- Goralczyk R, Siler U (2004). The Role of Lycopene in Human Health. In *Phytochemicals in Health and Disease*; Bao Y, Fenwick R, Eds.; Marcel Dekker Inc: New York, NY, USA, pp.285–309
- Graf BA, Ameho C, Dolnikowski GG, Milbury PE, Chen CY, Blumberg JB (2006). Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. *J Nutr.* 136: 39-44
- Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Pérez-Sacristán B, Blanco-Navarro I, Blázquez-García S (2007a). Comparative in vitro bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake. *J Agric Food Chem.* 55:6387-6394
- Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I, Pérez-Sacristán I, Blázquez-García S (2007b). In vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chemistry.* 102:641-648
- Grasselly D, Navez B, Letard M (2000). *Tomate: Pour un produit de qualité.* CTIFL
- Graumlich JF, Ludden TM, Conry-Cantilena C, Cantilena LR Jr, Wang Y, Levine M (1997). Pharmacokinetic model of ascorbic acid in healthy male volunteers during depletion and repletion. *Pharmaceut Res.* 14:1133–1139

- Grune T, Lietz G, Palou A, Ross AC, Stahl W, Tang G, Thurnham D, Yin SA, Biesalski HK (2010). Beta-Carotene Is an Important Vitamin A Source for Humans. *J Nutr.* 140(12):2268S-2285S
- Gupta NP, Kumar R (2002). Lycopene therapy in idiopathic male infertility--a preliminary report. *Int Urol Nephrol.* 34(3):369-372
- Hadley CW, Clinton SK, Schwartz SJ (2003). The Consumption of Processed Tomato Products Enhances Plasma Lycopene Concentrations in Association with a Reduced Lipoprotein Sensitivity to Oxidative Damage. *J Nutr.* 133:727-732
- Harbourne JB (1993). *The flavonoids: advances in research since 1986.* London, Chapman and Hall
- Harish MC, Sathishkumar R (2011). Antioxidant potentials of skin, pulp, and seed fractions of commercially important tomato cultivars. *Food Sci Biotechnol.* 20(1): 15-21
- Hayes WA, Smith PG, Morris AEJ (1998). The production and quality of tomato concentrates. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 38:537–564
- Hedges LJ, Lister CE (2005). Nutritional attributes of tomatoes. *Crop & Food Research Confidential Report No. 1391.*
- Hernández M, Rodríguez E, Díaz C (2007). Free hydroxycinnamic acids, lycopene, and color parameters in tomato cultivars. *J Agric Food Chem.* 55(21):8604-8615
- Hernández-Rodríguez M, Sastre-Gallego A (1999). *Tratado de nutrición,* Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid. España.
- Hollander D, Rim E, Muralidhara KS (1975). Mechanism and site of small intestinal absorption of  $\alpha$ -tocopherol in the rat. *Gastroenterology.* 68(6):1492-9
- Hollman PCH (2004). Absorption, bioavailability and metabolism of flavonoids. *Pharm Biol.* 42:74-83
- Hong SJ, Kim SI, Kwon SM, Lee JR, Chung BC (2002). Comparative study of concentration of isoflavones and lignans in plasma and prostatic tissues of normal control and benign prostatic hyperplasia. *Yonsei Med J.* 43:236–241

- Hunter KJ, Fletcher JM (2002). The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred vegetables. *Innov Food Sci. Emerg Technol.* 3:99–406
- Huo T, Ferruzzi MG, Scahwartz SJ, Failla ML (2007). Impact of fatty acyl composition and quantity of triglycerides on bioaccessibility of dietary carotenoids. *Journal of Food Chem.* 55:8950-8957
- Ishida BK, Baldwin EA, Buttery RG, Chui SH, Ling LC (1993). Flavor volatiles, sugars and color development in ripening in vitro-cultured tomato fruit and calyx. *Physiol Plant.* 89:861–867
- Ishimi Y, Ohmura M, Wang X, Yamaguchi M, Ikegami S (1999) Inhibition by Carotenoid and retinoic acid of osteoclast – like cell formation induced by bone resorbing agent in vitro. *J Clin Biochem Nutr* 27:113-22
- Jacob K, García-Alonso FJ, Ros G, Periago MJ (2010). Stability of carotenoids, phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant capacity of tomatoes during thermal processing. *Ar Latinoam Nutr.* 60(2):192-8
- Jacob K, Periago MJ, Böhm V, Ros Berruezo G (2008). Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. *Br J Nutr.* 99:137-146
- Jagadeesh SL, Charles MT, Gariepy Y, Goyette B, Raghavan GSV, Vigneault C (2009). Influence of post-harvest UV-C hormesis on the bioactive components of tomato during post-treatment handling. *Food Bioprocess Tech.* 4(8):1463-1472
- Jian L, Du CJ, Lee AH, Binns CW (2005). Do dietary lycopene and other carotenoids protect against prostate cancer? *Int J Cancer* 113:1010-1014
- Jiménez A, Creissen G, Kular B, Firmin J, Robinson S, Verhoeyen M, Mullineaux P (2002). Changes in oxidative processed and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta.* 214:751–758
- Joglekar AM, May AT (1987). Product excellence through design of experiments. *Cereal World.* 32:857-868
- Jonson IT, Southon S, Faulks R (2001). Predicción de la biodisponibilidad de los antioxidantes de los alimentos: el caso de los carotenoides. (119-137), en:

- Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M. Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas. Zaragoza: Ed. ACRIBIA.
- Kader AA (2000). Modified atmospheres during transport and storage. En: Postharvest Technology of Horticultural Crops. Third edition. Edit. A.A. Kader. University of California. 11: 85-92
- Kader AA, Stevens MA, Albright M, Morris LL (1978). Amino acid composition and flavor of fresh market tomatoes as influenced by fruit ripeness as when harvested. J Am Soc Hortic Sci. 103:541-544
- Kalt W (2001). Health functional phytochemicals of fruit. Hortic Rev. 27:269-315
- Kalt W, Forney C F, Martin A, Prior RL (1999). Antioxidant capacity, Vitamin C, Phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. J Agric Food Chem. 47:4638–4644
- Kazeniac SJ, Hall RM (1970). Flavor chemistry of tomato volatiles. J Food Sci. 35: 519-530
- Khachik F, Carvalho L, Bernstein PS, Muir GJ, Zhao DY, Katz NB (2002). Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. Exp Biol Med (Maywood). 227(10): 845–51
- Kim HJ, Fonseca JM, Kubota C, Kroggel M, Choi JH (2008). Quality of fresh-cut tomatoes as affected by salt content in irrigation water and post-processing ultraviolet-C treatment. J Sci Food Agric. 88:1969–1974
- Kim L, Rao AV, Rao LG (2003). Lycopene II—Effect on osteoblasts: the carotenoid lycopene stimulate cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS 2 cells. J Med Food. 6(2): 79-86
- Kong K-W, Khoo H-E, Prasad KN, Ismail A, Tan C-P, Rajab NF (2010). Revealing the power of the natural red pigment lycopene. Molecules. 15:959-987
- Kopsell DA, Kopsell DE (2012). Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crop. Trends Plant Sci. 11(10):499-507
- Krinsky NI, Johnson EJ (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. Mol Aspects Med. 26:459–516

- Krumbein A, Peters P, Bruckner B (2004). Flavor compounds and a quantitative descriptive analysis of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) of different cultivars in short-term storage. *Postharv Biol Technol.* 35:15-28
- Landis-Piowar KR, Milacic V, Dou QP (2008). Relationship between the methylation status of dietary flavonoids and their growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities in human cancer cells. *J Cell Biochem.* 105:514–523
- Lavelli V, Peri C, 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.* 48:1442–1448
- Lea U, Sliemstad R, Smedvig P, Lillo C (2007). Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta.* 225:1245–1253
- Lee SK, Kader AA (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol Technol.* 20:207–220
- Lei X, Chen M (2007). Advances in Research of Flavonoids as Radioprotector. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis.*
- Leonardi C, Ambrosino P, Esposito F, Fogliano V (2000). Antioxidant activity and carotenoid and tomatine contents in different typologies of fresh consumption tomatoes. *J Agr Food Chem.* 48:4723-4727
- Leoni C (1992). Industrial quality as influenced by crop management. *Acta Hortic.* 301:177–184
- León-Sánchez DF, Pelayo-Zaldívar C, Rivera-Cabrera F, Ponce-Valadeza M, Ávila-Alejandra X, Fernández FJ (2009). Effect of refrigerated storage on aroma and alcohol dehydrogenase activity in tomato fruit. *Postharv Biol Technol.* 54:93-100
- Lin CH, Chen BH (2005). Stability of carotenoids in tomato juice during storage. *Food Chem.* 90:837–846
- Liu C, Cai L, Lu X, Han X, Ying T (2012). Effect of Postharvest UV-C Irradiation on Phenolic Compound Content and Antioxidant Activity of Tomato Fruit During Storage. *JIA.* 11(1):159-165

- Liu C, Han X, Cai L, Lu X, Ying T, Jiang Z (2011). Postharvest UV-B irradiation maintains sensory qualities and enhances antioxidant capacity in tomato fruit during storage. *Postharvest Biol Tec.* 59:232–237
- Liu LH, Zabaras D, Bennett LE, Aguas P, Woonton BW (2009). Effects of UV-C, red light and sun light on the carotenoid content and physical qualities of tomatoes during post-harvest storage. *Food Chem.* 115:495–500
- Longnecker MP, Kamel F, Umbach DM, et al. (2000). Dietary intake of calcium, magnesium and antioxidants in relation to risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology.* 19:210–6
- López-Camelo AL, Gómez P, Artés F (2003). Use of a\* and b\* colour parameters to assess the effect of some growth regulators on carotenoid biosynthesis during postharvest tomato ripening. *Acta Hortic.* 599:305-308
- Luo T, Sakai Y, Wagner E, Drager UC (2006). Retinoids, eye development, and maturation of visual function. *J Neurobiol.* 66:677–686
- Luthria DL, Mukhopadhyaya S, Krizek DT (2006). Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *J Food Compos Anal.* 19:771–777
- Natella F, Belelli F, Ramberti A, Scaccini C (2010). Microwave and traditional cooking methods: Effect of cooking on antioxidant capacity and phenolic compounds content of seven vegetables. *J Food Biochem* 34:796–810
- Navarro-González I, García-Valverde V, García-Alonso J, Periago MJ (2011). Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Res Int.* 44(5):1528–1535
- Nguyen ML, Schwartz SJ (1998). Lycopene stability during food processing. *P Soc Exp Biol Med.* 218:101-105
- Mahajan G, Singh KG (2006). Response of greenhouse tomato to irrigation and fertigation. *Agr Water Manage.* 84:202–206
- Maharaj R, Arul J, Nadeau P (1999). Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Capello) by delaying senescence. *Postharvest Biol Tec.* 15(1):13–23

- Maharaj R, Arul J, Nadeau P (2010). UV-C Irradiation of Tomato and its Effects on Colour and Pigments. *Adv Environ Biol.* 4(2):308-315, ISSN 1995-0756.
- Maiani G, Periago MJ, Catasta G, Toti E, Goñi I, Bysted A, Granada-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Knuthsen P, Valoti M, Böhm V, Mayer-Miebach E, Behnlian D, Schlemmer U. (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res.* 53:194 –218
- Malundo TMM, Shewfelt RL, Scott JW (1995). Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biol Tec.* 6:103-110
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79:727-747
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 81(suppl):230S– 42S
- Maneerat C, Hayata Y, Kozuka H, Sakamoto K, Osajima Y (2002). *J Agric Food Chem.* 50:3401-3404
- MAPA (2003). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. La alimentación en España. Madrid. 2003
- Marceau G, Gallot D, Lemery D, Sapin V (2007). Metabolism of retinol during mammalian placental and embryonic development. *Vitam. Horm.* 75:97–115
- Martínez-Valverde I, Periago MJ, Provan G, Chesson A (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Sci Food Agric.* 82:323-330
- Maul E, Sargent SA, Sims CA, Baldwin EA, Balaban MO, Huber DJ (2000). Tomato flavor and aroma quality as affected by storage temperature. *J Food Sci.* 65:1228-1237
- Maylie MF, Charles M, Astier M, Desnuelle P (1973). On porcine pancreatic colipase. *Biochem Biophys Res Commun.* 52:291-297

- Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM, Heredia FJ (2004a). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Arch Latinoam Nutr.* 54(2):149-155
- Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM, Heredia FJ (2004b). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Arch latinoam Nutr.* 54(2):209-215
- McCullough FS, Northrop-Clewes CA, Thurnham DI (1999). The effect of vitamin A on epithelial integrity. *Proc Nutr Soc.* 58:289–293
- Meredith FI, Purcell AE (1966). Changes in the concentration of carotenes of ripening Homestead tomatoes. *Proc Am Soc Hortic Sci.* 89:544–550
- Middleton EJr, Kandaswami C, Theoharides TC (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 52: 673-751
- Miller A, Sitter RR (2001). Using the folded-over 12-run Plackett-Burman design to consider interaction. *Technometrics.* 43:44-45
- Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, van Campen D (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr.* 34:2248-2256
- Miller NJ, Sampson J, Candeias PM, Bramley CA, Rice-Evans (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *Febs Lett.* 384(3):240–242
- Min S, Jin ZT, Zhang QH (2003). Commercial-scale pulsed electric field processing of tomato juice. *J Agric Food Chem.* 51:3338–3344
- Minoggio M, Bramati L, Simonetti P, Gardana C, Lemoli L, Santagelo E, Mauri PL, Spigno P, Soressi GP, Pietta PG (2003). Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars. *Ann Nutr Metab.* 47(2):64-69
- Moco S, Capanoglu E, Tikunov Y, Bino RJ, Boyacioglu D, Hall RD, Vervoort J, De Vos RC (2007). Tissue specialization at the metabolite level is perceived during the development of tomato fruit. *J Exp Bot.* 58(15-16):4131-46
- Mohammadi-Aylar S, Jamaati-e-Somarin S, Jafar Azim S (2010). Effect of stage of ripening on mechanical damage in tomato fruits. *American-Eurasian. J Food Agric Environ.* 9(3):297–302

- Moraru C, Lee TC (2005). Kinetic studies of lycopene isomerisation in a tributyrin model system at gastric pH. *J Agric Food Chem.* 53:8997-9004
- Moriel P, Sevanian A, Ajzen S, Zanella MT, Plavnik FL, Rubbo H, Abdalla DS (2002). Nitric oxide, cholesterol oxides and endothelium-dependent vasodilation in plasma of patients with essential hypertension. *Braz J Med Biol Res.* 35(11):1301-9.
- Mullen W, Edwards CA, Crozier A (2006). Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *Br J Nutr.* 96:107–116
- Myers RH, Montgomery DC (1995). Introduction to response surface methodology. In *Response Surface Methodology. Process and Product Optimization using Designed Experiments.* Box G.E.P., Montgomery, D.W., Eds. John Wiley & Sons Inc.: New York, p. 1-16.
- Odriozola-Serrano I, Soliva-Fortuny R, Martin-Belloso O (2008). Changes of health-related compounds throughout cold storage of tomato juice stabilized by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innov Food Sci Emerg Techol.* 9:272–279
- Olsen KM, Sliestad R, Lea US, Brede C, Løvdal T, Ruoff P, Verheul M, Lillo C (2009). Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: experimental and kinetic model studies. *Plant Cell Environ* 32:286–299
- Ordóñez-Santos LE, Vazquez-Odériz L, Arbones-Maciñeira E, Romero-Rodríguez MA (2009). The influence of storage time on micronutrients in bottled tomato pulp. *Food Chem.* 112:146–149
- Ortega RM (2006). Importance of functional foods in the Mediterranean diet. *Public Health Nutr.* 9(8A):1136-1140
- Paetau I, Khachik F, Brown ED, Beecher GR, Kramer TR, Chittams J, Clevidence BA (1998). Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. *Am J Clin Nutr.* 68:1187–1195

- Paran E (2006) Reducing Hypertension with Tomato Lycopene In A. V. Rao (Ed) Tomatoes, Lycopene & Human Health. Caledonian Science Press, pages 169-181
- Paran E, Engelhard YN (2001). Effect of lycopene, an oral natural antioxidant on blood pressure. *J Hypertens* 19: S74.
- Parkar SG, Stevenson DE, Skinner MA (2008). The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *Int J Food Microbiol* 124: 295-298
- Parr AJ, Bolwell UP (2000). Phenols in the plant and in man: the potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J Sci Food Agric.* 80:985–1012
- Peach JC, Latché A, Rest B (2008). Genes involved in the biosynthesis of aroma volatiles and biotechnological applications. In: *Fruit and Vegetable Flavor*. B Brücker, S G Wyllie (eds). CRC Press. Boca Raton, Boston, New York, Washington DC. 254-271
- Pék Z, Helyes L, Lugasi A (2010). Color Changes and Antioxidant Content of Vine and Postharvest ripened Tomato Fruits. *Hortscience.* 45(3):466–468
- Pérez-Conesa D, García-Alonso J, García-Valverde V, Iniesta M, Jacob K, Sánchez-Siles LM, Ros G, Periago MJ (2009). Changes in bioactive compounds and antioxidant activity during homogenization and thermal processing of tomato puree. *Innov Food Sci Emerg.* 10:179–188
- Pérez-Vizcaíno F, Duarte J, Jimenez R, Santos-Buelga C, Osuna A (2009). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep.* 61: 67-75
- Periago MJ, García-Alonso J, Jacob K, Olivares AB, Bernal MJ, Iniesta MD, Martínez C, Ros G (2009). Bioactive compounds, folates and antioxidant properties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) during vine ripening. *Int J Food Sci Nutr.* 60(8):694-708
- Periquet BA, Jammes NM, Lambert WE, Tricoire J, Moussa MM, Garcia J, Ghisolfi J, Thouvenot J (1995). Micronutrient levels in HIV-1-infected children. *AIDS.* 9(8):887-893

- Perkins-Veazie P, Collins J K, Howard L (2008). Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation. *Postharvest Biol Technol.* 47:280–285
- Petro-Turza M (1986). Flavor of tomato and tomato products. *Food Rev. Int.* 2(3): 309-351
- Pirrello J, Regad F, Latché A, Pech JC, Bouzayen M (2009). Regulation of Tomato Fruit Ripening. In *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources.* CAB Rev. 4:1-14
- Piskula MK, Yamakoshi J, Iwai Y (1999). Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett.* 447: 287–291
- Pizarro L, Stange C (2009). Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Cienc Investig Agrar.* 36(2):143-162
- Plackett RL, Burman JP (1946). The design of optimum multifactor experiments. *Biometrika.* 33:305-325
- Porrini M, Riso P (2008). Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 18, 647–650
- Porrini M, Riso P, Testolin G (1998). Absorption of lycopene from single or daily portions of raw and processed tomato. *Br J Nutr.* 80:353–361
- Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Kim JA, Quon MJ, Montagnani M. *EGCG* (2007). A green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292: E1378-E1387
- Quiñones M, Migue M, Aleixandre A (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp.* 27(1):76-89
- Raffo A, La Malfa G, Fogliano V, Maiani G, Quaglia G (2006). Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). *J Food Compos Anal.* 19:11-19
- Raffo A, Leonardi C, Fogliano V, Ambrosino P, Salucci M, Gennaro L., Bugianesi R, Giuffrida F, Quaglia G (2002). Nutritional value of cherry tomatoes

- (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1) harvested at different ripening stages. *J Agric Food Chem.* 50:6550-6556
- Rai K, Kumar R, Singh AK, Rai PK, Rai M, Chaturvedi AK, Rai AB (2012). Changes in antioxidant and phytochemical properties of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under ambient condition. *Pak. J. Bot.* 44(2):667-670
- Rao AV (2002). Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. 227(10):908-913
- Rao AV, Agarwal S (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic discases. *Nutr Res.* 19:305-323
- Rao AV, Agarwal S (2000). Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J Am College Nutr.* 19(5):563–569
- Rao AV, Balachandran B (2003a). Antioxidants and cardiovascular disease. KM Nath R, Singal PK, Eds, in press, Narosha Publishing House
- Rao AV, Balachandran B (2003b). Role of oxidative stress abd anti- oxidants in neuro-degenerative diseases. *Nutr Neurosci.* 5(5):291–309
- Rao AV, Shen HL (2002). Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. *Nutr Res.* 22:1125-1331
- Rao V, Heber D (2001). Future directions and intake recommendations; Caledonian Science Press, Scotland UK. p.43
- Rao LG, Krishnadev N, Banasikowska K, RaoAV (2006). Lycopene I—Effect on Science Press. p. 199–211
- Rao LG, Mackinnon ES, Josse RG, Murray TM, Strauss A, Rao AV (2007). Lycopene consumption decreases oxidative stress and bone resorption markers in postmenopausalwomen. *Osteoporosis Int.* 18(1):109–15
- Raymundo LC, Chichester CO, Simpson KL (1976). Light-dependent carotenoid synthesis in the tomato fruit. *J Agric Food Chem.* 24(1):59–64
- Re R, Fraser PD, Long M, Bramley PM, Rice-Evans C (2001). Isomerization of lycopene in the gastric mileu. *Biochem Biophys Res Comm.* 281:576-581

- Reboul E, Abou L, Mikail C, Ghiringhelli O, Andre M, Portugal H, Jourdheuil-Rahmani D, Amiot MJ, Lairon D, et al. (2005). Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochem J.* 387: 455–61
- Reboul E, Richelle M, Perrot E, Desmoulins-Malezet C, Pirisi V, Borel P (2006). Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources *J Agric Food Chem.* 54:8749-8755
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2:152-159
- Richelle M, Bortlik K, Liardet S, Hager C, Lambelet P, Baur M, Applegate LA, Offord EA (2002). A food-based formulation provides lycopene with the same bioavailability to humans as that from tomato paste. *J Nutr.* 132:404–408
- Richelle M, Sanchez B, Tavazzi I, Lambelet P, Bortlik K, Williamson G (2010). Lycopene isomerisation takes place within enterocytes during absorption in human subjects. *Br J Nutr.* 103:1800–1807
- Robinson DS, Wu Z, Domoney C, Casey R (1995). Lipoxygenases and the quality of foods. *Food Chem.* 54(1):33–43
- Robinson GK (2000). Design the experiment. In *Practical strategies for experimenting*, p. 143-188. John Wiley & Sons, New York.
- Rodrigo D, Jolie R, Van Loey A, Hendrickx M (2006). Combined thermal and high pressure inactivation kinetics of tomato lipoxygenase. *Eur Food Res Technol.* 222(5-6):636-642
- Roselló J, Domínguez A, Rodrigo MI (1998). Tipificación y estudio productivo de diversas variedades tradicionales de tomate, calabaza y melón, cultivados con métodos ecológicos; ponencia del III Congreso de Agricultura Ecológica de la SEAE, Valencia.
- Rowley AM (2003). Volatile flavor profile of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by tissue disruption. University of Georgia Theses and Dissertations.
- Ryalls J, Neuenschwander U, Willits M, Molina A, Steiner HY, Hunt M (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 8:1809–1819

- Salas JJ (2004). Characterization of alcohol acytransferase from olive fruit. *J. Agric. Food Chem.* 52:3155-3158
- Saliba-Colombani V, Causse M, Langlois D, Philouze JBM (2001). Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theor. Appl Genet.* 102:259-272
- Salles C (2008). Tomato and flavor in Tomatoes and Tomato Products. Nutritional, Medicinal and Therapeutic Properties, edited by Victor R. Preedy and Ronald R. Watson. Science Publishers, Chapter 7.
- Salunkhe DK, Jadhav SJ, Yu MH (1974). Quality and nutritional composition of tomato fruit as influenced by certain biochemical and physiological changes. *Plant Foods Human Nutr.* 24:85–113
- Sánchez-Moreno C, Plaza L, de Ancos B, Cano MP (2006). Nutritional characterisation of commercial traditional pasteurised tomato juices: Carotenoids, vitamin C and radical-scavenging capacity. *Food Chem.* 98:749–756
- Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed. Pharmacother.* 56:276–282
- Scalbert A, Williamson G (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 130:2073S-2085S
- Schierle J, Bretzel W, Bühler I, Faccin N, Hess D, Steiner K, Schüep W (1997). Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chem.* 59:459–465
- Schmidt R, Fazekas F, Hayn M, et al. (1997). Risk factors for microangiopathy related cerebral damage in Aistrian stroke prevention study. *J Neurol Sci* 152:15–21
- Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:1024-1029
- Senter SD, Horvat RJ and Forbus WR (1988). Quantitative variation of total phenols in fresh market tomatoes at three stages of maturity. *J Food Sci* 53(2):639–640

- Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Begliomini AL and Montedoro G (2000). Relationships between the volatile compounds evaluated by solid phase microextraction and the thermal treatment of tomato juice: optimization of the blanching parameters. *Food Chem.* 71:407–415
- Seybold C, Frohlich K, Roland B, Konrad O, Böhm V (2004). Changes in Contents of Carotenoids and Vitamin E during Tomato Processing. *J Agric Food Chem.* 52:7005-7010
- Sgherri C, Kadlecová Z, Pardossi A, Navari-Izzo F, Izzo R (2008). Irrigation with diluted seawater improves the nutritional value of cherry tomatoes. *J Agric Food Chem.* 56(9):3391-7
- Shama G (2007). Process challenges in applying low doses of ultraviolet light to fresh produce for eliciting beneficial hormetic responses. *Postharvest Biol Tec* 44:1-8
- Sharma SK, Le Maguer M 1996: Lycopene in tomatoes and tomato pulp fractions. *Ital J Food Sci.* 8(2):107-113
- Shams MA, Thompson DR (1987). Quantitative determination of pea losses as affected by conventional water blanching. *J Food Sci.* 52:1006-1009
- Shewfelt RL, Thai CN, Davis JW (1988). Prediction of changes in color of tomatoes during ripening at different constant temperatures. *J Food Sci.* 53(5):1433-1437
- Shi J, Le Maguer M (2000). Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by processing. *Crc Cr Rev Food Sci.* 40(1): 1-42
- Shi JX, Le Maguer M, Liptay A, Wang SL (1999). Chemical composition of tomatoes as affected by maturity and fertigation practices. *J Food Quality.* 22:147-156
- Shi J, Maguer ML, Bryan M, Kakuda Y (2003). Kinetics lycopene degradation in tomato puree by heat and light irradiation. *J Food Process Eng.* 25:485-498
- Sieso V, Crouzet J (1977). Tomato volatile components: Effect of processing. *Food Chem.* 2:241–252
- Sinesio F, Cammareri M, Moneta E, Navez B, Preparaio M, Causse M, Grandillo S (2010) Sensory quality of fresh french and dutch market tomatoes: A preference mapping study with italian consumers. *J Food Sci.* 75:S55-S67

- Singh U, Devaraj S, Jialal I (2005). Vitamin E, Oxidative Stress, and Inflammation. *Annu Rev Nutr.* 25:151-74
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1974). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol.* 299:152–178
- Singleton VL, Rossi JA (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 16:144–158
- Slimestad R, Verheulb M (2009). Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *J Sci Food Agric* 89: 1255–1270
- Sofi F, Cesari F, Abbate, Gensini GF, Casini A (2008). Adherence to Mediterranean Diet and Health Status: Meta-Analysis. *Br Med J.* 337(7671):673-675
- Soto-Zamora G, Yahia EM, Brecht JK, Gardea A (2005). Effects of postharvest hot air treatments on the quality and antioxidant levels in tomato fruit. *Lebensm Wiss Technol.* 38:657–663
- Southon S, Faulks R (2001). Predicción de la biodisponibilidad de los antioxidantes de los alimentos: el caso de los carotenoides. (pp. 119-137), en: Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M. *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas.* Zaragoza: Ed. ACRIBIA
- Stange C, Flores C (2012). Carotenoids and Photosynthesis - Regulation of Carotenoid Biosynthesis by Photoreceptors, *Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects*, Dr Mohammad Najafpour
- Stahl W, Sies H (1996). Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Arch Biochem Biophys.* 336:1–9
- Stewart AJ, Bozonnet S, Mullen W, Jenkins GI, Lean MEJ, Crozier A (2000). Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *J Agr Food Chem.* 48:2663-2669
- Stewart AJ, Chapman W, Jenkins GI, Graham I, Martin T, Crozier A (2001). The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell Environ.* 24:1189–1197

- Strack D (1997). Phenolic metabolism. *Plant Biochemistry*; Dey, P. M., Harborne, J. B., Eds.; Academic Press: London, UK
- Subbiah K, Perumal R (1990). Effect of calcium sources, concentrations, stages and numbers of sprays on physiochemical properties of tomato fruits. *South Indian Hort.* 38(1):20-27
- Sucan MK, Russell GF (2002). Effects of processing on tomato bioactive volatile compounds. In *Bioactive Compounds in Foods*. Chapter 12:155–172
- Takeoka GR, Dao L, Flessa S, Gillespie DM, Jewell WT, Huebner B, Bertow D, Ebeler S (2001). Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. *J Agric Food Chem.* 49:3713-3717
- Tanaka T, Shnimizu M, Moriwaki H (2012). Cancer Chemoprevention by Carotenoids. *Molecules.* 17:3202-3242; doi:10.3390/molecules17033202
- Tandon KS, Baldwin EA, Scott JW, Shewfelt RL (2003). Linking Sensory Descriptors to volatile and Nonvolatile Components of Fresh Tomato Flavor. *J Food Sci.* 68(7): 2366-2371
- Taylor LP, Grotewold E (2005). Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol.* 8:317-323
- Thompson KA, Marshall MR, Sims CA, Wei CI, Sargent SA, Scott JW (2000). Cultivar, maturity and heat treatment on lycopene content in tomatoes. *J Food Sci.* 65(5):791-795
- Tieman DM, Loucas HM, Kim JY, Clark DG, Klee HJ (2007). Tomato phenylacetaldehyde reductases catalyze the last step in the synthesis of the aroma volatile 2-phenylethanol. *Phytochem.* 68:2660-2669
- Tieman DM, Zeigler M, Schmelz EA, Taylor MG, Bliss P, Kirst M, Klee HJ (2006). Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. *J Exp Bot.* 57:887-896
- Tikunov Y, A Lommen, Ric de Vos CH, Verhoeven HA, Bino RJ, Hall RD, Bovy AG (2005). A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Largescale profiling of tomato fruit volatiles. *Plant Physiol.* 139:1125-1137

- Tonucci LH, Holden JM, Beecher GR, Khachik F, Davis CS, Mulokozi G (1995). Carotenoid content of thermally processed tomato-based food products. *J Agric Food Chem.* 43:579-586
- Tomás-Barberán FA, Espin JC (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J Sci Food Agric.* 81:853–876
- Toor RK, Savage GP (2005). Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Res Int.* 38:487–494
- Toor RK, Savage GP (2006). Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. *Food Chem.* 99:724-727
- Traber MG, Olivecrona T, Kayden HJ (1985). Bovine milk lipoprotein lipase transfers tocopherol to human fibroblasts during triglyceride hydrolysis *in vitro*. *J Clin Invest.* 75:1729–1734
- Tyssandier V, Lyan B, Borel P (2001). Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles. *Biochim Biophys Acta.* 1533:285-292
- Tyssandier V, Reboul E, Dumas JF, Bouteloup-Demange C, Armand M, Marcand J, Sallas M, Borel P (2003). Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 284 (6):G913-G923
- Underwood BA, Arthur P (1996). The contribution of vitamin A to public health. *FASEB J.* 10:1040–1048
- Unlu NZ, Bohn T, Francis DM, Nagaraja H.N, Clinton SK, Schwartz SJ (2007). Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects. *Br J Nutr.* 98:140–146
- Upritchard JE, Sutherland WH, Mann JI (2000). Effects of supplementation with tomato juice, vitamin E and vitamin C on LDL oxidation and products of inflammatory activity in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 23:733-738
- Vallverdú-Queralt A, Oms-Oliu G, Odriozola-Serrano I, Lamuela-Raventos RM, Martín-Belloso O, Elez-Martínez P (2012a). Effects of Pulsed Electric Fields on the

- Bioactive Compound Content and Antioxidant Capacity of Tomato Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 60:3126–3134
- Vallverdú-Queralt A, Medina-Remón A, Casals-Ribes I, Andres-Lacueva C, Waterhouse AL, Lamuela-Raventos RM (2012b). Effect of tomato industrial processing on phenolic profile and hydrophilic antioxidant capacity. *Food Sci Tec.* 47:154-160
- Vallverdú-Queralt A, Medina-Remón A, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventos RM (2011). Changes in phenolic profile and antioxidant activity during production of diced tomatoes. *Food Chem.* 126:1700-1707
- van Bennekum A, Werder M, Thuahnai ST, Han CH, Duong P, Williams DL, et al. (2005). Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary  $\beta$ -carotene and cholesterol. *Biochem.* 44:4517–4525
- van den Berg H, Faulks R, Granado HF, Hirschberg J, Olmedilla B, Sandmann G, et al. (2000). Review. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J Sci Food Agric.* 80:880–912
- van het Hof KH, de Boer BC, Tijburg LB, Lucius BR, Zijp I, West CE, Hautvast JG, Weststrate JA (2000). Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption. *J Nutr.* 130(5):1189-96
- Vershinin A (1999). Biological functions of carotenoids-diversity and evolution. *Biofactors.* 10(2-3):99-104
- Waliszewski KN, Blasco G (2010). Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud pública Méx.* 52:254-265
- Wardlaw GM, Kessel MW (2002). *Perspectives in nutrition.* McGraw-Hill, New York, pp 328–338.
- Wen X, Walle T (2006a). Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metab. Dispos.* 34:1786–1792
- Wen X, Walle T (2006b). Methylation protects dietary flavonoids from rapid hepatic metabolism. *Xenobiotica.* 36:387–397

- Wertz K, Siler U, Goralczyk R (2004). Lycopene: Modes of action to promote prostate health. *Arch Biochem Biophys.* 430:127-134
- Whitaker JR (1991). Lipooxygenase. In: Robinson DS, Eskin NAM, editors. *Oxidative enzymes in foods*. London: Elsevier Applied Science. P175-215
- Wilcox JK, Catignani GL, Lazarus C (2003). Tomatoes and cardiovascular health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 43:1-18
- Wilkens RT, Spoerke JM, Stamp NE (1996). Differential responses of growth and to soluble phenolics of tomato to resource availability. *Ecology.* 77:247–258
- Williamson G, Clifford MN (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity?. *Br J Nutr.* 104:S48–S66
- Wilson KE, Wilson MI and Greenberg BM (1998). Identification of the flavonoid glycosides that accumulate in *Brassica napus* L. cv Topas specifically in response to ultraviolet B radiation. *Photochem Photobiol.* 67:547–553
- Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agric Food Chem.* 52:4026–4037
- Yadyra LC, Corredor C, Morales L (2010). Structural and functional aspects of vitamin E. *RMNC.* 1(1):46-56
- Yahia EM, Ornelas-Paz JJ (2009). Chemistry, stability, and biological actions of carotenoids. *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability*. De la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, González Aguilar GA
- Yang CC, Chinnan MS (1987). Modelling of color development of tomatoes in modified atmosphere storage. *Trans ASAE.* 30(2):548-553
- Yanuriati A, Savage G P, Rowe R N (1999). The effects of ethanol treatment on the metabolism, shelf life and quality of stored tomatoes at different maturities and temperatures. *J Sci Food Agric.* 79:995–1002
- Yeum KJ, Russell RM (2002). Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Ann Rev Nutr.* 22:483–504

- Yilmaz E (2001a). The Chemistry of Fresh Tomato Flavor. *Turk J Agric For.* 25:149-155
- Yilmaz E (2001b). Oxylin pathway in the biosynthesis of fresh tomato volatiles. *Turk J Biol.* 25:351–360
- Young AJ (1993). Carotenoids in Photosynthesis (ed. A. Young and G. Britton), Chapman and Hall, London pp 16, 72
- Zanoni B, Pagliarini E, Gioavelli G, Lavelli V (2003). Modelling the effect of thermal sterilization on the quality of tomato puree. *J Food Engin.* 56:203-206
- Zaripheh S, Boileau TW, Lila MA, Erdman JW Jr (2003). [14C]-lycopene and [14C]-labeled polar products are differentially distributed in tissues of F344 rats prefed lycopene. *J Nutr.* 133:4189–4195
- Zhang Y, Song TT, Cunnick JE, Murphy PA, Hendrich S (1999). Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J Nutr.* 129:399–405
- Zushi K, Matsuzoe N (1998). Effect of Soil Water Deficit on Vitamin C, Sugar, Organic Acid, Amino Acid and Carotene Contents of Large-fruited Tomatoes. *J Jpn Soc Hortic Sci.* 67(6):927-933

Los resultados de la tesis se han divulgado en 2 artículos científicos, además de haber sido presentados en ponencias y eventos nacionales e internacionales. En la actualidad, están en revisión otros dos artículos y un quinto que se encuentra en proceso de elaboración. A continuación se muestran un resumen de los artículos derivados de la presente tesis:

- **Artículos publicados**

- Francisco J. García-Alonso, Sergio Bravo, Javier Casas, Darío Pérez-Conesa, Karin Jacob, María J. Periago (2009). Changes in Antioxidant Compounds during the Shelf Life of Commercial Tomato Juices in Different Packaging Materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2009) 6815–6822.
- Sergio Bravo, Javier García-Alonso, Gala Martín-Pozuelo, Victoria Gómez, Marina Santaella, Inmaculada Navarro-González, María Jesús Periago (2012). The influence of post-harvest UV-C hormesis on lycopene,  $\beta$ -carotene, and phenolic content and antioxidant activity of breaker tomatoes. *Food Research International*, 49 (2012) 296–302.

- **Artículos en revisión**

- Effects of post-harvest UV-C treatment on carotenoids and phenolic compounds of vine-ripening tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Detection of key factors affecting the lycopene in vitro availability. *International Journal of Food Science and Technology*.

- **Artículos en elaboración**

- Role of lycopene and enzymes lipoxygenase (LOX) and hydroperoxide lyase (HPL) in the production of volatile compounds responsible for fresh tomato aroma during manufacture and storage of commercial tomato juice.

## Changes in Antioxidant Compounds during the Shelf Life of Commercial Tomato Juices in Different Packaging Materials

FRANCISCO J. GARCÍA-ALONSO,<sup>†</sup> SERGIO BRAVO,<sup>†</sup> JAVIER CASAS,<sup>†</sup>  
 DARIÓ PÉREZ-CONESA,<sup>†</sup> KARIN JACOB,<sup>‡</sup> AND MARÍA J. PERIAGO<sup>\*‡</sup>

<sup>†</sup>Department of Food Science and Nutrition, Veterinary Faculty, University of Murcia, Murcia, Spain,  
 and <sup>‡</sup>R&D Department of Juver Alimentación, SLU, Cabezo de Torres, Murcia, Spain

Tomatoes provide an optimal mix of dietary antioxidants that may be responsible for the reported health benefits of tomato consumption. However, technological processing, packaging materials, and storage conditions have an impact on the nutritional quality of tomato products by affecting the stability of antioxidant nutrients to different extents. In this study, we evaluated the stability of the antioxidant compounds (lycopene, ascorbic acid, total phenols, and total flavonoids) present in commercially available tomato juices during storage extended for 12 months at three different temperatures (8, 22, and 37 °C). To further characterize the impact of storage conditions, two commonly used packaging materials (Tetra pack and glass bottles) were used to determine whether packaging materials affect antioxidant stability. Overall, the total lycopene, total phenolic compounds, and total flavonoids remained almost stable during storage for 12 months, regardless of the packaging material used, indicating that tomato juices maintain their nutritional value in terms of antioxidant composition during their shelf life. However, ascorbic acid was the most labile antioxidant and was markedly affected by storage conditions. The hydrophilic total antioxidant activity (TAA) paralleled the losses in ascorbic acid content, whereas the lipophilic TAA remained substantially stable throughout the storage trial.

**KEYWORDS:** Tomato juice; lycopene; antioxidant activity; ascorbic acid; total phenolic compounds; total flavonoids; packaging; shelf life

### INTRODUCTION

It has been postulated that many chronic diseases such as cardiovascular diseases, cancer, inflammatory diseases, diabetes, eye diseases, and aging are a result of long-term oxidative stress (1, 2). Due to tomatoes' antioxidant content, the consumption of tomatoes and tomato products has been suggested to reduce the risk of such chronic diseases (3–7).

Tomatoes provide an optimal mix of dietary antioxidants such as phenolic compounds, ascorbic acid, vitamin E, and carotenoids, mainly lycopene, whose individual, additive, or synergistic actions may be responsible for the reported health benefits of consumption (6–8). Therefore, the assessment of the total antioxidant activity (TAA) provides useful information about the joint action of dietary antioxidants and may help to elucidate the potential protective effects of antioxidant-rich foods (9). The total hydrophilic antioxidant activity of the tomato mainly relies on the antioxidant capacity of ascorbic acid and hydrophilic phenolic compounds (e.g., chlorogenic acid), while the lipophilic activity can be explained by the combined action of tocopherols, carotenoids, and lipophilic phenolics (e.g., quercetin) (9–12).

As reported in different studies, home cooking and industrial tomato processing have an impact on antioxidant stability. For instance, industrial and pilot-plant scale processing of tomatoes into different products has been shown to cause lycopene, ascorbic acid, and antioxidant activity losses, while phenolic compounds were shown to be more stable (13–15). In addition, commonly used cooking methods such as baking, frying, and microwaving have been reported to have a negative impact on lycopene stability, leading to 15–75% losses of lycopene, primarily due to oxidation reactions (16).

The nutritional quality of tomato products is affected by storage conditions in addition to thermal treatment during processing. Studies investigating the impact of storage conditions on the stability of tomato antioxidants have shown marked lycopene and ascorbic acid losses during the first months of storage (17–20). However, storage trials lasting longer than 6 months are scarce. As tomato juice typically has a commercial shelf life of 12 months, further studies are necessary to gather pertinent scientific information about the nutritional quality of tomato juice during storage.

It is also known that the packaging material influences the quality of liquid foods during storage. Traditional methods for juice packaging aim to reduce the exposure of the juice to oxygen through the use of high-barrier materials such as glass or foil laminates in brick packs (21). For instance, Tetra pack material has specially designed multilayered oxygen and light barriers to

\*To whom correspondence should be addressed: Área de Conocimiento de Nutrición y Bromatología, Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Campus Universitario de Espinardo, 30071 Murcia, Spain. Telephone: 34 968 364798. Fax: 34 968 364147. E-mail: mjperi@um.es.

protect ascorbic acid and flavor losses and to enhance shelf life. Packaging material has also been reported to have an impact on lycopene stability in tomato products (22).

The aim of this study was to evaluate the stability of antioxidant compounds present in commercially available tomato juices during extended storage for 12 months at three different temperatures (8, 22, and 37 °C). To further characterize the impact of storage conditions, two commonly used packaging materials (Tetra pack and glass bottles) were used to determine whether the packaging material affects antioxidant stability.

## MATERIALS AND METHODS

**Reagents and Chemicals.** Gallic acid, (+)-catechin, butylated hydroxytoluene, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate), and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Methanol, tetrahydrofuran, methyl *tert*-butyl ether, and L-(+)-ascorbic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). *trans*- $\beta$ -Apo-8'-carotenal was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), and all-*E*-lycopene was purchased from CaroteNature (Lupsingen, Switzerland).

**Study Design and Samples.** A 1 year storage trial was designed involving the use of three different temperatures (8, 22, and 37 °C) to investigate the stability of the main bioactive antioxidant compounds of two commercially available tomato juices. The tomato juices were manufactured by Juver Alimentación SLU (Cabezo de Torres, Murcia, Spain). The tomato juice was prepared from hot-break tomato puree, which was subjected to a thermal treatment of 96 °C for 30 s and packaged in coated paperboard cartons (Tetra pack containers) or in glass bottles. It should be noted that the juices packaged in Tetra pack containers are commercialized in the format of vitamin C-enriched juices, a fact that is indicated on the label. In contrast, no vitamin C is added to the juices commercialized in glass bottles. Samples were taken immediately after manufacturing and every 2 months to analyze the physicochemical parameters, bioactive antioxidant compounds, and hydrophilic and lipophilic antioxidant activity.

**Physicochemical Determinations.** The pH was measured using a pH-meter, a Crison Micro pH 2000 (Crison, Barcelona, Spain), and total titratable acidity (expressed as a percentage of citric acid) was analyzed by titrating the product with 0.1 N NaOH to pH 8.2. A Leica Abbe Mark II refractometer (Leica, Buffalo, NY) was used to quantify soluble solids.

**Analysis of Lycopene and Its Isomers.** Lycopene was analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detection according to Böhm (23) after three extractions with a methanol/tetrahydrofuran mixture (1:1, v/v) containing 0.1% butylated hydroxytoluene. Briefly, 400 mg of MgO, 200  $\mu$ L of *trans*- $\beta$ -apo-8'-carotenal (internal standard solution), and 35 mL of a methanol/tetrahydrofuran mixture were added to 0.6 g of the sample and homogenized for 5 min using a blender. The resulting solution was vacuum filtered through Whatman grade No. 5 filter paper. The extraction was repeated twice (until the residue was colorless), and the combined extracts were dried under vacuum at 30 °C in a rotary evaporator. The residue was redissolved in a methanol/methyl *tert*-butyl ether mixture (1:1, v/v) until the solution reached the defined volume of 10 mL. The solution was centrifuged at 11000 rpm for 10 min and then analyzed. The HPLC analysis was performed with methanol (solvent A) and methyl *tert*-butyl ether (solvent B) by using a gradient procedure on a C<sub>30</sub> column (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m, Trentec, Gerlingen, Germany) at 17 °C and a rate of 1.3 mL/min. The injection volume was 90  $\mu$ L, and the gradient elution started with 90% A and 10% B, reached 55% A at 35 min and 40% A at 40 min, was then isocratic for 10 min, and, finally, reached 90% A at 60 min. Lycopene and its *Z* isomers were quantified at 472 nm, and all-*E*-lycopene was identified by chromatographic comparison with the pure all-*E*-lycopene standard. However, since standards for lycopene *Z* isomers were not commercially available, these *Z* isomers were tentatively identified on the basis of the retention times and absorption spectrum characteristics described in the literature (24). Results are expressed as milligrams per kilogram of tomato juice, and lycopene *Z* isomers were quantified on the basis of the peak area of the all-*E*-lycopene standard. The percentages of *Z* isomerization were

calculated as follows:

$$Z \text{ isomerization (\%)} = [\text{total } Z \text{ isomers} / \text{total (} Z + E \text{) lycopene}] \times 100$$

All extractions were conducted under subdued light and were performed in triplicate for each sample. The analytical method was validated for total lycopene using certified reference material BCR-485 (mixed vegetables). The indicative value for all-*E*-lycopene in the reference material is 14.2 mg/kg, and this study obtained a mean value of 15.0  $\pm$  0.6 mg/kg after analysis of five samples.

**Total Phenolic Content.** Total phenolics in the juice were analyzed by a colorimetric assay using Folin-Ciocalteu's phenol reagent, as described by Singleton and Rossi (25). Before the colorimetric assay, the samples were subjected to a procedure of extraction and hydrolysis, as described by Gahler et al. (14). To hydrolyze the conjugated forms of polyphenols, 1 mL of 1 M HCl was added to 2 g of sample and the mixture was vortexed for 1 min and incubated at 37 °C for 30 min while being shaken constantly. Later, 1 mL of 2 M NaOH in 75% methanol was added, and the resulting mixture was vortexed for 1 min and incubated at 37 °C for 30 min while being shaken constantly. Then, 1 mL of 0.75 M metaphosphoric acid was added, and the resulting mixture was vortexed for 1 min and later centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The supernatant was transferred into a 10 mL volumetric flask, and 1 mL of an acetone/water mixture (1:1, v/v) was added to the pellet; the mixture was vortexed for 1 min and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The two supernatants were combined, and the flask was filled to 10 mL with the acetone/water mixture. Finally, a 1 mL aliquot was taken, centrifuged at 11000 rpm for 10 min, and assayed for total phenolics. For the colorimetric assay, 500  $\mu$ L of 0.2 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent and 400  $\mu$ L of a 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution were added to 100  $\mu$ L of hydrolysate. After incubation 2 h in darkness at room temperature, absorbance at 750 nm was measured. Gallic acid was used as the standard, and the total phenolic content in the samples was expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per kilogram of tomato juice.

**Total Flavonoid Content.** For total flavonoids, 200  $\mu$ L of tomato extract was mixed with 1.25 mL of distilled water and then 75  $\mu$ L of 5% NaNO<sub>2</sub> was added. After 6 min, 150  $\mu$ L of a 10% AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O solution was added and allowed to stand for an additional 5 min before 500  $\mu$ L of 1 M NaOH was added. The mixture was brought to 2.5 mL with distilled water and mixed well. The absorbance was measured immediately against the blank at 510 nm using a Hitachi U-2000 spectrophotometer. (+)-Catechin was used as the standard using the following calibration solutions: 4, 8, 12, 16, and 20  $\mu$ g/mL. The total flavonoid content was expressed as milligrams of catechin equivalents (CE) per kilogram of tomato juice (26).

**Analysis of Ascorbic Acid.** The ascorbic acid content was measured by reversed phase HPLC, as described by Esteve et al. (27). Ten grams of the sample was diluted to 100 mL with a 1% (w/v) meta-phosphoric acid solution and shaken for 10 min. The extracts were filtered first through Whatman No. 1 paper and then through a 0.45  $\mu$ m Millipore filter before being analyzed via HPLC. The system conditions were an injection volume of 20  $\mu$ L, a diode array detector wavelength set at 245 nm, isocratic elution at a flow rate of 1 mL/min, a Lichospher 100 RP-18 column (12.5 cm  $\times$  0.4 cm), and a 5  $\mu$ m particle size (Merck, Darmstadt, Germany). The mobile phase was 0.1 M phosphate buffer (pH 3.5), and L-(+)-ascorbic acid was used as the standard. Results were expressed as milligrams of ascorbic acid per kilogram of tomato juice.

**Total Antioxidant Activity (TAA).** The TAA of the hydrophilic and lipophilic extracts was measured by using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) test described by Miller et al. (28). The assay is based on the reduction of the radical cation of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) (ABTS), which is generated by filtering an ABTS solution through manganese dioxide powder. The antioxidant activity of the samples is calculated by determining the decrease in absorbance at 734 nm. Trolox was used as the standard, and results are expressed as millimoles of Trolox equivalents per kilogram of tomato juice. To obtain the hydrophilic extracts, 2 g of the sample was diluted in 10 mL of water, vortexed for 1 min, and centrifuged at 11000 rpm for 10 min. The supernatant was assayed for TAA. The lipophilic extracts were obtained by homogenizing 1 g of the sample in 20 mL of a hexane/acetone/methanol mixture (2:1:1, v/v/v) for 30 min protected from light. Then, 15 mL of

water was added, and the mixture was centrifuged at 5000 rpm for 5 min (11). The upper layer containing the lipophilic fraction was transferred into a 10 mL volumetric flask and filled to 10 mL with hexane. Finally, a 1 mL aliquot of the lipophilic fraction was dried under a nitrogen stream and then reconstituted into 0.5 mL of 2-propanol before being analyzed for TAA.

**Statistical Analysis.** Data were analyzed with Statistical Package SPSS version 15.0 for Windows. To study the variation in the analyzed compounds as a function of the time and temperature of storage, a two-factor analysis of variance (ANOVA) was performed using the general linear model (GLM). Tukey's test for pairwise comparison was used to determine significant differences in the different compounds analyzed for each juice. Relationships between variables were examined using Pearson correlation coefficients. *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

**Table 1** shows the changes in pH, titratable acidity, and total soluble solids during the storage of tomato juices packaged in Tetra pack and glass containers. For both the Tetra pack- and glass-packaged samples, the evaluated parameters showed stability throughout the storage trial. For this reason, only data for the initial, 6 month, and 12 month samples are given.

**Tables 2 and 3** show the evolution of the total lycopene content and the levels of *Z* isomerization in tomato juices packaged in Tetra pack and glass bottles at the three temperatures tested. As shown in **Table 2**, the total lycopene content remained substantially stable throughout the storage trial and varied from 99 to 120 mg/kg in tomato juice packaged in Tetra pack and from 96 to 115 mg/kg in samples stored in glass bottles. For both types of samples, no clear temperature dependency was revealed in the statistical analysis regarding the rate of total lycopene loss [ $p > 0.05$  (**Table 4**)], which was affected by only storage time [ $p < 0.05$  (**Table 4**)]. At the end of the storage trial, the final losses in the total lycopene content varied from 11 to 17% and from 7 to 15% in the samples stored in Tetra pack and glass containers, respectively.

**Figure 1** shows the variations in the content of all-*E*-lycopene and total *Z*-lycopene isomers in the samples stored at 8, 22, and 37 °C. As can be seen, the all-*E*-lycopene content slightly decreased toward the end of the storage trial as a function of storage time [ $p < 0.05$  (**Table 4**)]. The all-*E*-lycopene content varied from 88 to 115 mg/kg in the samples stored in Tetra pack and from 90 to 110 mg/kg in the samples stored in glass bottles, throughout the storage trial. The total *Z*-lycopene isomer content slightly increased in a time-dependent manner [ $p < 0.05$  (**Table 4**)] in both the Tetra pack-packaged (5–11 mg/kg) and glass-packaged samples (4–7 mg/kg). As shown in **Table 3**, the percentage of *Z* isomerization slightly increased with storage time [ $p < 0.05$  (**Table 4**)] in both types of samples, but the values always remained below 12%.

**Figure 2** shows the changes in the total phenolic and total flavonoid contents at different temperatures in the tomato juices tested. For both juices, the total phenolic and total flavonoid content remained virtually constant, although the statistical analysis indicates that the total phenolics were affected by both time and temperature [ $p < 0.05$  (**Table 4**)], while the total flavonoids were affected by only storage time [ $p < 0.05$  (**Table 4**)]. With regard to the juice packaged in Tetra pack, the total phenolic content varied from 260 to 300 mg of GAE/kg, whereas the total flavonoid content varied from 98 to 108 mg of CE/kg. Similar levels were observed in the tomato juices packaged in glass bottles, with the total phenolic content ranging from 240 to 285 mg of GAE/kg and the total flavonoid content ranging from 100 to 107 mg of CE/kg.

**Table 1.** Changes in the pH, Titratable Acidity (% of citric acid), and Soluble Solids (°Brix) of Juices during Storage at Three Different Temperatures

time	Tetra pack			glass bottle		
	8 °C	22 °C	37 °C	8 °C	22 °C	37 °C
	pH					
0 months		3.93			3.93	
6 months	4.01	4.01	3.99	4.01	4.01	3.97
12 months	4.00	4.00	3.97	3.99	3.99	3.94
	Titratable Acidity					
0 months		0.406			0.452	
6 months	0.407	0.417	0.421	0.443	0.442	0.439
12 months	0.427	0.423	0.418	0.418	0.454	0.425
	Soluble Solids					
0 months		5.37			5.76	
6 months	5.40	5.39	5.36	5.4	5.69	5.86
12 months	5.27	5.28	5.26	5.27	5.80	5.73

**Figure 3** shows the changes in the ascorbic acid content in tomato juice packaged in Tetra pack during storage at the different temperatures used in this study. The initial ascorbic acid concentration in the juice packaged in Tetra pack was 680 mg/kg, but no ascorbic acid was detected in the juices packaged in glass bottles (data not shown). It should be noted that in the case of the juices packaged in Tetra pack containers, ascorbic acid was added as an ingredient, a fact that is printed on the product label. As can be seen from the graph, the ascorbic acid content of the juice decreased in a time- and temperature-dependent manner [ $p < 0.05$  (**Table 4**)], so the greatest losses of ascorbic acid were observed in the samples stored at 37 °C; their ascorbic acid content decreased by approximately 50% after storage for 2 months. However, at 22 and 8 °C, losses of approximately 50% of the initial content were observed after only 8 and 12 months, respectively.

**Figure 4** illustrates the pattern of changes in the hydrophilic and lipophilic antioxidant activity of the juices tested. With regard to the samples packaged in Tetra pack, the hydrophilic TAA dropped in a clear time- and temperature-dependent fashion [ $p < 0.05$  (**Table 4**)], and approximately 30, 50, and 70% final losses occurred in the samples stored at 8, 22, and 37 °C, respectively. The lipophilic TAA, however, slightly decreased in the first 2 months from 0.4 to 0.2 mmol of Trolox/kg and then remained essentially unchanged for the duration of the study, regardless of the storage time or temperature [ $p > 0.05$  (**Table 4**)]. In the samples stored in glass bottles, the hydrophilic TAA was affected by both time and temperature [ $p < 0.05$  (**Table 4**)]. As can be seen, the hydrophilic TAA slightly decreased from 0.77 to 0.5 mmol of Trolox/kg in the first 2 months but then remained essentially constant until the end of the storage trial. In terms of the lipophilic TAA of the juices stored in glass bottles, the statistical analysis revealed that the lipophilic TAA was slightly affected by storage time [ $p < 0.05$  (**Table 4**)], although the lipophilic TAA also remained virtually stable throughout the storage trial.

## DISCUSSION

The lycopene content observed in the samples was similar to the values reported for tomato and tomato juices by other researchers (19, 20, 22, 29, 30). It should be noted that the slight differences observed in the lycopene content between juices at the beginning of the study are due to the variability of the hot-break tomato puree used as raw material for the elaboration of each type of juice. In the samples, all-*E*-lycopene was the major isomer

**Table 2.** Changes in the Total Lycopene Content (milligrams per kilogram)<sup>a</sup> of Juices Packaged in Tetra Pack Containers or Glass Bottles during Storage at Three Different Temperatures over 12 Months<sup>b</sup>

time	Tetra pack			glass bottle		
	8 °C	22 °C	37 °C	8 °C	22 °C	37 °C
0 months		118.97 ± 1.68 a			113.71 ± 2.53 a	
2 months	120.79 ± 2.20 a	116.22 ± 1.17 a	111.65 ± 8.31 a	113.37 ± 9.58 a	107.16 ± 3.82 a	113.98 ± 0.75 a
4 months	114.48 ± 3.36 a	112.7 ± 6.07 a	112.00 ± 4.61 a	114.76 ± 6.59 a	111.81 ± 5.81 a	114.54 ± 3.80 a
6 months	114.55 ± 6.38 a	114.02 ± 6.28 a	112.36 ± 10.27 a	115.32 ± 5.13 a	114.57 ± 0.88 a	110.20 ± 4.64 a
8 months	115.45 ± 6.20 a	111.56 ± 4.38 a	111.90 ± 5.37 a	104.70 ± 4.96 a	108.85 ± 4.09 a	111.54 ± 1.67 a
10 months	117.91 ± 2.09 a	111.36 ± 3.52 a	105.83 ± 7.32 a	101.00 ± 4.27 a	109.14 ± 3.16 a	112.85 ± 1.07 a
12 months	100.82 ± 0.55 a	105.68 ± 5.01 a	99.10 ± 4.53 b	103.82 ± 3.34 a	105.49 ± 1.79 a	96.04 ± 7.12 b

<sup>a</sup> Mean ± standard deviation. <sup>b</sup> Different letters within the same column mean statistical significance ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Changes in the Percentages<sup>a</sup> of Z Isomerization in Tomato Juice Packaged in Tetra Pack Containers or in Glass Bottles during Storage over 12 Months<sup>b</sup>

time	Tetra pack			glass bottle		
	8 °C	22 °C	37 °C	8 °C	22 °C	37 °C
0 months		4.69 ± 0.07 b			3.80 ± 0.25 b	
2 months	5.03 ± 0.92 b	4.22 ± 0.37 b	5.57 ± 0.13 b	5.10 ± 0.66 b	4.09 ± 0.12 b	4.09 ± 0.12 b
4 months	6.30 ± 0.16 b	6.64 ± 0.94 b	6.36 ± 1.55 b	5.09 ± 0.88 ab	4.73 ± 1.21 b	4.52 ± 0.66 ab
6 months	6.25 ± 0.47 b	6.49 ± 0.24 b	6.35 ± 0.03 b	4.84 ± 0.34 ab	4.83 ± 0.57 b	4.03 ± 0.57 b
8 months	6.31 ± 0.42 b	6.10 ± 0.70 b	6.31 ± 0.32 b	5.17 ± 1.25 ab	4.49 ± 0.70 b	4.46 ± 0.94 b
10 months	5.76 ± 0.73 b	6.27 ± 0.65 b	6.83 ± 0.49 b	7.58 ± 0.72 ab	4.17 ± 0.36 b	5.39 ± 0.32 b
12 months	10.06 ± 1.28 a	11.98 ± 2.34 a	11.93 ± 0.92 a	6.23 ± 0.64 a	6.04 ± 1.36 b	6.70 ± 2.16 b

<sup>a</sup> Mean ± standard deviation. <sup>b</sup> Different letters within the same column mean statistical significance ( $p < 0.05$ ).

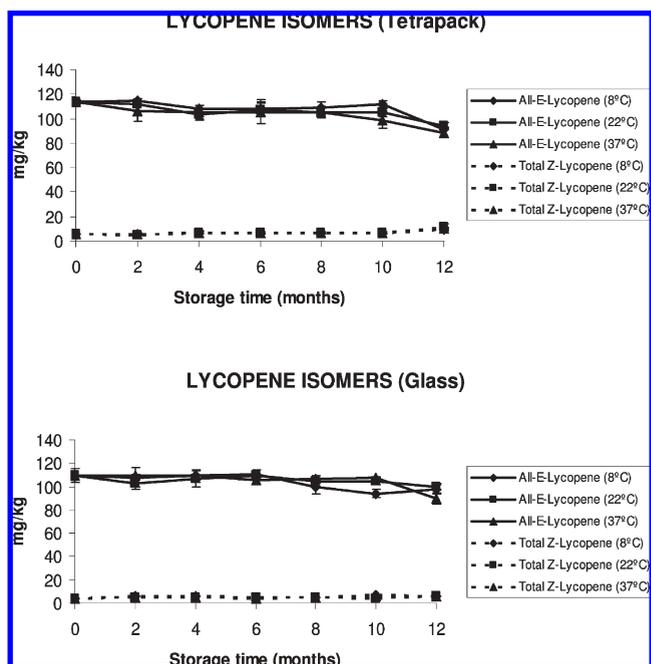
**Table 4.** Significance Values for Each Factor Obtained in the Two-Factor ANOVA by Using the General Linear Model

variable	time		temperature		time × temperature	
	Tetra pack	glass	Tetra pack	glass	Tetra pack	glass
total lycopene	0.000	0.009	0.094	0.912	0.782	0.400
<i>E</i> -lycopene	0.000	0.001	0.094	0.723	0.782	0.252
<i>Z</i> -lycopene	0.000	0.022	0.814	0.135	0.730	0.642
percent of Z isomerization	0.000	0.001	0.235	0.078	0.630	0.251
total phenolics	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
total flavonoids	0.000	0.008	0.329	0.260	0.398	0.131
hydrophilic TAA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
lipophilic TAA	0.570	0.024	0.495	0.469	1.000	0.850
ascorbic acid <sup>a</sup>	0.000	—	0.000	—	0.000	—

<sup>a</sup> Ascorbic acid was not detected in glass-packaged samples.

detected, accounting for approximately 90% of the total lycopene content. With regard to *Z*-lycopene isomers, we detected and tentatively identified three isomers in the samples: 13-*Z*-lycopene, 15-*Z*-lycopene, and 9-*Z*-lycopene. This lycopene isomer profile is consistent with that reported by other authors in different tomato products, in which all-*E*-lycopene generally accounts for more than 80% of the total lycopene content, with 13-, 15-, and 9-*Z*-lycopene being the main *Z* isomers detected (19, 24, 31).

In this storage trial, the stability of lycopene was higher than that previously reported, as the observed final losses were always <20% in the total lycopene content. For example, Odrizola-Serrano et al. (20) reported final losses of approximately 70% in tomato juice stored at 4 °C for 3 months in polypropylene bottles. Similarly, in tomato juices either thermally stabilized or processed by pulsed electric fields, Min et al. (18) reported 60–65% losses in lycopene content after storage for 3.7 months at 4 °C in polypropylene containers. In addition, Lin and Chen (19) reported lycopene losses of approximately 65% in canned tomato juice stored at 4, 25, and 37 °C for 3 months, and losses of approximately 75% when the juices were stored in glass containers (regardless of exposure to light). Moreover, similar lycopene

**Figure 1.** Changes in all-*E*-lycopene and total *Z*-lycopene isomer contents during storage of tomato juice over 12 months in Tetra pack containers or glass bottles.

degradation patterns (35–75%) have been reported during the storage of tomato paste (17). In contrast, in line with our data, Ordoñez-Santos et al. (29) reported lycopene stability in tomato pulp stored at 20 °C, but their storage trial lasted only 3 months so does not allow a proper comparison of results. The highest stability of lycopene observed in our study may have been aided by the presence and stability of other antioxidants such as polyphenolic substances and/or by the thermal inactivation of oxidizing enzymes during tomato processing, as has been suggested by other researchers (13, 22, 29).

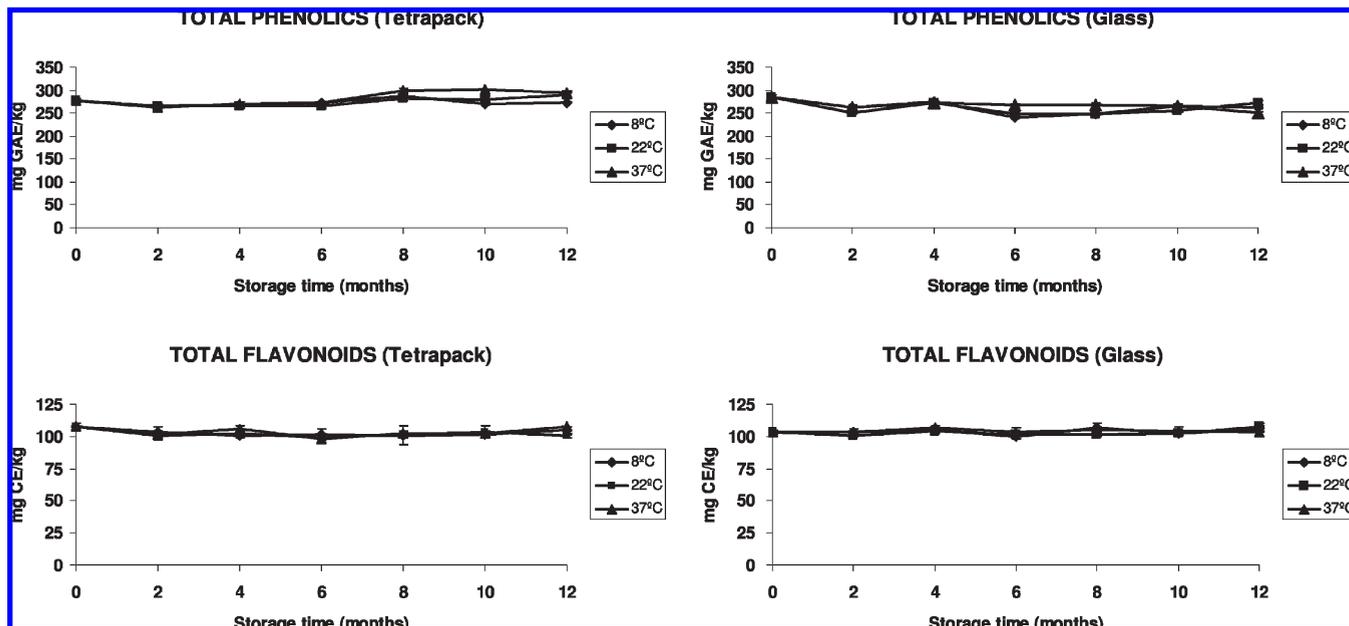


Figure 2. Changes in total phenolics and flavonoids during storage of tomato juice over 12 months in Tetra pack containers or glass bottles.

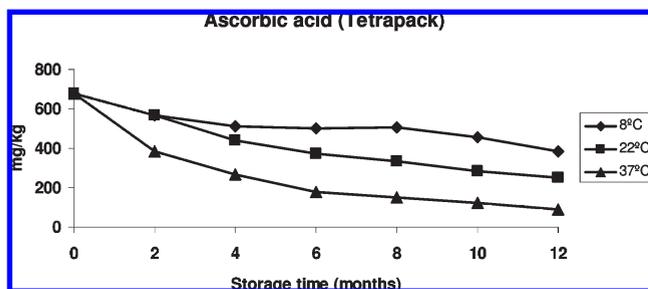


Figure 3. Changes in ascorbic acid content during storage of tomato juice over 12 months packaged in Tetra pack containers.

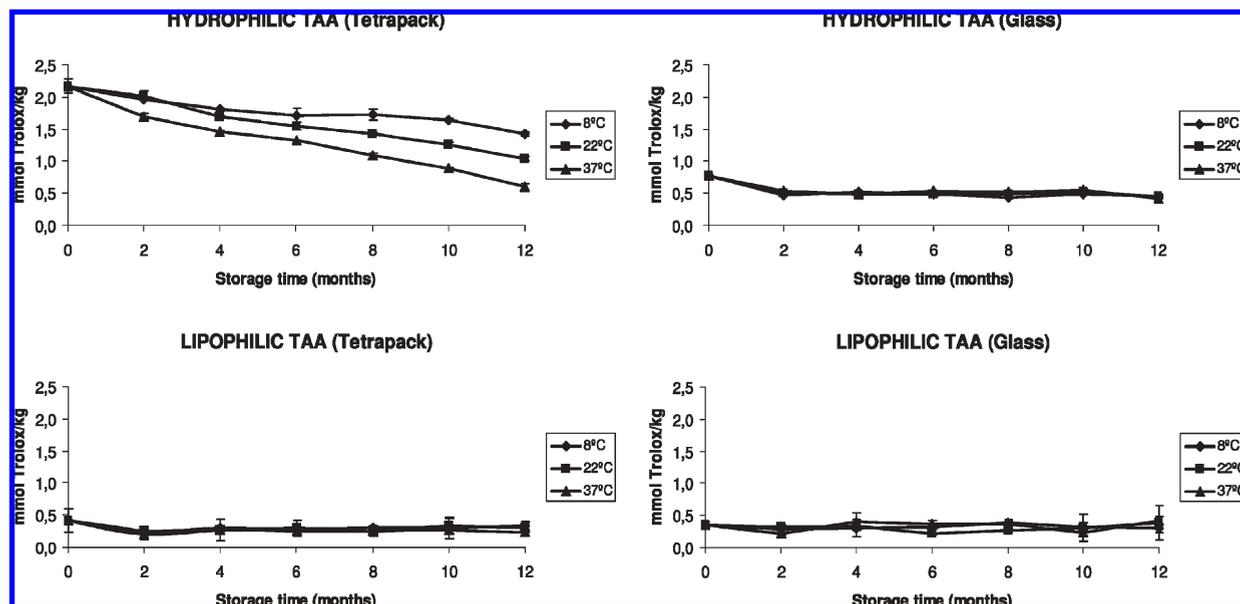
In the study presented here, we paid special attention to the isomerization of lycopene because human studies point to the putative nutritional benefits of consuming tomato products with an increased percentage of *Z*-lycopene isomers, as they seem to be better absorbed in the intestine (32–34). Additionally, these *Z*-isomers have been previously shown to have higher TAA than all-*E*-lycopene (35). In our study, a slight increase in *Z*-lycopene isomer content, which was accompanied by a slight decrease in all-*E*-lycopene content, was observed at the end of the storage trial. This agrees with data reported by Lin and Chen (19), who observed a favored formation of lycopene *Z* isomers, particularly 9-*Z* and 13-*Z*, during storage of tomato juice for 3 months. Interestingly, the formation of these *Z* isomers was accompanied by a decrease in the all-*E*-lycopene content. The explanation the researchers gave for this phenomenon was that isomerization is an important factor leading to lycopene loss during storage. This is because all-*E*-lycopene can be converted to 13-*Z*-lycopene, which later can undergo further isomerization to other *Z* isomers. This could explain the changes observed in our study regarding lycopene *Z* isomerization and all-*E*-lycopene losses at the end of the storage trial. Nevertheless, *Z* isomerization is an extremely complicated phenomenon and can vary depending on the storage conditions (time and temperature), moisture, and acidity of the product (19).

Although in our study storage conditions increased the degree of lycopene isomerization, the percentage of *Z* isomers remained

below 12% for the duration of the study. This amount of *Z*-lycopene isomers is within the range reported as being normal for tomato and tomato products, generally 5–20% (19, 36, 37). Hence, no additional nutritional advantages would be expected upon consumption of the juices, as improved absorption in human subjects has been reported after the intake of tomato products containing more than 40% *Z* isomers (33, 38).

The total phenolic content observed in the samples is in the range of those reported by other researchers in tomato and tomato products (100–500 mg/kg) (10, 14, 20, 26, 30). Similarly, the total flavonoid content in the samples is consistent with values previously reported for tomatoes (2–200 mg/kg) (10, 26). Overall, the total phenolic and flavonoid content in the samples remained essentially unchanged during storage, although a slight increase in total phenol content was observed in the Tetra pack samples stored at 37 °C after 8 months. Phenolic compounds have been shown to be very stable during storage of tomato juice at 4 °C for 3 months (20) and storage of tomato pulp at 4 and 20 °C for 3–5 months (17). In addition, Giovanelli and Paradiso (17) observed that total phenolic compound levels increased in tomato pulp stored at 37 °C, and the researchers assumed that such an effect was likely due to the formation of Maillard reaction products, which are capable of reacting with Folin-Ciocalteu's phenol reagent. Hypothetical formation of these Maillard products via nonenzymatic browning could have contributed to the slight increase in total phenolic content observed in the samples of this study stored at 37 °C. Nevertheless, the possibility of phenolics being released from the juice matrix as a consequence of time and storage temperature should not be ruled out as a contributor to this slight increase. In addition to Maillard products, ascorbic acid can also react with Folin-Ciocalteu's phenol reagent, giving an overestimation of phenolic compound content. However, previous analysis has demonstrated that natural ascorbic acid is fully degraded during the hydrolysis of the tomato sample before total phenolic determination (data not shown).

Ascorbic acid is a reactive compound, and it is particularly vulnerable to processing and storage conditions. Although ascorbic acid is a natural antioxidant found in tomatoes (10, 12), the thermal processing during juice processing leads to total degradation, since no ascorbic acid was detected in the glass-bottled



**Figure 4.** Changes in hydrophilic and lipophilic total antioxidant activity (TAA) during storage of tomato juice over 12 months in Tetra pack containers or glass bottles.

juices. With regard to the samples stored in Tetra pack, which were enriched with ascorbic acid, the data confirm the detrimental effect of storage conditions on such a labile antioxidant. Similar loss rates have been reported during storage of tomato juice at 4 °C for 70 days (18) or 3 months (20), and in the case of tomato pulp stored at 20 °C for 3 months (29). It has been suggested that ascorbic acid and other antioxidants, such as phenolics, might aid in preventing the degradative oxidation of lycopene during storage (13, 22). However, on the basis of these results, it seems that ascorbic acid plays a minor role in this preventive effect. This is because lycopene stability was similar in the samples stored in Tetra pack and those stored in glass bottles, irrespective of the addition of ascorbic acid in the formulation of the juices. Therefore, as the polyphenolic compounds (total phenols and flavonoids) remained essentially unchanged during storage, it is reasonable to assume that these compounds play a key role in preventing lycopene losses.

It is generally well accepted that ascorbic acid, together with phenolics, is a major contributor to the hydrophilic TAA (9, 10, 12, 26), and a clear time and temperature dependency was observed in the losses of hydrophilic TAA in juices packaged in Tetra pack containers, which closely reflected the changes observed in the ascorbic acid content. This is supported by the significant positive correlation observed between the ascorbic acid content and the hydrophilic TAA of the Tetra pack samples, with correlation coefficients higher than 0.900 ( $p < 0.05$ ). A similar trend was observed by Odriozola-Serrano et al. (20) during cold storage of tomato juice extended for 3 months; they reported that the ascorbic acid losses were paralleled by the decrease in hydrophilic TAA.

In the case of the samples stored in glass containers, the initial hydrophilic TAA values were lower than those of the Tetra pack samples, clearly demonstrating the contribution of ascorbic acid to hydrophilic TAA, since the total phenolic content and total flavonoid content in the Tetra pack- and glass-packaged juices were very similar. Thus, it is also clear that, in glass-packaged samples, hydrophilic TAA relied on the total phenolic and flavonoid content, as changes in hydrophilic TAA during the storage trial showed a trend similar to that of total phenolics and flavonoids, with correlation coefficients of  $> 0.600$  ( $p < 0.05$ ).

Unlike for hydrophilic TAA, relationships between the changes in lycopene content and lipophilic TAA were not as clear as expected, and no significant correlation was observed, although these parameters were very stable during the storage trial. Therefore, it is reasonable to assume that other antioxidants, most likely lipophilic phenolic compounds, may have contributed to maintaining the lipophilic TAA of the samples during storage.

Lipophilic compounds such as lycopene are responsible for lipophilic antioxidant activity in tomatoes, but the contribution of such compounds to TAA is considered to be small. In general, hydrophilic antioxidant activity accounts for  $> 90\%$  of the TAA of fruits and vegetables (39). In tomatoes, the hydrophilic fraction displays greater antioxidant activity than the lipophilic fraction; the difference depends on the analytical method used. For example, hydrophilic activity accounted for  $\sim 92\%$  of the TAA determined by the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) (39) and TEAC assays (40), approximately 87% as measured by the xanthine oxidase/xanthine system, and practically 100% when evaluated by the myeloperoxidase/NaCl/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system (41). Accordingly, we observed that the hydrophilic TAA values were always higher than those of the lipophilic fractions, with values accounting for 70–84% of the TAA in the samples stored in glass and in Tetra pack, respectively. In this regard, Toor and Savage (40) have suggested that the low antioxidant activity in the lipophilic tomato extracts, as measured by the TEAC assay, is probably due to the low levels of lipophilic phenolics.

As a final remark regarding the effect of packaging material, we did not observe relevant differences in antioxidant stability when using Tetra pack and glass. As shown for lycopene, total phenols, and total flavonoids, the time trend of changes was similar regardless of the packaging material used, and similar behavior was also observed for lipophilic TAA.

In summary, the bioactive compounds lycopene and phenolic compounds (total phenols and flavonoids) remained essentially stable during storage for 12 months, indicating that tomato juices maintain their nutritional value in terms of antioxidant composition during their shelf life. However, as expected, ascorbic acid was shown to be a more labile antioxidant that is markedly affected by storage conditions. Storage led to a slight increase in the content of *Z*-lycopene isomers, but the levels achieved would

not confer a nutritional advantage in terms of improving bioavailability. No advantage is achieved by using Tetra pack or glass in terms of improving antioxidant stability. Storage at room temperature (22 °C) is appropriate for the maintenance of the antioxidant compounds during shelf life, except for the ascorbic acid content. This information is of interest for consumers and nutritionists; they can expect a beneficial effect from the consumption of tomato juice during the entire shelf life. It is also useful for the industry, since room-temperature storage reduces product distribution and storage costs.

#### LITERATURE CITED

- (1) Diplock, A. T.; Charleux, J. L.; Crozier-Willi, G.; Kok, F. J.; Rice-Evans, C.; Roberfroid, M.; Stahl, W.; Viña-Ribes, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br. J. Nutr.* **1998**, *80* (Suppl. 1), S77–S112.
- (2) Lee, J.; Koo, N.; Min, D. B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *C. R. F. S. F. S.* **2004**, *3*, 21–33.
- (3) Agarwal, S.; Rao, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *C. M. A. J.* **2002**, *163*, 739–744.
- (4) Sesso, H. D.; Liu, S.; Gaziano, J. M.; Buring, J. E. Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 2336–2341.
- (5) Stahl, W.; Sies, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1740*, 101–107.
- (6) Jacob, K.; Periago, M. J.; Böhm, V.; Berrueto, G. R. Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. *Br. J. Nutr.* **2008**, *99*, 137–146.
- (7) Erdman, J. W., Jr.; Ford, N. A.; Lindshield, B. L. Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant activity? *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *483*, 229–235.
- (8) Liu, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78*, 517S–520S.
- (9) Arnao, M. B.; Cano, A.; Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* **2001**, *73*, 239–244.
- (10) Martínez-Valverde, I.; Periago, M. J.; Provan, G.; Chesson, A. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 323–330.
- (11) Shi, J.; Qu, Q.; Yakuda, Y.; Xue, S. J.; Jiang, Y.; Koide, S.; Shim, Y. Y. Investigation of the antioxidant and synergistic activity of lycopene and other natural antioxidants using LAME and AMVN model systems. *J. Food Comp. Anal.* **2007**, *20*, 603–608.
- (12) Periago, M. J.; García-Alonso, F. J.; Jacob, K.; Olivares, A. B.; Bernal, M. J.; Iniesta, M. D.; Martínez, C.; Ros, G. Bioactive compounds, folates and antioxidant properties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) during vine ripening. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2008**, *12*, 1–15.
- (13) Takeoka, G. R.; Dao, L.; Flessa, S.; Gillespie, D. M.; Jewell, W. T.; Hueber, B.; Bertow, D.; Ebeler, S. E. Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3713–3717.
- (14) Gahler, S.; Otto, K.; Böhm, V. Alterations of vitamin C, total phenolics and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7962–7968.
- (15) Capanoglu, E.; Beekwilder, J.; Boyacioglu, D.; Hall, R.; de Vos, R. Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 964–973.
- (16) Mayeaux, M.; Xu, Z.; King, J. M.; Prinyawiwatkul, W. Effects of cooking conditions on the lycopene content in tomatoes. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 461–464.
- (17) Giovannelli, G.; Paradiso, A. Stability of dried and intermediate moisture tomato pulp during storage. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7277–7278.
- (18) Min, S.; Jin, Z. T.; Zhang, Q. H. Commercial-scale pulsed electric field processing of tomato juice. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3338–3344.
- (19) Lin, C. H.; Chen, B. H. Stability of carotenoids in tomato juice during storage. *Food Chem.* **2005**, *90*, 837–846.
- (20) Odriozola-Serrano, I.; Soliva-Fortuny, R.; Martín-Belloso, O. Changes of health-related compounds throughout cold storage of tomato juice stabilized by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innovations Food Sci. Emerg. Technol.* **2008**, *9*, 272–279.
- (21) Zerdin, K.; Rooney, M. L.; Vermuë, J. The vitamin C content of orange juice packed in an oxygen scavenger material. *Food Chem.* **2003**, *82*, 387–395.
- (22) Sánchez-Moreno, C.; Plaza, L.; de Ancos, B.; Cano, M. P. Nutritional characterisation of commercial traditional pasteurised tomato juices: Carotenoids, vitamin C and radical-scavenging capacity. *Food Chem.* **2006**, *98*, 749–756.
- (23) Böhm, V. Use of column temperature to optimise carotenoid isomer separation by C30 high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **2001**, *24*, 955–959.
- (24) Fröhlich, K.; Conrad, J.; Schmid, A.; Breithaupt, D. E.; Böhm, V. Isolation and structural elucidation of different geometrical isomers of lycopene. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2007**, *77*, 369–375.
- (25) Singleton, V. L.; Rossi, A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
- (26) Dewanto, V.; Wu, X.; Adfom, K. K.; Liu, R. H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3010–3014.
- (27) Esteve, M. J.; Farré, R.; Frígola, A.; López, J. C.; Romera, J. M.; Ramírez, M.; Gil, A. Comparison of voltammetric and high performance liquid chromatographic methods for ascorbic acid determination in infant formulas. *Food Chem.* **1995**, *52*, 99–102.
- (28) Miller, N. J.; Sampson, J.; Candeias, L. P.; Bramley, P. M.; Rice-Evans, C. A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* **1996**, *384*, 240–246.
- (29) Ordóñez-Santos, L. E.; Vázquez-Odériz, L.; Arbones-Macineira, E.; Romero-Rodríguez, M. A. The influence of storage time on micronutrients in bottled tomato pulp. *Food Chem.* **2009**, *112*, 146–149.
- (30) Pérez-Conesa, D.; García-Alonso, F. J.; García-Valverde, V.; Iniesta, M. D.; Jacob, K.; Sánchez-Siles, L. M.; Ros, G.; Periago, M. J. Changes in bioactive compounds and antioxidant activity during homogenization and thermal processing of tomato puree. *Innovations Food Sci. Emerg. Technol.* **2009**, *10*, 177–188.
- (31) Ishida, B. K.; Chapman, M. H. A comparison of carotenoid content and antioxidant activity in catsup from several commercial sources in the United States. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 8017–8020.
- (32) Boileau, A. C.; Merchen, N. R.; Wasson, K.; Atkinson, C. A.; Erdman, J. W., Jr. *cis*-Lycopene is more bioavailable than *trans*-lycopene *in vitro* and *in vivo* lymph-cannulated ferrets. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1176–1181.
- (33) Unlu, N. Z.; Bohn, T.; Davis, F.; Clinton, S. K.; Schwartz, S. J. Carotenoid absorption in humans consuming tomato sauces obtained from tangerine or high-β-carotene varieties of tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1597–1603.
- (34) Failla, M. L.; Chitchumroonchokchai, C.; Ishida, B. K. *In vitro* micellarization and intestinal cell uptake of *cis* isomers of lycopene exceed those of all-*trans*-lycopene. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 482–486.
- (35) Böhm, V.; Puspitasari-Nienaber, N. L.; Ferruzzi, M. G.; Schwartz, S. J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α-carotene, β-carotene, lycopene and zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 221–226.
- (36) Schierle, J.; Bretzel, W.; Bühler, I.; Faccin, N.; Hess, D.; Steiner, K.; Schüep, W. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chem.* **1997**, *59*, 459–465.
- (37) Porrini, M.; Riso, P.; Testolin, G. Absorption of lycopene from single or daily portions of raw and processed tomato. *Br. J. Nutr.* **1998**, *80*, 353–361.
- (38) Unlu, N. Z.; Bohn, T.; Francis, D. M.; Nagaraja, H. N.; Clinton, S. K.; Schwartz, S. J. Lycopene from heat-induced *cis*-isomer-rich

tomato sauce is more bioavailable than from all-*trans*-rich tomato sauce in human subjects. *Br. J. Nutr.* **2007**, *98*, 140–146.

- (39) Wu, X.; Beecher, G. R.; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Gebhardt, S. E.; Prior, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4026–4037.
- (40) Toor, R. K.; Savage, G. P. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 487–494.
- (41) Lavelle, V.; Peri, C.; Rizzolo, A. Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using xanthine oxidase, myeloperoxidase and copper-induced lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1442–1448.

---

Received March 14, 2009. Revised manuscript received June 20, 2009. Accepted June 20, 2009. We thank EU VI Frame Programme for the financial support through the IP LYCOCARD-2006-016213 project. We are grateful to the Ministry of Education and Science of the Spanish Government for Project AGL 2006-26965-E and the contract for D.P.-C. (Programa Juan de la Cierva) and to the “Fundación Seneca” of the Murcia Regional Government for Project 05774/PI/07. The results obtained in this paper only reflect the authors’ view and the Community is not liable for any use that may be made of the information contained herein.



## The influence of post-harvest UV-C hormesis on lycopene, $\beta$ -carotene, and phenolic content and antioxidant activity of breaker tomatoes

Sergio Bravo, Javier García-Alonso, Gala Martín-Pozuelo, Victoria Gómez, Marina Santaella, Inmaculada Navarro-González, María Jesús Periago\*

Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Veterinary Science, Campus de Espinardo, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum," 30.071 Murcia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 May 2012

Accepted 10 July 2012

Available online 17 July 2012

#### Keywords:

Tomato  
Bioactive compound  
Lycopene  
Carotene  
Phenolic compound  
Antioxidant activity  
UV-C hormesis

### ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the levels of  $\beta$ -carotene, lycopene and its isomers, and total and individual phenolic compounds in tomatoes treated with different levels of UV-C radiation (UV-C hormesis). Mature green tomatoes (breaker stage) were exposed to different doses of UV-C irradiation (1.0, 3.0 and 12.2 kJ/m<sup>2</sup>). After UV treatment, tomatoes were stored at room temperature for 8 d, and then analyzed for bioactive compounds and antioxidant activity. Exposed tomatoes were compared with control samples stored at different conditions (darkness and day/night cycle). The lycopene content in breaker tomatoes increased almost twofold following UV light treatments, while  $\beta$ -carotene levels decreased, when treated samples were compared with the two control batches. Proportions of Z-lycopene also increased when the tomatoes were exposed to UV for more than 3 h. The UV treatments significantly increased the total phenolic content and the antioxidant capacity of treated tomatoes compared to untreated samples, but no clear effect was observed for individual phenolic compounds. These results suggest that UV-C irradiation of tomatoes could improve the beneficial effect of tomatoes for human health by increasing the levels of certain bioactive compounds.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Fresh horticultural crops, including many fruits and vegetables, are treated with UV-C light irradiation (UV-C hormesis) as a way to extend their shelf life (Ben-Yeshohua, 2003; Charles & Arul, 2007). UV-C radiation is harmful to spoilage organisms (bacteria and mould) and it also slows down the senescence process in plant foods, delaying the ripening of fresh fruits and vegetables (Arul, Mercier, Baka, & Maharaj, 1992; Charles, Kalantari, Corcuff, & Arul, 2005; Charles & Arul, 2007; Liu et al., 1993). A role for UV-C treatment in the control of post-harvest diseases has been demonstrated in tomatoes (Charles, 1998; Charles, Corcuff, Roussel, & Arul, 2003; Stevens et al., 1997; Stevens et al., 1998; Stevens et al., 2004). However, investigations into the effects of UV-C treatments, such as post-harvest UV irradiation, on the ripening of fresh tomatoes have resulted in different conclusions regarding the appropriate radiation intensity, the optimal ripening stage of tomatoes, and the storage conditions. For example, Liu et al. (1993) found that the prolonged exposure of tomatoes to UV-C accelerates their ripening and

senescence, but higher doses impaired ripening and caused abnormal browning, manifested as sun scalding on the fruit surface (Maharaj, Arul, & Nadeau, 1999). This may be a consequence of photo-oxidation reactions caused by UV irradiation via the production of reactive oxygen species.

Consumers require products that are not only safe, but that are also of optimal nutritional quality. For this reason, several recent studies have examined the importance of UV-C radiation with regard to different quality parameters of treated plant foods, evaluating possible effects on their functional properties. One recognized advantage of applying UV-C is the capability to improve the nutraceutical properties of plant foods, and some studies have reported the possibility of increasing the antioxidant content through UV-C irradiation as a post-harvest treatment (Cantos, García-Viguera, de Pascual-Teresa, & Tomás-Barberán, 2000; González-Barrio, Vidal-Guevara, Tomás-Barberán, & Espín, 2009; Jagadeesh et al., 2009; Liu, Zabarar, Bennett, Aguas, & Woonton, 2009). Exposure to UV light causes stress in plant tissues, which stimulates the biosynthesis of defensive secondary metabolites with antioxidant activity; these are mainly lycopene in tomatoes (Liu et al., 2009) and phenolic compounds in grape berries, grapes, and tomatoes (Cantos et al., 2000; González-Barrio et al., 2009; Jagadeesh et al., 2009; Liu et al., 2009).

Although UV-C hormesis is known to increase the content of lycopene and total phenolic compounds in tomatoes (Jagadeesh et al., 2009; Liu et al., 2009; Liu, Cai, Lu, Han, & Ying, 2012), its effect on individual bioactive

Abbreviations: FRAP, Ferric reducing/antioxidant power assay; FW, Fresh weight; GAE, Gallic acid equivalent; h, Hour; HPLC, High-performance liquid chromatography; ROS, Reactive oxygen species; SD, Standard deviation; TAA, Total antioxidant activity; TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity assay; UV-C, Ultraviolet C light.

\* Corresponding author. Tel.: +34 868884793.

E-mail address: [mjperi@um.es](mailto:mjperi@um.es) (M.J. Periago).

compounds has not been intensively investigated. The aim of the present study was to ascertain the effect of UV-C hormesis on the individual antioxidant bioactive compounds in breaker tomatoes intended for fresh consumption. Particular emphasis was placed on determining any changes in the content of  $\beta$ -carotene, lycopene and its isomers, and total and individual phenolic compounds, as well as changes in *in vitro* antioxidant activity.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Tomato Samples and UV-C Treatment

Mature green tomatoes (breaker stage) were provided by a local tomato processor company (Murcia, Spain). Tomatoes were randomly selected according to the quality control criteria used by the company's technical personnel and were harvested during the spring of 2009. Breaker tomatoes ("Daniella" variety) were harvested as mature green tomatoes before reaching the full ripening stage. Breaker tomatoes were separated into six batches. One group was used as an initial control group (initial samples), which were analyzed immediately after harvesting. Three batches were subjected to hormetic UV-C treatment under three different conditions. Two control batches of non-irradiated tomatoes were used for comparison, and were stored at room temperature under a day/night cycle (Control 1) or in total darkness (Control 2).

Tomatoes were irradiated under ambient conditions on the day of harvest, using a UV-C lamp with a peak of 254 nm. The UV-C chamber was 700 mm wide, 580 mm deep, and 732 mm high, and contained a 15 W lamp that emitted UV-C light. The tomatoes were irradiated on their blossom and calyx ends at an intensity of  $0.282 \text{ W/m}^2$ , as measured with a portable digital radiometer (Delta Ohm DO9721, Caselle di Selvazzano, Italy). UV-C irradiation was continuously applied for 1, 3, and 12 h, which resulted in the following doses: 1.0, 3.0 and  $12.2 \text{ kJ/m}^2$ , respectively (Fig. 1). After hormetic treatment, tomato samples were allowed to ripen under day/night cycle illumination conditions at room temperature for up to 8 d. All samples were cut and homogenized in an Omnimixer (Ultra-Turrax T25, Staufen, Germany) and stored at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  until analysis. Individual phenolic compounds (flavonoids and hydroxycinnamic acids) were analyzed in tomato samples that were freeze-dried prior to analysis.

### 2.2. Analysis of Carotenoids

Carotenoids were isolated by extraction with methanol/tetrahydrofuran (1 + 1, v/v) containing 0.1% butylated hydroxytoluene. Briefly, 400 mg of MgO, 200  $\mu\text{L}$  of trans- $\beta$ -apo-8'-carotenal (internal standard solution), and 35 mL of methanol/tetrahydrofuran were added to 0.6 g of sample and homogenized for 5 min using a mixer. The resulting solution was vacuum-filtered through No. 5 Whatman paper. This extraction procedure was repeated twice (until the residue was colorless) and the combined extracts were dried under vacuum at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  in a rotary evaporator. The residue was re-dissolved in methanol/methyl tert-butyl ether (1 + 1, v/v) until the solution reached the defined volume of 10 mL. The solution was centrifuged at 11,000 rpm for 10 min and then analyzed by HPLC with diode array detection (Agilent 1200 Series, Mechelen, Belgium) according to Böhm (2001) and Seybold, Fröhlich, Bitsch, Otto, and Böhm (2004). Separation was carried out at a flow rate of  $1.3 \text{ mL min}^{-1}$  using a gradient of methanol (Solvent A) and MTBE (Solvent B) at  $17 \text{ }^\circ\text{C}$  on a C30-column ( $250 \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ , Trentec, Gerlingen, Germany). The gradient elution started with 90% A and 10% B to reach 55% A at 35 min, 40% at 40 min, then ran under isocratic conditions for 10 min, finally reaching 90% A at 60 min. Lycopene and its isomers were quantified at 472 nm and  $\beta$ -carotene was quantified at 450 nm. Since standards of lycopene cis-isomers were not available, they were tentatively identified based on retention times and absorption spectrum characteristics described in the literature (Seybold et al., 2004; Fröhlich, Conrad, Schmid, Breithaupt, & Böhm, 2007). Lycopene content was expressed as mg/kg FW.

### 2.3. Total Phenolic Compounds

Total polyphenol content was quantified using a colorimetric assay and Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma, St. Louis, USA) according to the method described by Singleton and Rossi (1965). Prior to colorimetric analysis and according to García-Valverde, Navarro-González, García-Alonso, & Periago (2011), the samples were subjected to a procedure of extraction/hydrolysis. Briefly, 1 mL of 1 M HCl was added to 2 g of sample, vortexed for 1 min, and incubated at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  for 30 min. Next, 1 mL of 2 M NaOH in a 75% methanol solution was added, and the resulting

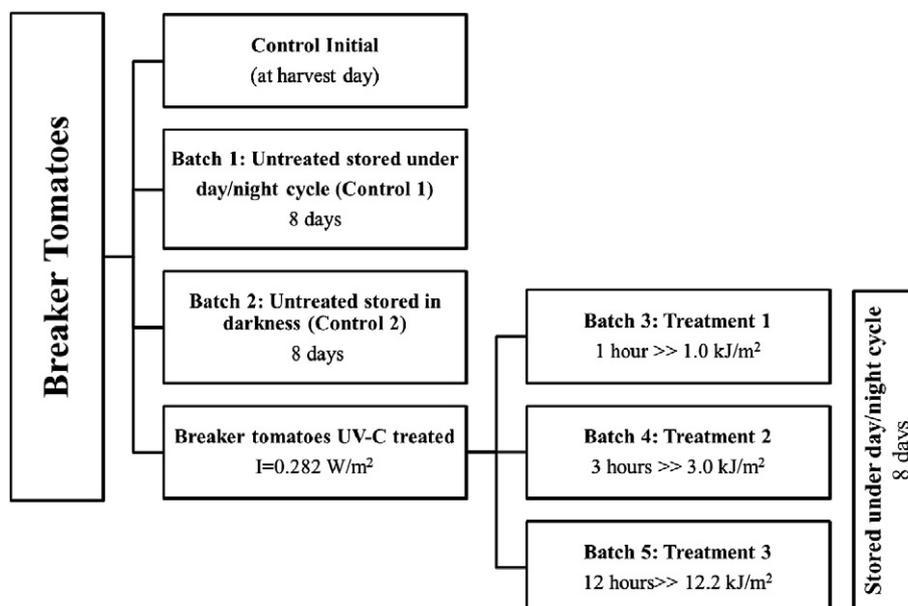


Fig. 1. Diagram of different treatments applied.

mixture was vortexed for 2 min and incubated at 37 °C for 30 min. Then, 1 mL of 0.75 M of metaphosphoric acid was added, the sample was vortexed for 2 min, and then centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The supernatant was removed and transferred to a 10 mL volumetric flask. The pellet was re-suspended in 1 mL of acetone:water (1:1, v/v), vortexed for 1 min, and centrifuged at 5000 rpm for 10 min. Both supernatants were combined and the final volume was made to 10 mL with acetone:water (1:1, v/v). The resulting extract was assayed for total phenolic content. Total phenols were expressed as mg GAE per kg FW of sample.

#### 2.4. Identification and Quantification of Individual Phenolic Compounds by HPLC

Based on the method described by García-Valverde et al. (2011), 0.1 g of lyophilized tomato fruit in 1.5 mL of 70% methanol were vortexed for 1 min and then centrifuged (Eppendorf Model 5804R, Hamburg, Germany) at 13000 rpm for 10 min. The extraction was repeated three times and the combined extracts were dried to 1 mL in a vacuum concentrator (Eppendorf Model 5301, Hamburg, Germany). Phenolic compounds were analyzed by HPLC according to García-Valverde et al. (2011) using a diode array detector (Agilent 1200 Series, Mechelen, Belgium) and an RP-18 250 × 4 mm, 5 µm LiChroCart column (Merck, Darmstadt, Germany) set at 15 °C. Contents of individual phenolic compounds were expressed as mg/kg of fresh weight, after determining the moisture content of samples. Data were expressed on a fresh weight basis since other parameters were analyzed and expressed based on fresh samples.

#### 2.5. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay

The antioxidant potential of tomato extracts was estimated using the FRAP assay (Benzie and Strain (1999)). Briefly, 2 g of sample was diluted in 10 mL of water, vortexed for 1 min, and centrifuged at 11000 rpm for 10 min, and the supernatant was used for the FRAP assay. A 100 µL volume of tomato extract was added to 1 mL of the FRAP reagent. An intense blue color developed and measured at 593 nm. The 4-min absorbance readings were used to calculate FRAP values. Aqueous solutions containing known concentrations of Fe (II) (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) in the range of 0.1–2 mM were used for calibration, and the results were expressed as mmol of Fe (II) equivalents per kg of FW (Eq. Fe (II)/kg).

#### 2.6. Total Antioxidant Activity (TAA)

The total antioxidant activity (TAA) in both hydrophilic and lipophilic extracts of tomato fruit was measured using the TEAC test described by Miller, Sampson, Candeias, Bramley, and Rice-Evans (1996). Hydrophilic extracts were obtained by diluting 2 g of sample in 10 mL of water, vortexing for 1 min, and centrifuging at 11000 rpm for 10 min. The supernatant was assayed for TAA.

Lipophilic extracts were obtained by homogenizing 1 g of sample in 20 mL of a hexane/acetone/methanol mixture (2:1:1, v/v/v) for 30 min, protected from light. Next, 15 mL of water was added and the mixture was centrifuged at 5000 rpm for 5 min (Shi et al., 2007). The upper layer containing the lipophilic fraction was transferred to a 10 mL volumetric flask and made to 10 mL with hexane. Finally, a 1 mL aliquot of the lipophilic fraction was dried under a nitrogen stream and reconstituted into 0.5 mL of 2-propanol before being analyzed for TAA. Trolox was used as the standard, and the results are expressed as mmol of Trolox equivalents per kg of tomato.

#### 2.7. Statistical Analysis

All analyses were performed in triplicate, and the results are expressed as means and SD. Significant differences between UV-C light-treated and untreated samples for all parameters were determined using a one-way ANOVA. A post-hoc Tukey's test was also conducted to establish the differences among mean values. A Pearson correlation was carried out to study the relationship between all parameters. Statistical analyses were carried out using SPSS 15.0. The threshold p-value chosen for statistical significance was  $p < 0.05$ .

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Effect of UV-C Radiation on Lycopene and β-carotene Content

The total lycopene, all-*E*-lycopene, and *Z*-lycopene (the sum of (5*Z*)-, (9*Z*)-, (13*Z*)- and (15*Z*)-lycopene), and β-carotene content of breaker tomatoes not treated with UV-C light (initial Control, Control 1 and Control 2) and exposed to UV-C light for 1, 3 and 12 h are presented in Table 1. The total lycopene content increased significantly in all samples during storage for 8 d at room temperature. However, the increase was greater in samples exposed to UV-C light, where lycopene content was up to eightfold higher than in the initial Control group. This difference

**Table 1**  
Content of β-Carotene, E-Lycopene, Z-Lycopene and Total Lycopene expressed as mg/kg FW. Total phenolic expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE)/kg FW. Individual phenolic compounds expressed as mg/kg FW<sup>1</sup>.

Breaker Tomatoes	Control Initial	Control 1	Control 2	UV 1 hour	UV 3 hours	UV 12 hours
β-Carotene	0.55 ± 0.01 <sup>d</sup>	1.40 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.23 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.75 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.76 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.79 ± 0.05 <sup>c</sup>
E-Lycopene	5.00 ± 0.19 <sup>c</sup>	31.40 ± 1.18 <sup>b</sup>	34.20 ± 0.82 <sup>b</sup>	51.80 ± 2.22 <sup>a</sup>	55.68 ± 2.23 <sup>a</sup>	34.56 ± 3.21 <sup>b</sup>
Z-Lycopene	1.70 ± 0.13 <sup>c</sup>	4.18 ± 0.63 <sup>b</sup>	7.81 ± 0.20 <sup>a</sup>	7.77 ± 0.56 <sup>a</sup>	7.16 ± 0.36 <sup>a</sup>	8.00 ± 0.83 <sup>a</sup>
Total Lycopene	6.94 ± 0.10 <sup>d</sup>	35.25 ± 1.13 <sup>c</sup>	42.02 ± 0.88 <sup>b</sup>	59.91 ± 1.47 <sup>a</sup>	63.17 ± 1.90 <sup>a</sup>	42.56 ± 2.42 <sup>b</sup>
Total phenolic compounds	258.75 ± 18.04 <sup>b</sup>	244.45 ± 29.79 <sup>b</sup>	238.02 ± 11.06 <sup>b</sup>	233.73 ± 5.39 <sup>b</sup>	222.83 ± 26.88 <sup>b</sup>	366.45 ± 16.32 <sup>a</sup>
Chlorogenic acid	23.91 ± 0.48 <sup>a</sup>	2.22 ± 0.75 <sup>e</sup>	10.24 ± 0.07 <sup>b</sup>	10.35 ± 0.23 <sup>b</sup>	4.17 ± 0.43 <sup>c</sup>	3.27 ± 0.23 <sup>d</sup>
Chlorogenic acid derivatives	5.90 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.03 <sup>c</sup>	nd	3.25 ± 0.12 <sup>b</sup>	nd	nd
Ferulic acid	0.87 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.41 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.03 <sup>cd</sup>	0.81 ± 0.09 <sup>bc</sup>
Ferulic acid derivatives	0.56 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.01 <sup>a</sup>	nd	0.49 ± 0.15 <sup>a</sup>	nd
Naringenin	0.32 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.09 <sup>bc</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>c</sup>	nd
Naringenin derivatives	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Caffeic acid	nd	nd	nd	0.32 ± 0.02	nd	nd
Caffeic acid derivatives	nd	nd	0.57 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.04 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.09 <sup>b</sup>	nd
Rutin	1.78 ± 0.07 <sup>ab</sup>	1.16 ± 0.22 <sup>c</sup>	2.08 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.43 ± 0.05 <sup>bc</sup>	1.84 ± 0.09 <sup>ab</sup>	1.6 ± 0.26 <sup>bc</sup>
Rutin derivatives	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Coumaric acid	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Coumaric acid derivatives	1.53 ± 0.04 <sup>a</sup>	nd	0.34 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.46 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.00 <sup>d</sup>	nd

<sup>1</sup> Data are means ± Standard Deviation (n = 3). Values within columns with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). nd not detected

was statistically significant ( $p < 0.05$ ) for breaker tomatoes exposed to UV-C radiation for 1 and 3 h.

This phenomenon is due to the lycopene synthesis in the chloroplast that occurs during the off-vine ripening process. Lycopene accumulation in the tomato pericarp consists of both light-independent and light-dependent components. The pathway may be stimulated by light, but light is not required for induction (Liu et al., 2009 and Raymundo, Chichester, & Simpson, 1976). Previous studies have found that, after the immature green stage, light is not essential for the induction of lycopene synthesis in tomatoes.

In our study, we used mature breaker tomatoes since lycopene synthesis was expected to have been induced (Liu et al., 2009). Lycopene synthesis appeared to be enhanced by post-harvest treatment with UV-C light. A positive effect was observed for the samples exposed to UV-C for short periods (less than 12 h). However, when UV-C was applied for 12 h, the synthesis of all-*E*-lycopene decreased. This result suggests that a hormetic treatment for this long might affect the enzymes responsible for the synthesis of lycopene, thereby delaying the formation of red color. In fact, UV induces the oxidation of amino acids, thereby reducing the functionality of proteins (Raymundo et al., 1976).

We also hypothesize that lycopene may be involved in protecting the chloroplast against photo-oxidation provoked by UV-C, which could lead to a degradation of lycopene and chlorophylls (Carrasco-Ríos, 2009). The changes in total lycopene are determined largely by the effect of UV-C light on all-*E*-lycopene because this isomer represents the highest percentage of the total content of this carotenoid. The content of *Z*-lycopene also increased in all samples during storage due to the synthesis of this pigment, with significant differences appearing in the Control 2 and UV-C treated samples when compared to the Control 1 and Control Initial samples. However, tomatoes ripening in darkness and tomatoes exposed to UV-C for 12 h showed the highest percentage of *Z*-lycopene, with a value around 18.5%.

Significant differences were found in the levels of the *cis*-isomer between samples stored for 8 d in a day/night cycle (Control 1) and in darkness (Control 2); this might reflect the bioaccumulation of pro-lycopene (7,9,7',9'-tetrakis-lycopene). Pro-lycopene is a precursor that is transformed to all-*E*-lycopene by the carotene isomerase or by photoisomerization and this process is hypothesized to occur in tomato leaves (Giuliano, Giliberto, & Rosati, 2002). Light has previously been postulated to aid in this process of transformation (Pirrello, Regad, Latché, Pech, & Bouzayen, 2009), which would explain the decrease in the concentration of this particular lycopene *cis*-isomer in tomato samples in the Control 1 group. Although UV-C treatment increased the total lycopene in breaker tomatoes during treatments lasting 1 and 3 h, the percentage of *cis*-isomers remained unchanged, with a mean value of 12%. The percentage of these isomers only increased in samples exposed for 12 h, which could be associated with UV-C-induced photoisomerization, since light exposure leads to the isomerization of all-*trans*-isomers (Godwin, 1985).

Significant differences were also found for  $\beta$ -carotene content in the control and UV-C exposed samples (Table 1).  $\beta$ -carotene increased in samples during storage, ranging between 0.75 and 1.40 mg/kg FW, with the highest value found in tomato samples belonging to the Control 1 group. This might be related to carotene synthesis and the conversion of lycopene to  $\beta$ -carotene by lycopene- $\beta$ -cyclase, a process known to be stimulated by light (Pizarro & Stange, 2009). For this reason, breaker tomatoes that were ripened in a day/night cycle (Control 1) showed the lowest total lycopene content (35.25 mg/kg FW) and the highest amount of  $\beta$ -carotene. In contrast, UV treatments provoked a decrease in  $\beta$ -carotene, probably due to an increase in lycopene biosynthesis caused by the activation of enzymes involved in its pathway (for example, the carotene isomerase) or the inhibition of the enzyme  $\beta$ -cyclase involved in the formation of  $\beta$ -carotene; this is a normal occurrence during the ripening process (Van den Berg et al., 2000). High light intensity could also provoke a photobleaching phenomenon and lead to the destruction of  $\beta$ -carotene (Young, 1993).

Our results are in agreement with those reported by Liu et al. (2009), who described an increase in the total lycopene of tomatoes after a hormetic treatment at 13.7 kJ/m<sup>2</sup> for 5 min. They observed an increase of 1.4 to 1.8-fold in the lycopene content of breaker tomatoes on the 15th and 21st days of storage at 12–14 °C, compared with a control sample stored in darkness. We observed the same behavior in breaker tomatoes, which reached a final lycopene content close to twofold higher after the treated tomatoes were stored for a period of 8 days at room temperature. These results show that UV-C treatment has a positive effect on lycopene synthesis in tomatoes stored at room temperature and under refrigeration. This indicates that UV-C light might be a specific regulator of carotenoid synthesis and accumulation under different conditions of post-harvest storage.

However, our results did not agree with those reported by Jagadeesh et al. (2009), who observed a decrease in the lycopene content of ripened tomatoes exposed to UV-C, stored in a cool chamber for 10, 20 and 30 d, and allowed to ripen under ambient room conditions (average temperature = 23 °C) for 7 and 14 d. In the present study, we provide new information related to the effect of UV-C light treatment on lycopene isomers. In general, the different effects of this kind of treatment reported in the scientific literature should be further investigated, since the hormetic response of the fruit is dependent on several factors, such as the cultivar, maturity stage, physiological stage, and harvest season (Charles & Arul, 2007). In addition, the characteristics of the equipment, the mode of delivery, the total dose of UV-C light, and the conditions of storage (time and temperature) during post-harvest also play important roles (Jagadeesh et al., 2009; Shama, 2007). Our results for  $\beta$ -carotene do not agree with those obtained by Liu et al. (2009), who did not observe significant changes in the content of this carotenoid in tomatoes after a post-harvest treatment with UV.

### 3.2. Effect of UV-C Radiation on Phenolic Compounds

The effects of UV-C hormesis on total and individual phenolic compounds of breaker tomatoes are shown in Table 1. If we compare the results of total phenolic compounds for all batches, a significant increase ( $p < 0.05$ ) in these bioactive compounds becomes apparent when samples are irradiated for periods longer than 3 h. The final content of phenolic compounds increased by 42% in breaker tomatoes exposed to UV-C light for 12 h. These results indicate that this treatment induces stress and the accumulation of phenolic compounds in the fruit due to the activation of the phenolic biosynthesis pathway. A similar increase in the amount of total phenolic compounds has been described for tomatoes exposed to UV-C and stored for 10, 20, and 30 d (Jagadeesh et al., 2009). Liu et al. (2012) also observed an increase in total phenolic compounds when tomatoes were irradiated with 4 and 8 kJ/m<sup>2</sup> of UV-C and stored longer than 14 d. This positive effect on the phenolic compound content has also been observed in tomatoes cultivated under covering material that transmits ambient solar UV-C radiation from 290 to 400 nm (Luthria, Mukhopadhyay, & Krizek, 2006).

The enhancing effect of UV on the total phenolic compounds of fruits and vegetables has been well studied over the last few years. Scientific evidence is now accumulating to show that the DNA-damaging effect of UV light induces the accumulation of UV-absorbing flavonoids and other phenolics compounds, predominantly in the epidermal tissues of fruit (Strack, 1997). This effect arises due to increased expression and activity of the enzyme phenylalanine ammonia-lyase, a key enzyme in the production of phenylpropanoids, which leads to an increase of phenols, phytoalexins, and lignins (Ryalls et al., 1996). Irradiation with UV-B light increased the content of flavonols in the pericarp of apples (Arakawa, 1988; Bakhshi & Arakawa, 2006) and doubled the content of resveratrol in red table grapes (Cantos et al., 2000). Irradiation with UV-C increased the total stilbene content (specifically trans-resveratrol) in red table grapes (Cantos et al., 2000; González-Barrio et al., 2009) and total phenols and flavonoids in mangos (González-Aguilar, Villegas-Ochoa, Martínez-Téllez, Gardea, & Ayala-Zavala, 2007).

Jagadeesh et al. (2009) and Liu et al. (2012) reported a UV-C-induced increase in the total phenolic content in tomatoes. The effect of UV-C on individual phenolic compounds has not been extensively studied in the scientific literature, but Liu et al. (2012) found an increase in some of these compounds (such as gallic acid, chlorogenic acid, and quercetin) after UV-C treatments and 35 days of storage. In the present research, the effect of UV-C hormesis on the compounds from tomatoes has been analyzed to ascertain the changes in the hydroxycinnamic acids and flavonoids (Table 1). In breaker tomatoes, chlorogenic acid makes up 75% of the total phenolic compounds (García-Valverde et al., 2011). This percentage decreases as the tomatoes ripen, due to the effect of the maturation process (Carrillo-Lopez & Yahia, 2009; García-Valverde et al., 2011). For this reason, the content of chlorogenic acid decreased in the mature control and UV-C treatment groups when compared to the initial control group. It is remarkable that tomatoes stored in darkness and those exposed to UV-C for 1 h showed half the concentration of chlorogenic acid that was found in the initial group of tomatoes. This effect of darkness can be explained because darkness is recognized as a storage condition that protects against the degradation of phenolic compounds during maturation. This is because light induces photo-oxidation via the generation of ROS (Foyer, Descourvieres, & Kunert, 1994), which leads to the degradation of phenolic compounds. The differences found in the chlorogenic content of UV-C exposed tomatoes could be attributed to the effect of UV stress on the enzymes of the phenylpropanoid pathway, as described above. Chlorogenic acid derivatives also decreased with maturation, but a significant increase from 0.66 mg/kg (day/night cycle) to 3.25 mg/kg was observed following application of UV-C for 1 h, whereas no changes in derivatives were observed in tomatoes stored in darkness, or in the UV-C 3 h and UV-C 12 h groups. No clear effect of UV-C radiation was observed for any other individual phenolic compounds.

The UV-C radiation had an enhancing effect on total phenolic compounds and on antioxidant capacity, but this effect was not evident in all of the individual phenolic compounds analyzed. Total phenolic compounds were measured using the Folin-Ciocalteu method, but this analytical procedure is known to overestimate the total phenolic compounds due to its low specificity and interference due to ascorbic acid-reducing sugars, sulfites, and amino acids (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, 1974). In the present study, the hydrolysis procedure applied to the tomato samples during extraction eliminates interfering compounds, thereby avoiding overestimation of total phenolic compounds. The methodology used to determine the individual phenolic compounds provides information about the main phenolic compounds and some derivatives, but quantification and identification of all phenolic compounds are lacking for the tomato samples. Therefore, the effect of UV-C radiation on the individual compounds cannot be clearly determined. In addition, phenolic compounds in plant tissues exposed to UV radiation can change their chemical form due to the over-expression of

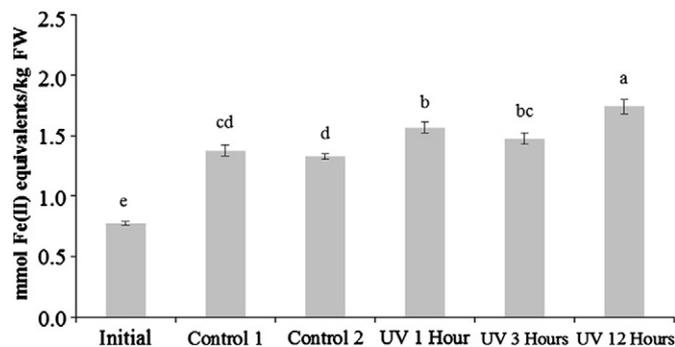


Fig. 2. FRAP assay in breaker tomatoes, expressed as mmol of Fe (II) equivalents per kilogram of FW. Data are means  $\pm$  Standard Deviation ( $n=3$ ).

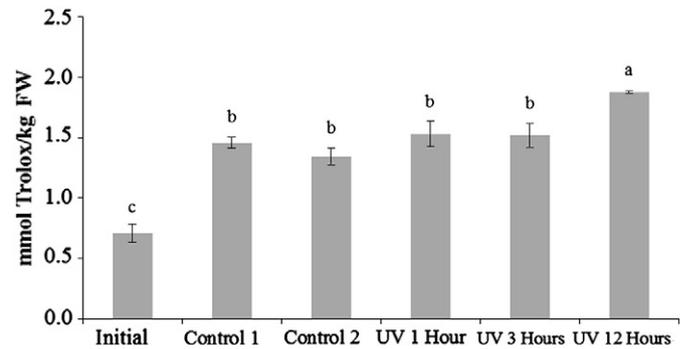


Fig. 3. TEAC hydrophilic assay in breaker tomatoes, expressed as mmol Trolox/kg FW. Data are means  $\pm$  Standard Deviation ( $n=3$ ).

the different enzymes involved in the metabolism of these secondary metabolites (Carrasco-Ríos 2009), thereby increasing the difficulty of analyzing individual phenolics.

### 3.3. Effect of UV-C Radiation on Antioxidant Activity

Data obtained for FRAP, hydrophilic TEAC, and lipophilic TEAC assays are shown in Figs. 2, 3 and 4, respectively. The hydrophilic antioxidant activity of the tomato samples showed the same behavior after exposure to UV-C light, reaching higher values after 12 h of treatment (1.74 and 1.88 mmol Trolox/kg for the FRAP and TEAC assays, respectively). A significantly positive correlation ( $r=0.877$ ,  $p<0.05$ ) was also found between FRAP and TEAC assays. These results indicate a positive effect of UV-C on hydrophilic antioxidant activity, as observed in previous studies of fresh-cut mangoes (González-Aguilar et al., 2007), blueberries (Perkins-Veazie, Collins, & Howard, 2008) or tomatoes (Liu et al., 2012). This effect is probably due to the increase in phenolic compounds and total flavonoids (Carrillo-Lopez & Yahia, 2009). A significant correlation was noted between the FRAP and TEAC assays and total phenolic compounds ( $r=0.729$  and  $0.826$ , respectively,  $p<0.05$ ).

The lipophilic antioxidant activity of breaker tomatoes showed higher values following 1 and 3 h UV-C treatments (0.43 and 0.48 mmol Trolox/kg, respectively). The correlation between lycopene content and lipophilic antioxidant activity was also significant ( $r=0.985$ ,  $p<0.05$ ). Therefore, the lipophilic antioxidant activity in tomatoes is primarily determined by the lycopene content. We also found high levels of lipophilic antioxidant activity in the initial stage (0.31 mmol Trolox/kg), which was probably due to a higher concentration of chlorophyll, a pigment recognized to have lipophilic antioxidant properties. Although chlorophylls are not viewed as dietary antioxidants, they might contribute to the *in vitro* antioxidant activity of vegetables, including tomatoes (Hunter & Fletcher, 2002; Periago et al., 2009).

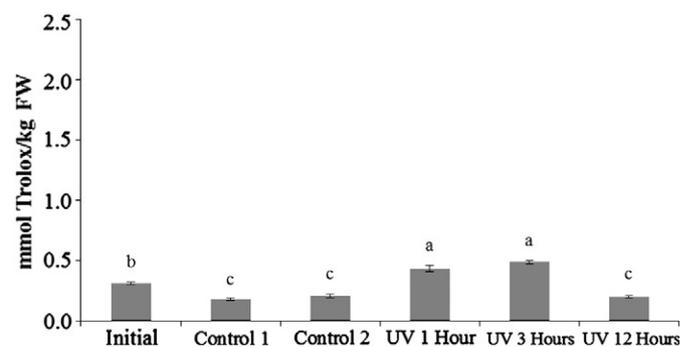


Fig. 4. TEAC lipophilic assay in breaker tomatoes, expressed as mmol Trolox/kg FW. Data are means  $\pm$  Standard Deviation ( $n=3$ ).

The UV-C treatments provoked an increase in TAA, where UV-C treatments lasting 1 and 3 h resulted in higher lipophilic antioxidant activity than UV-C treatments lasting 12 h. This difference could be related to the increase in total lycopene. The TAA of tomatoes treated with UV-C for 12 h was similar to that of tomatoes treated for the other times; however, the proportion of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity was different. In this case, an increase in phenolic compounds and a decrease in total lycopene might be responsible for the observed variations in hydrophilic and lipophilic antioxidant activity.

#### 4. Conclusions

Post-harvest UV-C treatment has a significant enhancing effect on the content of bioactive compounds (lycopene and total phenolic compounds) and on antioxidant activity in breaker tomatoes. However, the beneficial effect is dependent on the hormetic treatment conditions. Further studies must be carried out to establish the best conditions for UV-C hormesis in order to optimize this post-harvest technology in terms of increasing the antioxidant compound content and the potential beneficial effects for human health.

#### Acknowledgments

The authors thank the EU VI Frame Programme for financial support through the IP Lycocard 2006–016213. The results obtained in this paper reflect only the authors' views, and the community is not liable for any use that may be made of the information contained herein. The authors are also grateful to the Ministry of Education and Science of the Spanish Government for the project AGL-2006-26965-E and "Fundación Séneca" of the Murcia Regional Government for the fellowship awarded to S. Bravo. We would like to thank Tropicana Alvalle S.L. (PepsiCo Group) and Juver Alimentación S.L.U. (Conserve Italia) for providing financial support for this study.

#### References

- Arakawa, O. (1988). Photoregulation of anthocyanin synthesis in apple fruit under UV-B and light red. *Plant & Cell Physiology*, 29, 1385–1389.
- Arul, J., Mercier, J., Baka, M., & Maharaj, R. (1992). Photochemical therapy in the preservation of fresh fruits and vegetables: Disease resistance and delayed senescence. *Proc. Post-harvest 1992 – International Symposium. Physiological basis of post-harvest technologies*. Davis, CA: University of California.
- Bakshi, D., & Arakawa, O. (2006). Induction of phenolic compounds biosynthesis with light irradiation in the flesh of red and yellow apples. *Journal of Applied Horticulture*, 8(2), 101–104.
- Ben-Yeshoua, S. (2003). Effect of post-harvest heat and UV applications on decay, chilling injury and resistance against pathogens of citrus and other fruits and vegetable. *Acta Horticulturae*, 599, 159–173.
- Benzie, F. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15–23.
- Böhm, V. (2001). Use of column temperature to optimise carotenoid isomer separation by C30 high performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 24, 955–959.
- Cantos, E., García-Viguera, C., de Pascual-Teresa, S., & Tomás-Barberán, F. A. (2000). Effect of post-harvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4606–4612.
- Carrasco-Ríos (2009). Effect of ultraviolet-B radiation in plants. *Idesia (Arica)*, 27(3), 59–76.
- Carrillo-Lopez, A., & Yahia, E. M. (2009). Qualitative and quantitative changes in carotenoids and phenolic compounds in tomato fruit during ripening. *Proceedings of the 6th International Post-harvest Symposium, Antalya, Turkey, 8–12 April, 2009* (pp. 175).
- Charles, M. (1998). Physiological basis of UV-C induced disease resistance in post-harvest tomato fruits. Ph.D. Thesis, Laval University Quebec, Canada.
- Charles, M. T., & Arul, J. (2007). UV treatment of fresh fruits and vegetables for improved quality: A status report. *Stewart Post-harvest Review*, 3(6), 1–8.
- Charles, M. T., Corcuff, R., Roussel, D., & Arul, J. (2003). Effect of maturity and storage on Rishitin accumulation disease resistance to Botrytis cinerea in UV-C treated tomato fruit. *Acta Horticulturae*, 599, 573–576.
- Charles, M. T., Kalantari, R., Corcuff, R., & Arul, J. (2005). Post-harvest quality and sensory evaluation of UV-treated tomato fruit. *Acta Horticulturae*, 682, 537–542.
- Foyer, C. H., Descourvières, P., & Kunert, K. J. (1994). Protection against oxygen radicals: An important defense mechanism studied in transgenic plant. *Plant, Cell & Environment*, 17, 507–523.
- Fröhlich, K., Conrad, J., Schmid, A., Breithaupt, D. E., & Böhm, V. (2007). Isolation and structural elucidation of different geometrical isomers of lycopene. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 77(6), 369–375.
- García-Valverde, V., Navarro-González, I., García-Alonso, J., & Periago, M. J. (2011). Antioxidant bioactive compounds in selected industrial processing and fresh consumption tomato cultivars. *Food and Bioprocess Technology*, <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-011-0687-3>.
- González-Aguilar, G. A., Villegas-Ochoa, M. A., Martínez-Téllez, M. A., Gardea, A. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2007). Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *Journal of Food Science*, 72(3), 197–202.
- González-Barrio, R., Vidal-Guevara, M. L., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2009). Preparation of a resveratrol-enriched grape juice based on ultraviolet C-treated berries. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 374–382.
- Giuliano, G., Giliberto, L., & Rosati, C. (2002). Carotenoid isomerase: A tale of light and isomers. *Trends in Plant Science*, 7(10), 427–429.
- Godwin, T. W. (1985). *Chemistry and Biochemistry of PW Pigments* (Second Edition). London: Academic Press.
- Hunter, K. J., & Fletcher, J. M. (2002). The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 99–106.
- Jagadeesh, S. L., Charles, M. T., Garipey, Y., Goyette, B., Raghavan, G. S. V., & Vigneault, C. (2009). Influence of post-harvest UV-C hormesis on the bioactive components of tomato during post-treatment handling. *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), 1463–1472.
- Liu, C., Cai, L., Lu, X., Han, X., & Ying, T. (2012). Effect of postharvest UV-C irradiation on phenolic compound content and antioxidant activity of tomato fruit during storage. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(1), 159–165.
- Liu, J., Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J. Y., Wilson, C. L., Adeyeye, O., et al. (1993). Application of ultraviolet-C light on storage rots and ripening of tomatoes. *Journal of Food Protection*, 56, 868–872.
- Liu, L. H., Zabarás, D., Bennett, L. E., Aguas, P., & Woonton, B. W. (2009). Effects of UV-C, light red and sun light on the carotenoid content and physical qualities of tomatoes during post-harvest storage. *Food Chemistry*, 115, 495–500.
- Luthria, D. L., Mukhopadhyay, S., & Krizek, D. T. (2006). Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 771–777.
- Maharaj, R., Arul, J., & Nadeau, P. (1999). Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Capello) by delaying senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 13–23.
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., & Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384, 240–242.
- Periago, M. J., García-Alonso, J., Jacob, K., Olivares, A. B., Bernal, M. J., Iniesta, M. D., et al. (2009). Bioactive compounds, folates and antioxidant properties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) during vine ripening. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(8), 694–708.
- Perkins-Veazie, P., Collins, J. K., & Howard, L. (2008). Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 280–285.
- Pirrello, J., Regad, F., Latché, A., Pech, J. C., & Bouzayen, M. (2009). Regulation of tomato fruit ripening. In perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources. *CAB Reviews*, 4, 1–14.
- Pizarro, L., & Stange, C. (2009). Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e investigación agraria*, 36(2), 143–162.
- Raymundo, L. C., Chichester, C. O., & Simpson, K. L. (1976). Light-dependent carotenoid synthesis in the tomato fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(1), 59–64.
- Ryalls, J., Neuenschwander, U., Willits, M., Molina, A., Steiner, H. Y., & Hunt, M. (1996). Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 8, 1809–1819.
- Seybold, C., Fröhlich, K., Bitsch, R., Otto, K., & Böhm, V. (2004). Changes in contents of carotenoids and vitamin E during tomato processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7005–7010.
- Shama, G. (2007). Process challenges in applying low doses of ultraviolet light to fresh produce for eliciting beneficial hormetic responses. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 1–8.
- Shi, J., Qu, Q., Yakuda, Y., Xue, S. J., Jiang, Y., Koide, S., et al. (2007). Investigation of the antioxidant and synergistic activity of lycopene and other natural antioxidants using LAME and AMVN model systems. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 603–608.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1974). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phophomolybdc-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J. Y., Wilson, C. L., Pusey, P. L., Igwegbe, E. C. K., et al. (1997). Integration of Ultraviolet (UV-C) Light with Yeast Treatment for Control of Post-harvest Storage Rots of Fruits and Vegetable. *Biological Control*, 10(2), 98–103.
- Stevens, C., Liu, J., Khan, V. A., Lu, J. Y., Kabwe, M. K., Wilson, C. L., et al. (2004). The effect of low-dose ultraviolet light-C treatment on polygalacturonase activity, delay ripening and Rhizopus soft rot development of tomatoes. *Crop Protection*, 23, 551–554.
- Stevens, C., Liu, J., Khan, V. A., Lu, J. Y., Wilson, C. L., Igwegbe, E. C. K., et al. (1998). Application of hormetic UV-C for delayed ripening and reduction of Rhizopus soft rot in tomatoes:

- The effect of tomatine on storage rot development. *Journal of Phytopathology*, 146, 211–221.
- Strack, D. (1997). Phenolic metabolism. In P. M. Dey, & J. B. Harborne (Eds.), *Plant biochemistry*. London: Academic Press.
- Van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H. F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., et al. (2000). Review. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 880–912.
- Young, A. J. (1993). In A. Young, & G. Britton (Eds.), *Carotenoids in Photosynthesis* (pp. 16–72). London: Chapman and Hall.