



Departamento de Química Analítica,  
Nutrición y Bromatología

# CONCENTRACIÓN Y BIOACCESIBILIDAD DE CAROTENOIDES Y COMPUESTOS FENÓLICOS EN PAPAS COCIDAS

TESIS DOCTORAL

Gabriela Del Pilar Burgos Zapata

La Laguna, 2013

Don Juan Ayala, Profesor Titular y Secretario del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de La Laguna.

CERTIFICA:

Que la presentación de la tesis titulada “CONCENTRACIÓN Y BIOACCESIBILIDAD DE CAROTENOIDES Y COMPUESTOS FENÓLICOS EN PAPAS COCIDAS” que presenta la licenciada en Biología Dña. Gabriela Del Pilar Burgos Zapata, para optar al grado de Doctor por esta Universidad, ha sido realizada bajo la dirección de Dr. Don Carlos Díaz Romero.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expido la presente certificación en La Laguna, diciembre del 2013.

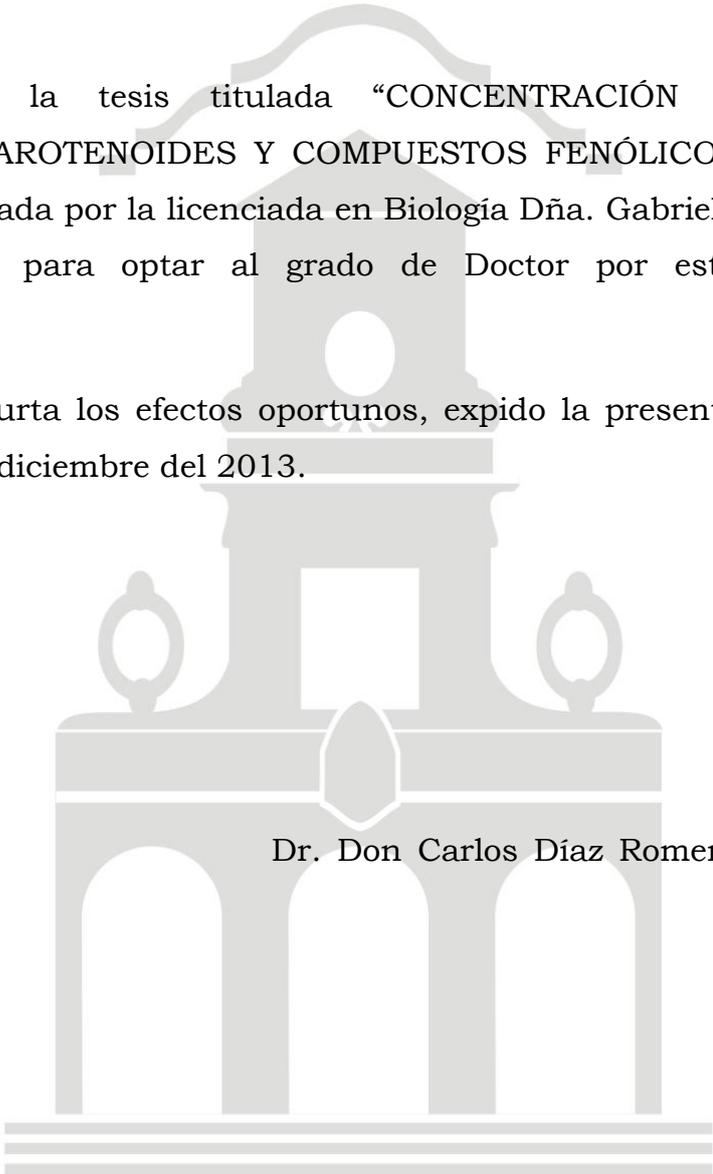
Dr. Don Juan Ayala

Don Carlos Díaz Romero, Catedrático del área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de La Laguna.

AUTORIZA:

La presentación de la tesis titulada “CONCENTRACIÓN Y BIOACCESIBILIDAD DE CAROTENOIDES Y COMPUESTOS FENÓLICOS EN PAPAS COCIDAS” realizada por la licenciada en Biología Dña. Gabriela Del Pilar Burgos Zapata, para optar al grado de Doctor por esta Universidad.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expido la presente certificación en La Laguna, diciembre del 2013.



Dr. Don Carlos Díaz Romero

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi país, mi querido Perú, por permitirme estudiar una de sus riquezas y a España, a través de la Universidad de la Laguna, por acogerme y permitirme crecer profesionalmente.

A los proyectos “HarvetPlus Potato” y “Nutritional Quality Assurance and Enhancement Network” del Centro Internacional de la Papa (CIP) por financiar este trabajo de tesis.

A la Dra. Merideth Bonierbale, líder de Programa Global de Mejoramiento Genético y de Cultivos del CIP, por haber depositado su confianza en mí y ser una constante motivación en mi vida profesional.

Al Dr. Carlos Díaz Romero, director de la tesis, por su guía, dedicación, paciencia, y por la confianza depositada en mi persona.

A la Dra. Elena Rodriguez Rodriguez y a la Dra. Beatriz Rodriguez Galdon por el apoyo que me brindaron durante mis estadías en Santa Cruz de Tenerife. Gracias por estar allí siempre dispuestas a ayudar. Gracias por su amistad.

A cada uno de los miembros del Laboratorio de Calidad y Nutrición del CIP, en especial a Lupita Muñoa, Paola Sosa, Edith Cayhualla, Cinthia Sanchez y Eduardo Porras, por su apoyo con los análisis y sobre todo por su ayuda en los momentos de estrés. Gracias por su amistad.

A mi esposo por su amor incondicional y por haberme ayudado en todo sentido para que pueda concretar este logro.

A mis padres, por su esfuerzo, por enseñarme lo que no se aprende en las aulas, por inculcarme valores y enseñarme a respetar al prójimo sin diferencias. Por todo el amor que me brindan y por estar allí para mí siempre. Son un ejemplo de vida, los amo.

A mi hermanito Nocho y su esposa, a mi prima Sonia y a mi primo Gustavo que me han dado los sobrinos más lindos del mundo: Fátima, Noelia, Renzo, Anthonella y Valery de quienes recibo muchas alegrías.

A todos aquellos que de una u otra manera me apoyaron en la realización de este trabajo.

*A Dios verdadera fuente de  
amor y sabiduría*

*A mis padres,  
por su esfuerzo y amor*

*A mí amado Thomas  
por estar siempre a mi lado*

## **Reglamento de Tesis Doctorales de La Universidad de La Laguna**

La presentación de esta tesis se acoge a lo dispuesto en el Reglamento de Tesis Doctorales de La Universidad de La Laguna, aprobada en Consejo de Gobierno de 27 de mayo de 2005, en la que en el artículo 4 “Modalidad de tesis por compendio de publicaciones”, se definen el contenido de las memorias de tesis:

A. Debe incluir, en español, una introducción general en la que se presenten los trabajos y se justifique la unidad temática. Así como, un resumen global de los objetivos de la investigación, de la metodología aplicada, de los resultados obtenidos, de la discusión de estos resultados y de las conclusiones finales.

B. Entre la introducción y el resumen mencionados o bien como anexo, debe figurar una copia completa de los trabajos donde consten necesariamente los datos personales de todos los autores, así como la referencia completa de la revista en la que los trabajos han sido publicados o, en su caso, la carta de aceptación.

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. UNIDAD TEMÁTICA DE LOS TRABAJOS .....	17
Efecto de la cocción en la concentración de carotenoides de papas nativas Andinas .....	19
Efecto de la cocción en la concentración de fenoles totales, antocianinas totales y ácidos fenólicos y actividad antioxidante en papas de pulpa morada .....	21
Bioaccesibilidad In vitro de luteína y zeaxantina en papas cocidas de pulpa amarilla.....	23
Concentración y bioaccesibilidad del ácido clorogénico y antocianinas de papas moradas y rojas cocidas.....	25
III. OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN .....	27
IV. EXPERIMENTAL	
IV.1 MATERIAL VEGETAL	
IV.1.1 Para evaluar efecto de la cocción sobre la concentración de carotenoides en papa de pulpa amarilla.....	28
IV.1.2 Efecto de la cocción sobre la concentración de compuestos fenólicos en papas de pulpa morada.....	29
IV.1.3 Caracterización de la concentración y bioaccesibilidad de carotenoides en papas cocidas de pulpa amarilla.....	30
V.1.4. Caracterización de la concentración y bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en papas de pulpa morada y rojiza.....	31

IV.2 MÉTODOS ANALÍTICOS	
IV.2.1 Métodos espectrofotométricos	
Compuestos fenólicos totales.....	37
Antocianinas totales.....	39
Actividad antioxidante.....	41
IV.2.2 Métodos cromatográficos	
Carotenoides individuales .....	43
Ácidos fenólicos .....	45
Antocianinas individuales .....	48
IV.2.3 Método para la digestión in vitro para evaluar la bioaccesibilidad de carotenoides y compuestos fenólicos.....	49
IV.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	52
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	54
V.1 EFECTO DE LA COCCIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES DE PAPAS NATIVAS ANDINAS	
V.1.1 Efecto de la cocción por hervido en la concentración total e individual de carotenoides .....	55
V.1.2 Concentración de luteína y zeaxantina expresada en peso fresco en papas cocidas.....	62
V.2 EFECTO DE LA COCCIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES, ANTOCIANINAS TOTALES Y ÁCIDOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PAPAS DE PULPA MORADA	
V.2.1 Optimización de las condiciones de extracción de FT, AT y AA en muestras coloreadas. ....	66
V.2.2 Efecto de la cocción por hervido sobre la concentración de FT, AT y AF en papas de pulpa morada .....	71
V.2.3 Efecto de la cocción en la AA de papas moradas .....	76

V.2.4 Niveles de AT y AA en papas moradas cocidas, expresadas en base al peso fresco (PF).....	78
V.3 BIOACCESIBILIDAD IN VITRO DE LUTEÍNA Y ZEAXANTINA EN PAPAS COCIDAS DE PULPA AMARILLA.....	80
V.4 CONCENTRACIÓN Y BIOACCESIBILIDAD DEL ACIDO CLOROGÉNICO Y ANTOCIANINAS DE PAPAS MORADAS Y ROJAS COCIDAS.	
V.4.1 Concentración de AC en papas cocidas de pulpa morada y roja.....	87
V.4.2 Concentración y perfil de antocianinas en papas cocidas de pulpa morada y roja .....	89
V.4.3 Actividad antioxidante en papas cocidas de pulpa morada y roja .....	93
V.4.4 Bioaccesibilidad del ácido clorogénico y antocianinas totales en papas cocidas de pulpa morada y rosada.....	94
VI. CONCLUSIONES .....	98
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	101
VIII. ANEXOS .....	124
VIII.1 Efecto de la cocción en la concentración de carotenoides de papas nativas Andinas	
VIII.2 Efecto de la cocción en la concentración de fenoles totales, antocianinas totales y ácidos fenólicos y actividad antioxidante en papas de pulpa morada	
VIII.3 Bioaccesibilidad In vitro de luteína y zeaxantina en papas cocidas de pulpa amarilla	
VIII.4 Contribuciones a congresos	

## **I. INTRODUCCIÓN**

La papa, planta alimentaria que procede de las culturas Pre-Incas e Incas, es superior al resto de cultivos en la producción de proteína por unidad de tiempo y superficie, así como en la producción de energía (Estrada, 2000).

A nivel mundial ocupa el quinto lugar en cuanto a consumo humano y el sexto lugar en lo que se refiere a producción (FAOSTAT, 2012). A nivel del Perú, es el principal cultivo del país en superficie sembrada y es producido por 600 mil pequeñas unidades agrarias, siendo la base de la alimentación de la zona andina.

En el mundo se cultivan 5000 variedades de papa, de las cuales en el Perú se encuentran alrededor de 3000.

El 80% del área papera del Perú es cultivada con cultivares andinos restringidas a las zonas agro-ecológicas más altas sobre los 3000 m. s. n. m. (metros sobre el nivel del mar). Las cultivares andinos, son de muy buen rendimiento en su zona de adaptación y de una alta calidad culinaria y comercial. En el Perú existe una inmensa cantidad de variedades nativas que sería difícil de cuantificar, dado que una variedad puede recibir nombres diferentes en lugares diferentes.

### **I.1. Composición nutricional de la papa**

La composición de los tubérculos de papa es variable, de acuerdo a la variedad y factores de producción tales como el clima, suelo, disponibilidad de agua y prácticas agronómicas. La madurez del tubérculo, la cocción y las condiciones de almacenamiento también afectan la composición química de los tubérculos y consecuentemente su valor nutricional (Camire et al., 2009).

El principal grupo de macronutrientes de los tubérculos de la papa son los carbohidratos, siendo el almidón el carbohidrato predominante (Jansen et al., 2001). Cuando la papa es cocida, los gránulos de almidón se gelatinizan y se vuelven rápidamente digestibles, y el enfriamiento de las reservas de este proceso de gelatinización, resulta en casi 13% de almidón resistente, el cual es un componente deseable en la dieta humana, debido a su relevancia en la salud a través de la prevención y control de algunos desórdenes digestivos y metabólicos (Englyst et al., 1992).

Los tubérculos de papa también contienen azúcares, siendo la sacarosa el disacárido mayoritario y la glucosa y fructosa los principales monosacáridos. La presencia de cantidades excesivas de azúcares reductores en los tubérculos de papa resulta en productos fritos con un inaceptable color oscuro y sabor amargo, y puede generar la formación de acrilamida (sustancia con potencial carcinógeno). El contenido de azúcares reductores recomendado para evitar el oscurecimiento de los productos fritos y la formación de acrilamida debe ser menor o igual a 0,1% (Kumar et al., 2004).

La papa contiene una baja concentración de proteína (6,25 – 15%, en base a peso seco o 1,56 – 3,75 en base a peso fresco), que es comparable con otras raíces y tubérculos (Friedman, 1996). El valor biológico de la proteína de papa es inferior a la proteína en carne y proteínas de origen animal en general, pero mayor que la del trigo, avena y otros vegetales. Una característica importante de la proteína de papa es que contiene niveles significativos de lisina, aunque es deficiente en metionina. Por esta razón complementar papa con cereales que son bajos en lisina y altos en metionina provee una proteína de alta calidad a la dieta.

El contenido de grasa en los tubérculos de papa es muy bajo (menos del 1%).

El potasio es el mineral más abundante en la papa con una concentración que varía de 600 a 800 mg/100g referido a peso fresco (PF) (Bethke y Jansky et al., 2008). El potasio es requerido en cantidades relativamente altas y juega un papel importante en el funcionamiento del sistema nervioso. Cien gramos de papas puede contribuir con más del 10% de la ración diaria recomendada (RDA) de potasio en adultos (el total de RDA es de 4000 – 4700 mg por día). Los niveles altos de potasio pueden ayudar a controlar la presión sanguínea y puede disminuir el riesgo de sufrir un evento cardiovascular.

El fósforo y magnesio también están presentes en cantidades considerables en la papa. Las concentraciones de los mismos oscilan entre 42 y 120 mg/100g y 16 y 40 mg/100g PF, respectivamente (Bonierbale et al., 2010). Cien gramos de las papas con alto contenido de fósforo y magnesio puede contribuir con 10 – 17% y 10 -13% de la RDA para fósforo (700 – 1250 mg/d) y magnesio (320 – 420 mg/d), respectivamente. El calcio está presente en cantidades pequeñas (2 – 20 mg/100g). Aunque la contribución de calcio proveniente de papa a la RDA (Recommended Dietary Allowances) (1000 – 1300 mg/d) es menor al 1%, la concentración de calcio es de especial importancia ya que este puede mitigar la respuesta de las plantas de papa frente al calor, frío y salinidad.

Las concentraciones de hierro y zinc varían entre 9 y 37 mg Fe/kg, y entre 8 y 20 mg Zn/kg referido a peso seco (PS), respectivamente (Burgos et al, 2007). Estos niveles son menores que los niveles encontrados en los cereales y las legumbres, sin embargo la contribución de Fe de la papa a la dieta va a depender de la biodisponibilidad del mismo y de la cantidad de papa que es consumida. La biodisponibilidad del hierro de la papa puede ser mayor que en los cereales y legumbres debido a la presencia del ácido ascórbico (promotor de la absorción del hierro) y bajos niveles de ácido fítico (inhibidor de la absorción del hierro). Asimismo, cuando el consumo de papa es alto, ésta es una fuente importante de hierro en la dieta. Por ejemplo, en el departamento peruano de Huancavelica, donde

las madres y niños consumen de 200 a 800 g de papa por día, se estima que el cultivar con el contenido mayor de hierro (CIP 703274 con 8,6 mg/kg PF) proveerá de 29 y 24% de RNI (Recommended Nutrient Intake) de Fe en niños con edades de 1 a 3 (6 mg/d) y mujeres en edad fértil (29 mg/d).

Las papas también contienen antioxidantes como la vitamina C, los carotenoides y los compuestos fenólicos, los cuales contribuyen de forma significativa a la actividad antioxidante total “*in vitro*” del tubérculo.

Las papas frescas tienen concentraciones variables de vitamina C, las cuales pueden alcanzar 50 mg/100g PF cuando son cosechadas recientemente. La cocción y el almacenamiento reducen la concentración de vitamina C en tubérculos, presentando porcentajes de retención que varían entre el 50 - 90% y 22 - 62%, respectivamente dependiendo de la variedad. Además, existen diferencias en la reducción de la concentración de vitamina C dependiendo de la formas de cocción (Burgos et al., 2009). Cien gramos de papas cocidas de la variedad con los niveles más altos de vitamina C (704393, entre 8,1 y 20,6 mg/100g, PF) puede aportar cerca del 25% del RDA para vitamina C (75 - 120 mg/d).

Debido a que los carotenoides y compuestos fenólicos son el tema principal de esta tesis, seguidamente se dedican secciones separadas a estos dos grupos de componentes.

## I.2. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos naturales ampliamente distribuidos, responsables del color amarillo, naranja y rojo de las frutas, raíces, flores, pescados, invertebrados y pájaros.

La estructura básica de los carotenoides es un tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico y lineal formado a partir de ocho unidades

isoprenoides de 5 carbonos unidas de manera tal que el orden se invierte al centro. Este esqueleto básico puede modificarse de varias formas como por ejemplo por hidrogenación, dehidrogenación, ciclación, migración del doble enlace, acortamiento o extensión de la cadena, reordenamiento, isomerización, introducción de funciones oxigenadas o por combinaciones de estos procesos, dando como resultado una gran diversidad de estructuras. Los carotenoides hidrocarbonados se denominan colectivamente como carotenos (Figura 1) mientras que aquellos que contienen oxígeno se denominan xantofilas (Figura 2) siendo las funciones oxigenadas más comunes los grupos hidroxilo (OH) y epoxi (epóxidos 5,6- ó 5,8-) (Rodríguez-Amaya, 2001).

Los carotenoides poseen un gran rango de funciones, especialmente relacionados a la salud humana y por su papel como antioxidante biológico (Fraser y Bramley, 2004; Krinsky y Johnson, 2005). Además del conocido papel del  $\beta$ -caroteno como provitamina A, y de la luteína y zeaxantina en la prevención de cataratas y de la degeneración macular relacionada a la edad (Landrum y Bone, 2001; Seddon, et al, 1994); algunos estudios ponen de manifiesto que la actividad antioxidante de los carotenoides es un factor clave en la disminución de la incidencia de muchas enfermedades degenerativas incluyendo las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Belanger y Johns, 2008; Kospel y Kospel, 2006).

La propiedad antioxidante de los carotenoides se da través de la desactivación de los radicales libres (átomos o grupos de átomos que poseen un electrón no compartido) y la captura del oxígeno singlete (Palozza y Krinsky 1992). La capacidad de los carotenoides para capturar el oxígeno singlete se relaciona con el sistema de enlace doble conjugado y los que tienen nueve o más enlaces dobles otorgan la máxima protección.

La cadena poliénica es también la causa de la inestabilidad de los carotenoides incluyendo su susceptibilidad a la oxidación e isomerización geométrica. El calor, la luz y los ácidos promueven la isomerización de los

carotenoides trans a la forma cis. La oxidación, la causa principal de las pérdidas de carotenoides, depende del oxígeno disponible, los carotenoides involucrados y su condición física (Rodríguez-Amaya, 1997).

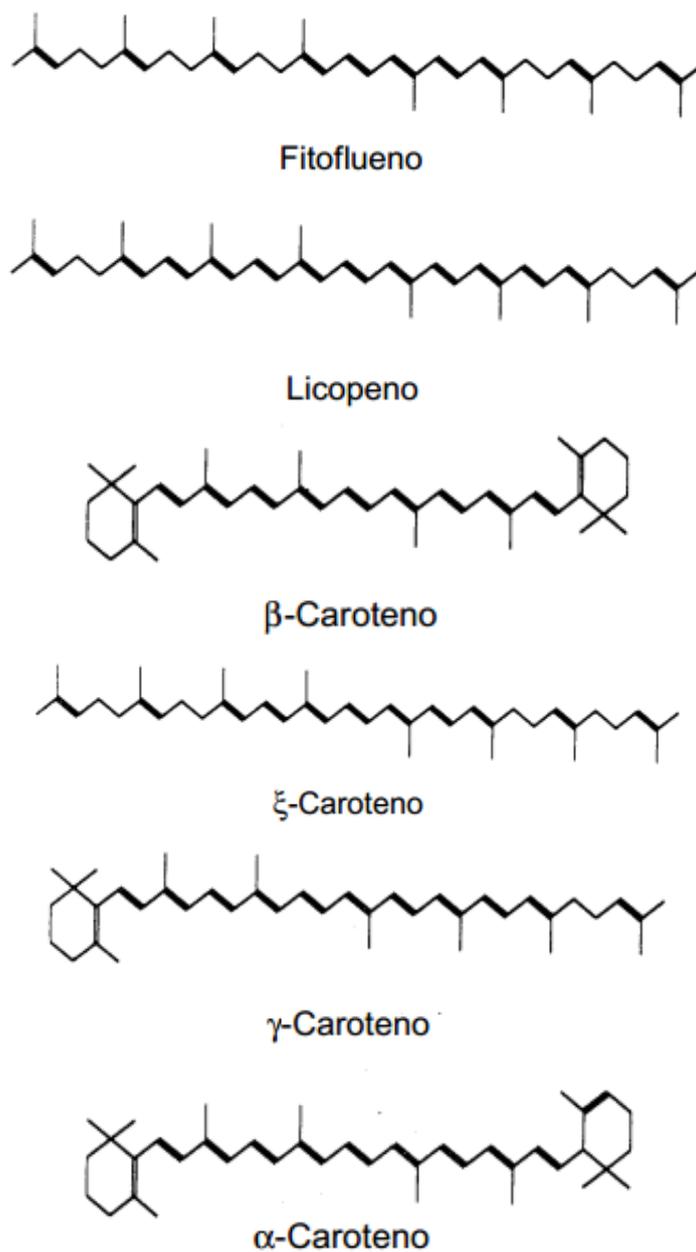


Figura I.1. Estructura de los carotenos comunes en los alimentos

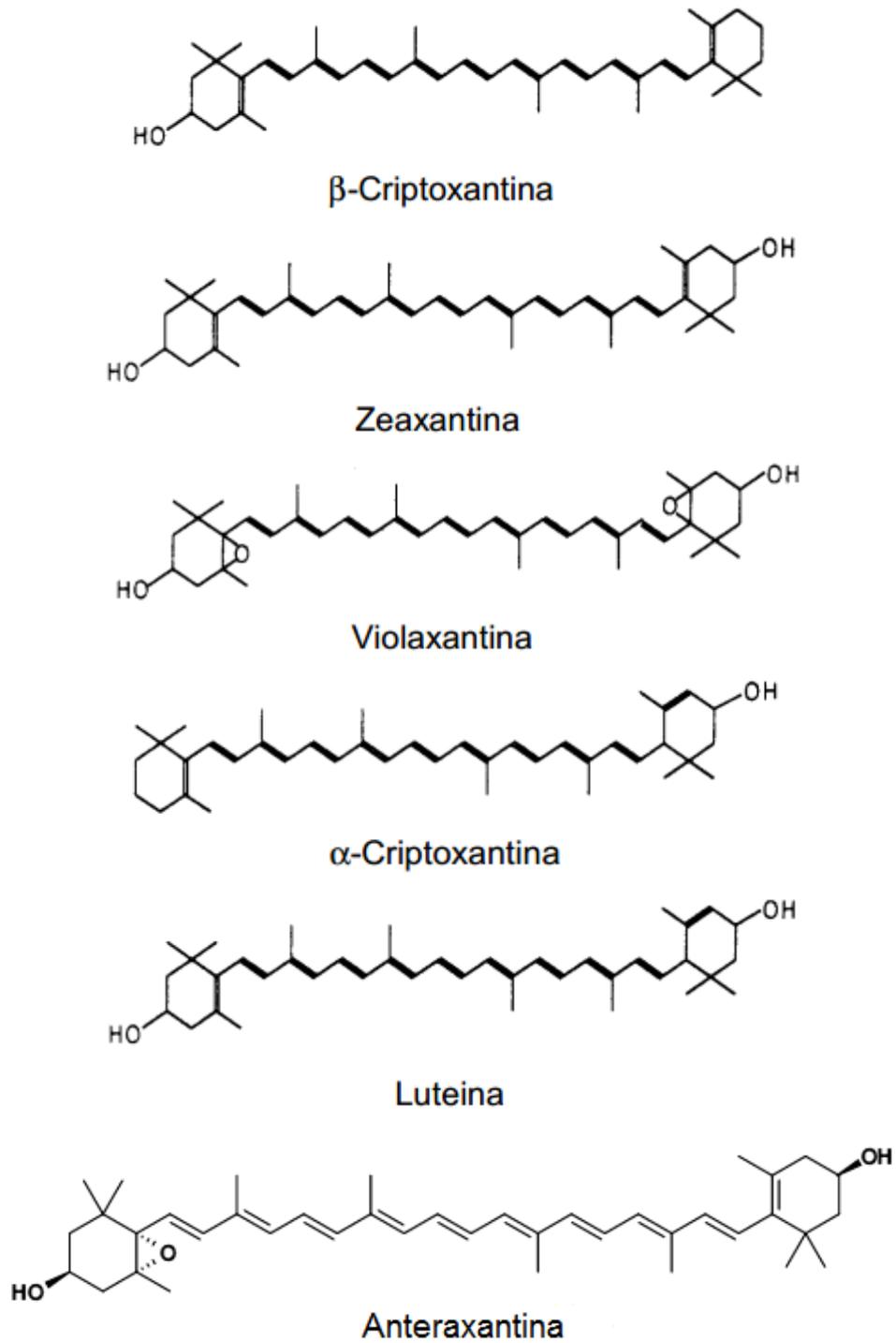


Figura I.2. Estructura de las xantofilas más comunes en alimentos

### I.2.1. Carotenoides en papa

Varios estudios han caracterizado la concentración de carotenoides en tubérculos de papa crudos, mostrando que la violaxantina y luteína o luteína 5-6 epóxido y luteína son los carotenoides predominantes, mientras que la zeaxantina se encuentra en niveles muy bajos (Iwansik et al., 1983; Lu et al., 2001).

Un estudio más reciente ha reportado que los carotenoides predominantes en papas de pulpa color amarillo oscuro fueron zeaxantina y anteraxantina; en papas de pulpa color amarillo intermedio fueron la violaxantina, anteraxantina, luteína y zeaxantina; y en las papas de pulpa color crema los carotenoides mayoritarios fueron violaxantina, luteína y  $\beta$ -caroteno (Burgos et al., 2009).

Este mismo estudio ha indicado que la concentración de luteína en las papas de pulpa amarilla alcanza los 211  $\mu\text{g}/100\text{g}$  PF valores que son mayores que los encontrados en variedades alemanas con pulpa amarilla (17-49  $\mu\text{g}$  100g PF) (Breithaupt y Bamedi, 2002). Asimismo, se ha encontrado que las papas de color amarillo oscuro tienen concentraciones de zeaxantina mayores a 600  $\mu\text{g}/100\text{g}$  PF, lo cual es interesante debido a que la zeaxantina se encuentra en niveles relativamente elevados en muy pocos componentes de la dieta, incluyendo a cultivares de maíz y variedades de pimiento naranja amarillento (Kurilich y Juvick, 1999; Minguez-Mosquera y Hornero-Mendez, 1994).

También se ha observado que la concentración de carotenoides totales se correlaciona positiva y significativamente con las concentraciones de anteraxantina y zeaxantina ( $r=0,91$  y  $0,88$ , respectivamente,  $P<0,001$ ) y negativa y significativamente con la concentración de  $\beta$ -caroteno ( $r=-0,77$ ,  $P<0,001$ ), lo cual indica que es posible predecir que los cultivares con concentraciones altas de carotenoide totales son aquellas con mayor concentración de zeaxantina y

los cultivares con los niveles más bajos de carotenoides totales tienen presencia de  $\beta$ -caroteno.

El almacenamiento post-cosecha reduce significativamente la concentración de carotenoides, los cuales también disminuyen a temperaturas bajas (Griffiths et al., 2007). Sin embargo no existen estudios que evalúen el efecto de la cocción en la concentración de carotenoides en los tubérculos de papa.

### I.3. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas y están generalmente involucradas en la defensa contra la radiación ultravioleta o agresión causada por patógenos (Manach et al., 2003). Estos componentes pueden ser clasificados en diferentes grupos (ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos) de acuerdo a la función del número de anillos fenol que contienen y de los elementos estructurales que unen estos anillos (Figura 3).

Los ácidos fenólicos están constituidos por un anillo fenólico y una función orgánica de ácido carboxílico. Están divididos en 2 grupos: los derivados del ácido cinámico y los derivados del ácido benzoico, siendo los primeros los más abundantes, incluyendo al ácido clorogénico, cafeico, ferúlico y sinápico (Clifford et al, 1999).

Entre los flavonoides se encuentran las antocianinas que son los pigmentos naturales responsables del color rojo-azulado de muchas frutas y verduras, cuyo interés se ha intensificado recientemente debido a sus potenciales propiedades farmacológicas y terapéuticas (McGhie and Walton et al., 2007).

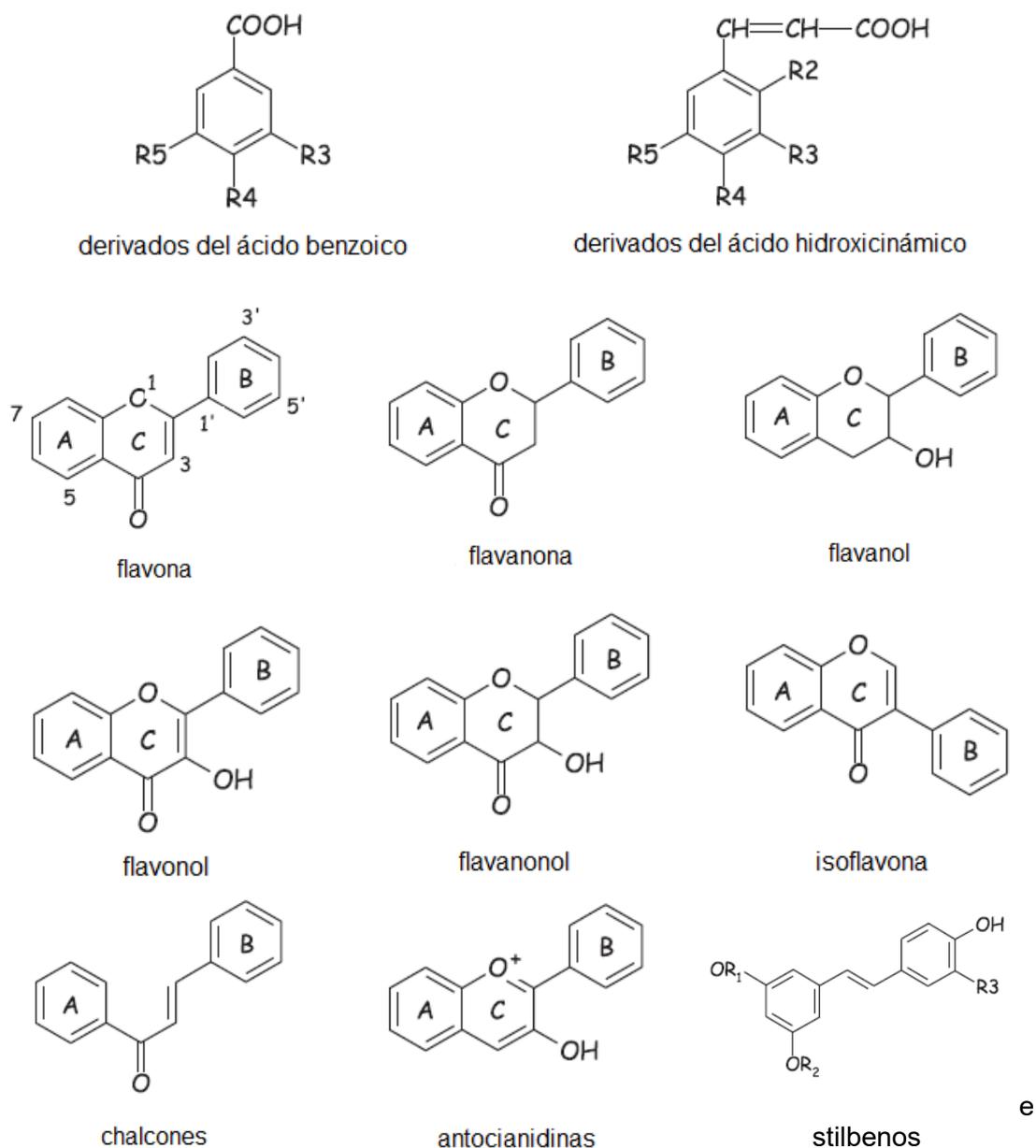


Figura I.3. Estructura de los ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos y benzoicos), flavonoides y estilbenos.

Las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, también llamado 2-fenil-benzopirilio que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio y un anillo fenólico; el flavilio normalmente funciona como un catión. Las antocianinas tienen una estructura variable que depende de

las diferencias en el número de grupos hidroxilo en la molécula, el grado de metilación de los grupos hidróxidos, la naturaleza y número de los azúcares unidos a la aglicona y la posición en que se realiza la unión, así como también la naturaleza y el número de ácidos alifáticos y aromáticos que están unidos a los azúcares (Mazza Miniati et al., 2003; Yang et al., 2011).

La estabilidad de las antocianinas es afectada por la presencia de oxígeno, la temperatura, la luz, las enzimas y el pH, siendo este último el que produce el efecto mayor (Castaneda-Ovando et al., 2009). En disoluciones acuosas a valores de pH inferiores a 2, básicamente la totalidad del pigmento se encuentra en su forma más estable de ion oxonio o catión flavilio de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal y la forma chalcona, o de cadena abierta. Tanto el hemicetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7 se presentan las formas quinoidales de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire. Las antocianinas pueden afectar las características organolépticas de los alimentos, lo que puede influenciar a su comportamiento tecnológico durante el procesamiento de alimentos (Pascual-Teresa y Sanchez-Ballesta, 2008).

Las propiedades farmacológicas, médicas y bioquímicas de los fenólicos han sido extensamente revisadas. Se ha reportado que poseen efecto antioxidante, vasodilatador, anticarcinogénico, antiviral, antiinflamatorio, inmunoestimulante, antialérgico y propiedades vasodilatadoras (Duthie et al., 2000; Mattila y Hellstrom, 2006; Sies, 2010); siendo su actividad antioxidante frente a los radicales libres la propiedad mejor descrita de los fenólicos. Estos compuestos son capaces de capturar radicales libres mediante la liberación de átomos fenólicos de hidrógeno.

### I.3.1. Compuestos fenólicos en papa

El principal ácido fenólico en las papas es el ácido clorogénico (AC), el cual se encuentra en 3 formas, siendo el ácido 5-O-cafeoilquinico el principal ácido clorogénico en papas con o sin pigmentos (Andre et al., 2007). El AC tiene un papel protector frente a la oxidación *in vitro* del LDL humano, un paso importante en la formación de placas ateromatosas, además de efectos anticarcinogénicos en modelos animales.

Las papas pigmentadas deben su color a la presencia de antocianinas. Las papas de pulpa roja contienen glucósidos acilados de pelargonidina, mientras que las papas moradas tienen además, glucósidos acilados de malvidina, petunidina, peonidina y delphinina (Brown, 2005).

La concentración de fenólicos totales varía de 304 a 724 mg/100 g PS) y la de antocianinas totales de 44 a 696 mg/100 g PS (Reyes et al. 2005). La concentración de ácido clorogénico en tubérculos crudos de papas nativas oscila entre 17 y 1274 mg/100 g PS (Andre et al., 2007).

La concentración de compuestos fenólicos totales (FT) y de antocianinas totales (AT) están estrechamente asociados con una fuerte actividad antioxidante (AA) (Reyes et al., 2005). La AA describe la habilidad redox de las moléculas en alimentos y sistemas biológicos para eliminar los radicales libres, considerando los efectos aditivos y sinérgicos de todos los antioxidantes más que el efecto de los compuestos individuales, y pueden ser, por tanto, útiles al estudiar los beneficios potenciales de los antioxidantes en las enfermedades mediadas por estrés oxidativo (Puchau et al., 2010). La AA de las papas crudas de pulpa morada y roja es considerada relativamente alta (513-1426 µg Equiv. Trolox/g PF), comparada por ejemplo con la AA de los arándanos (sobre los 5500 µg Equiv. Trolox/g PF, Cevallos-Casals y Cisneros Zevallos, 2003).

Si bien existen diferentes estudios sobre la composición de compuestos fenólicos en papa, la mayoría estos estudios se han sido

realizado usando tubérculos crudos y la información en tubérculos cocidos es escasa. Un estudio reciente reporta que la cocción disminuye la concentración de ácido clorogénico en los tubérculos de papa siendo el tratamiento por microondas el que produce la mayor pérdida (Lachman et al., 2013). El mismo estudio señala que la concentración de antocianinas totales es mayor después de la cocción. Sin embargo, en este estudio se realiza la cocción en tubérculos sin cáscara, que no es la forma convencional de cocción de los cultivares andinos.

#### I.4. Bioaccesibilidad

El término bioaccesibilidad se ha definido como la fracción de un compuesto que es liberado de la matriz del alimento en el tracto gastrointestinal y así llega a ser disponible para la absorción intestinal. La bioaccesibilidad incluye la secuencia entera de eventos que toman lugar durante la transformación digestiva de los alimentos en componentes que pueden ser absorbidos y asimilados por las células del epitelio intestinal, y finalmente, metabolizados intestinal y/o hepáticamente (Fernández-García, et al. 2009).

##### I.4.1. Bioaccesibilidad de carotenoides

Una vez que son consumidos, los carotenoides son procesados de la misma manera que los ésteres de retinilo y otros componentes solubles en grasa. Además, tienen que ser liberados de la fuente alimenticia, emulsificados en la fase lipídica del quimo, y solubilizados en una mezcla de micelas para ser accesibles por las células epiteliales. La absorción de carotenoides de la dieta generalmente requiere: 1) transferencia de la matriz del alimento a las micelas; 2) paso desde las micelas hasta el citoplasma de las células epiteliales absorptivas, y 3) secreción de carotenoides intactos o ésteres de retinilo derivados de la fijación de los carotenoides, hacia la circulación linfática vía quilomicrones (Failla y Chitchumroonchokchai 2005).

La digestión se inicia en la cavidad bucal cuando el alimento es cortado y lubricado con saliva antes de ingresar al estómago. El jugo gástrico que contiene ácido clorhídrico, pepsina y lipasa gástrica es secretado en el lumen gástrico y mezclado con los alimentos ingeridos, lo que supone una liberación parcial de los carotenoides desde la matriz del alimento hasta las gotas de grasa emulsificadas.

La entrada del quimo dentro del intestino delgado es asociada con la liberación de secreciones pancreáticas y bilis al lumen. La acidez del quimo es neutralizada con bicarbonato, y enzimas hidrolíticas que promueven la degradación de componentes de la matriz del alimento. Las lipasas del lumen hidrolizan triacilgliceroles, fosfolípidos y otros ésteres, presentes en gotas de grasa emulsificadas. La lipasa colesterol y la lipasa triacilglicérido pancreática son capaces de hidrolizar ésteres de carotenoides polares en carotenoides libres (Breithaupt et al. 2002). Las sales biliares son requeridas para la estabilización de las micelas. Una vez formadas, las micelas difunden a través de la capa de agua inerte y ceden los carotenoides y otros compuestos solubles en grasa a la superficie apical de los enterocitos constituyentes de la mucosa intestinal (Failla et al., 2008).

La biodisponibilidad de los carotenoides está afectada por varios factores como las propiedades fisicoquímicas de la especie del carotenoide, la matriz de la fuente del carotenoide, otros componentes del alimento, y los factores dietéticos y fisiológicos que afectan el proceso digestivo (Yeum y Russel, 2002). Así, las propiedades fisicoquímicas de los carotenoides, su ubicación sub-celular en el tejido vegetal que constituye al alimento, el método de preparación del alimento, y la composición química de la comida pueden afectar la biodisponibilidad de los carotenoides. Además, los carotenoides por su particular naturaleza y función están sujetos a procesos de oxidación, lo cual limita su estabilidad durante el almacenamiento del producto, procesamiento de alimentos, y como consecuencia, su biodisponibilidad (Holst and Williamson, 2008).

La determinación de la eficiencia de micelarización de los carotenoides (EM) de alimentos vegetales o bioaccesibilidad *in vitro* durante la digestión simulada, ha sido propuesta como una herramienta efectiva para el tamizado inicial de la biodisponibilidad relativa de carotenoides en cultivares candidatos para su estudio *in vivo* con animales y humanos.

Se han reportado niveles altos de EM para maíz y zanahoria (59 y 66% para luteína; y de 54 y 48% para zeaxantina, respectivamente) y niveles bajos de EM para la luteína de la espinaca (5 y 18% para luteína de acuerdo a Granado-Lorencio et al. 2007 y O'Connell et al. 2007, respectivamente). Asimismo, se ha evaluado la bioaccesibilidad de zeaxantina de goji, pimiento naranja y rojo, verduras que presentan concentraciones elevadas de zeaxantina, y particularmente, ésteres de zeaxantina y se ha reportado que la EM de zeaxantina en pimiento naranja y rojo oscila entre el 50-70% mientras que en goji digerido es solo de 24% (Chitchumroonchockchai y Failla, 2006). Sin embargo, no existen publicaciones sobre la bioaccesibilidad de los carotenoides en papa.

### I.4.2. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos

La diversa estructura de los compuestos fenólicos influye significativamente en su biodisponibilidad. Los ácidos fenólicos son más fácilmente absorbidos que los compuestos fenólicos de gran peso molecular como las antocianinas. El ácido cafeico se absorbe mucho más rápido que el ácido clorogénico. Se ha encontrado que en personas ileostomizadas, la absorción intestinal del ácido cafeico es 95% y la del ácido clorogénico 33% y que menos del 3% de la cantidad de ácido clorogénico ingerido se recupera en la orina (Scalbert et al, 2002).

Del total de las antocianinas ingeridas una cantidad es absorbida en el estómago. Las condiciones del estómago no modifican la estructura de las antocianinas, sin embargo, debido al pH elevado en el intestino, a este

nivel se convierten en una combinación de las formas hemiketal chalcona y quinoidal (McGhie et al., 2007; Yang et al., 2011). Otra pequeña cantidad de antocianinas es absorbida en el yeyuno.

Una vez que los compuestos fenólicos son absorbidos se conjugan con grupos glucorónidos, sulfatos y metilos en la mucosa intestinal y los tejidos internos. Los compuestos fenólicos no conjugados están virtualmente ausentes en el plasma. Tales reacciones facilitan su excreción y limitan su potencial toxicidad (Manach et al., 2004).

Los compuestos fenólicos que alcanzan la región del colon son metabolizados extensivamente por la microflora a una amplia gama de ácidos fenólicos de bajo peso molecular. Los metabolitos formados a partir de los compuestos fenólicos metabolizados en el colon favorecen la salud del tracto gastrointestinal o a nivel sistémico, después de su absorción en el colon.

Los factores más importantes para determinar el potencial beneficioso de los compuestos fenólicos en las células epiteliales del intestino son su estabilidad y bioaccesibilidad bajo condiciones gastrointestinales (Saura-Calixto et al., 2007).

Haciendo uso de técnicas *in vitro* se ha encontrado que solo el 62% y 47% de los compuestos fenólicos en uvas y en un jugo de frutas son bioaccesibles (Cilla et al., 2009). Asimismo, se ha encontrado que la bioaccesibilidad de antocianinas de las uvas y las frambuesas es baja (8 y 5%, respectivamente) (Tagliazucchi et al., 2010; McDougall et al., 2005). Sin embargo, hasta la fecha tampoco existen trabajos de investigación sobre la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos en papa.

## II. UNIDAD TEMÁTICA DE LOS TRABAJOS

La realización de esta tesis se planteó para profundizar en el conocimiento sobre la concentración de carotenoides y fenólicos en papa más allá de los trabajos que indican dichos niveles en el tubérculo crudo. En tal sentido en esta tesis se determina además de la concentración de compuestos carotenoides y fenólicos, su bioaccesibilidad en muestras provenientes de tubérculos cocidos. La determinación de carotenoides en papas cocidas así como la evaluación de su bioaccesibilidad se ha realizado en papas de pulpa amarilla; mientras que la determinación de compuestos fenólicos totales, antocianinas totales, actividad antioxidante en tubérculos cocidos, así como su bioaccesibilidad se ha realizado en papas de coloración morada y rosada. Asimismo, en esta tesis también se incluye la optimización de métodos para análisis de compuestos fenólicos totales, antocianinas totales y actividad antioxidantes en muestras liofilizadas.

Los resultados obtenidos correspondientes han sido publicados en sendos artículos de investigación que se estructuran de la siguiente forma. El primer artículo trata sobre el efecto de la cocción en la concentración de carotenoides de papas amarillas y se titula: “Carotenoid concentrations of native Andean potatoes as affected by cooking” (Anexo VIII. 1). El segundo artículo titulado: “Total phenolic, total anthocyanin and phenolic acid concentrations and antioxidant activity of purple-fleshed potatoes as affected by boiling” (Anexo VIII. 2), además de tratar sobre el efecto de la cocción en los compuestos fenólicos de papa de pulpa morada, incluye los resultados de la optimización de métodos para análisis de dichos compuestos en muestras liofilizadas. El tercer artículo titulado: “In vitro bioaccessibility of lutein and zeaxanthin of yellow fleshed boiled potatoes” (Anexo VIII. 3) trata sobre la bioaccesibilidad de carotenoides en papas amarillas de la zona andina. Finalmente el cuarto artículo titulado: “Concentration and bioaccessibility of chlorogenic acid and anthocyanins of purple and pink fleshed cooked potatoes” reporta niveles de fenólicos en

papas de pulpa morada y roja e incluye resultados de la evaluación de la bioaccesibilidad de antocianinas y ácido clorogénico en un grupo reducido de estas variedades de papas.

Los resultados obtenidos en estos trabajos se presentaron en varios congresos nacionales e internacionales que se detallan en el Anexo VIII.4.

A continuación se incluyen los resúmenes traducidos de los artículos publicados así como el resumen del cuarto artículo, el cual será enviado a la revista *Journal of Agriculture and Food Chemistry* en enero del 2014. El resumen incluye los resultados que se han obtenido, junto con el título original y los datos de la publicación.

**Efecto de la cocción en la concentración de carotenoides de papas nativas Andinas**

Gabriela Burgos <sup>a</sup>, Walter Amoros <sup>a</sup>, Elisa Salas <sup>a</sup>, Lupita Muñoa <sup>a</sup>, Paola Sosa <sup>a</sup>, Carlos Díaz <sup>b</sup>, Merideth Bonierbale <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro Internacional de la Papa, Av. La Molina 1895, P.O. Box 1558, Lima, Perú

<sup>b</sup> Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Universidad de La Laguna. Avda. Astrofísico Francisco Sánchez s/n, 38201, La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, España

Se determinó el efecto de la cocción por hervido sobre la concentración de carotenoides totales e individuales mediante espectrofotometría y HPLC, en un grupo de cultivares Andinos con diferentes intensidades de color de pulpa amarilla. Los cambios en las concentraciones debidas a la cocción por hervido variaron significativamente entre cultivares. El hervido redujo significativamente las concentraciones de violaxantina y anteraxantina en todos los cultivares. Sin embargo, las concentraciones de luteína y zeaxantina en los tubérculos cocidos no fueron afectadas o fueron mayores que las concentraciones en los tubérculos crudos. El cultivar 701862 de pulpa amarilla intermedio, mostró la concentración más alta de luteína (sobre los 200µg/100g de peso fresco) y el cultivar 704218 de pulpa amarillo oscuro, mostró la concentración más alta de zeaxantina (sobre los 1000µg/100g de peso fresco) tanto en tubérculos crudos como cocidos. Las papas de color amarillo oscuro hervidas son una fuente significativa de zeaxantina (sobre los 500µg por 100g de peso fresco).

Carotenoid concentrations of native Andean potatoes as affected by cooking

Food Chemistry 133 (2012) 1131–1137

Número de orden en el “Journal Citation Report” año 2012, sección “Food Science and Technology”:

Índice de impacto: 3,334.

**Efecto de la cocción en la concentración de fenoles totales, antocianinas totales y ácidos fenólicos y actividad antioxidante en papas de pulpa morada**

Gabriela Burgos<sup>a\*</sup>, Walter Amorosa<sup>a</sup>, Lupita Muñoa<sup>a</sup>, Paola Sosa<sup>a</sup>, Edith Cayhualla<sup>a</sup>, Cinthia Sanchez<sup>a</sup>, Carlos Díaz<sup>b</sup>, Meredith Bonierbale<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centro Internacional de la Papa, Av. La Molina 1895, PO Box 1558, Lima, Perú

<sup>b</sup>Departamento de Química Analítica, Ciencia de alimentos y Nutrición, Universidad de La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sanchez s/n 38206, La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, España

Se determinó el efecto de la cocción por hervido sobre las concentraciones de fenoles totales (FT), antocianinas totales (AT) y ácidos fenólicos (AF) y sobre la actividad antioxidante (AA) en las papas de pulpa color morado de cuatro cultivares andinos pertenecientes a *Solanum tuberosum tetraploid andigenum*. Los métodos de extracción para cada parámetro fueron optimizados para el análisis de muestras liofilizadas tanto crudas como cocidas. La concentración de metanol influye fuertemente en la extracción de FT y antioxidantes como se desprende de los valores de la AA, siendo más eficiente al 80% y 60% en muestras de papas crudas y cocidas, respectivamente. El AF predominante en tubérculos de papa crudos y hervidos fue el ácido clorogénico (AC). El ácido cafeico también estuvo presente en tubérculos crudos pero disminuyó drásticamente en tubérculos hervidos. En todos los cultivares, las concentraciones de FT y AA determinadas en los tubérculos hervidos fueron mayores que en los tubérculos crudos. Con excepción del cultivar 704429, las concentraciones de AT y AC determinadas entre los cultivares de tubérculos crudos y hervidos no fueron significativamente diferentes. El cultivar de pulpa morado oscuro, 704429, mostró la concentración más alta de AT (418 mg/100 g de peso fresco) y AA (17, 305 µg equivalente

Trolox/g de peso fresco). Las papas cocidas con pulpa morada son una buena fuente de AT y muestran alta AA, y probablemente puedan contribuir significativamente a la ingesta de componentes fenólicos promotores de la salud.

Total phenolic, total anthocyanin and phenolic acid concentrations and antioxidant activity of purple-fleshed potatoes as affected by boiling

Journal of Food Composition and Analysis 30 (2013) 6–12

Número de orden en el “Journal Citation Report” año 2012, sección “Food Science and Technology”:

Índice de impacto: 2,088

### **Bioaccesibilidad In vitro de luteína y zeaxantina en papas cocidas de pulpa amarilla**

Gabriela Burgos<sup>1\*</sup>, Lupita Muñoa<sup>1</sup>, Paola Sosa<sup>1</sup>, Merideth Bonierbale<sup>1</sup>,  
Thomas zum Felde<sup>1</sup> y Carlos Díaz<sup>b</sup>,

<sup>1</sup>Centro Internacional de la Papa, Av. La Molina 1895, PO Box 1558, Lima,  
Perú

<sup>2</sup>Departamento de Química Analítica, Ciencia de alimentos y Nutrición,  
Universidad de La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sanchez s/n 38206, La  
Laguna, Santa Cruz de Tenerife, España

Las papas de pulpa amarilla contienen cantidades significantes de luteína y zeaxantina pero hasta la fecha la bioaccesibilidad de los carotenoides provenientes de la papa no ha sido investigada. El propósito de este estudio fue estimar la bioaccesibilidad *in vitro* de los carotenoides provenientes de la papa. Se determinó las concentraciones de luteína y zeaxantina en muestras cocidas, liofilizadas y molidas de siete cultivares de papa con pulpa amarilla, mediante HPLC, antes y después de las fases (gástrica, duodenal y micelar) de una digestión *in vitro*.

La estabilidad digestiva en la fase gástrica y duodenal de la luteína y zeaxantina de los tubérculos cocidos en los diferentes cultivares osciló entre 70 a 95%, mientras que la eficiencia de micelarización varió de 33 a 71% para luteína y de 51 a 71% para zeaxantina. En todos los cultivares, las cantidades de luteína y zeaxantina después de la micelarización fueron significativamente menores que las cantidades encontradas en las muestras cocidas. El cultivar 701862 mostró la concentración más alta de luteína bioaccesible (280 µg/100 g de peso seco) y los cultivares 703566 y 704218, mostraron la concentración más alta de zeaxantina bioaccesible (sobre 600 µg/100 g de peso seco). Considerando el consumo promedio de papa en los Andes (≈500 g por día), el cultivar 701862 provee el 14% de la

ingesta de luteína recomendada con beneficios para la salud; y los cultivares 703566 y 794218, proveen más del 50% de la ingesta sugerida de zeaxantina.

In vitro Bioaccessibility of Lutein and Zeaxanthin of Yellow Fleshed Boiled Potatoes

Plant Foods for Human Nutrition 68 (4) (2013) 385-390

Número de orden en el “Journal Citation Report” año 2012, sección “Food Science and Technology”:

Índice de impacto: 2,358.

### **Concentración y bioaccesibilidad del ácido clorogénico y antocianinas de papas moradas y rojas cocidas**

Gabriela Burgos<sup>1\*</sup>, Lupita Muñoa<sup>1</sup>, Paola Sosa<sup>1</sup>, Merideth Bonierbale<sup>1</sup>,  
Thomas zum Felde<sup>1</sup> y Carlos Díaz<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Centro Internacional de la Papa, Av. La Molina 1895, PO Box 1558, Lima,  
Perú

<sup>2</sup>Departamento de Química Analítica, Ciencia de alimentos y Nutrición,  
Universidad de La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sanchez s/n 38206, La  
Laguna, Santa Cruz de Tenerife, España

Se determinó la concentración de compuestos fenólicos totales (FT), antocianinas totales (AT) y ácido clorogénico (AC) y se evaluó la actividad antioxidante (AA) en muestras provenientes del tubérculo cocido sin cáscara de un total de 18 cultivares andinos de papa (12 de pulpa color morado y 6 de pulpa color rojizo) usando espectrofotometría y HPLC. Los cultivares de pulpa color morado 704058 y 704429 mostraron las concentraciones más altas de FT (586 y 1134 mg/100g PF, respectivamente), AT (215 y 459 mg/100g PF, respectivamente), AC (184 y 396 mg/100g PF, respectivamente) y AA (8735 y 17865 µg Equivalentes Trolox/g, PF). Las concentraciones de FT, AT y AC estuvieron positiva y significativamente correlacionadas con la AA.

También se caracterizó el perfil de antocianinas individuales en las mismas muestras usando HPLC acoplado a masas y se encontró que la mayoría de las antocianinas presentes en el tubérculo cocido de los cultivares evaluados fueron aciladas y que mientras en los cultivares de pulpa morada, la antocianina predominante fue la petunidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido (37 al 78% de las AT), en los cultivares de pulpa rojiza, la antocianina predominante fue la pelargonidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido (41 al 75% de las AT).

En siete de los dieciocho cultivares se evaluó la bioaccesibilidad del AC y las AT encontrándose que la bioaccesibilidad de ambos compuestos fue alta (82 - 110% y 73 - 84%, respectivamente). La concentración de AC bioaccesible en los cultivares 704058 y 704429 fue 165 y 314 mg/ 100 g PF, respectivamente. En tanto la concentración de AT bioaccesible para ambos cultivares fue 174 y 372 mg/ 100 g PF, respectivamente. Las papas cocidas de cultivares con pulpa morado son una fuente significativa de AC y AT a la dieta humana, especialmente en poblaciones con ingestas altas de papas moradas.

### **III. OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la concentración y bioaccesibilidad de carotenoides y compuestos fenólicos en papas cocidas y su contribución a la dieta.

#### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Determinar el efecto de la cocción sobre la concentración de carotenoides de papas con pulpa amarilla.

2. Optimizar los métodos de determinación compuestos fenólicos y de evaluación de la actividad antioxidante en muestras crudas y cocidas de papas con pulpa morada.

3. Determinar el efecto de la cocción sobre la concentración de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de papas con pulpa morada.

4. Evaluar la concentración y bioaccesibilidad de carotenoides en papas cocidas de pulpa amarilla.

5. Evaluar la concentración, la actividad antioxidante y bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en papas cocidas con pulpa morada y roja.

## **IV. EXPERIMENTAL**

### **IV.1 MATERIAL VEGETAL**

Todos los cultivares utilizados para esta tesis fueron obtenidos de la colección mundial del germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP). Los cultivares utilizados se pueden considerar en cuatro grupos.

IV.1.1 Para evaluar efecto de la cocción sobre la concentración de carotenoides en papa de pulpa amarilla

Se utilizaron siete cultivares andinos con diferentes intensidades de color amarillo de la pulpa pertenecientes a *Solanum tuberosum diploid Andigenum* (Ovchinnikova et al., 2011). De los siete cultivares, dos eran amarillo claro: 705821 (Grupo: *Phureja*), 705172 (Grupo: *Phureja*); dos amarillo intermedio: 704393 (Grupo: *Goniocalix*), 701862 (Grupo: *Goniocalix*) y tres amarillo oscuro: 702472 (Grupo: *Goniocalix*), 705799 (Grupo: *Phureja*) y 704218 (Grupo: *Phureja*). Cuatro de estos cultivares crecieron en La Victoria, Junin, Perú entre Diciembre y Mayo de 2009, y los otros tres, en Comas, Junin, Peru entre Octubre y Febrero de 2010.

Se recolectaron al azar treinta tubérculos puros y medianos de cada uno de los siete cultivares. Se escogieron tubérculos de diferentes plantas y surcos, los cuales fueron llevados al laboratorio para ser analizados en fresco dentro de las tres siguientes semanas.

Los tubérculos recolectados fueron lavados con agua (para eliminar residuos de tierra), enjuagados con agua destilada y secados con papel secante.

Para el caso de las muestras crudas, los tubérculos crudos y con cáscara fueron cortados en trozos pequeños y homogenizados en un

procesador de comida. La muestra homogenizada fue analizada inmediatamente.

Para el caso de las muestras cocidas, los tubérculos fueron colocados en ollas limpias de acero, cubiertos con agua y sancochados con la cáscara incluida. La cocción se realizó a una temperatura uniforme, considerándose que los tubérculos estaban cocidos cuando un estilete de acero inoxidable podía penetrar fácilmente un tubérculo control. Cada cultivar requirió un tiempo de cocción distinto que varió entre los 23 y 34 min. Los tubérculos cocidos fueron preparados igual que los crudos.

IV.1.2 Para evaluar el efecto de la cocción sobre la concentración de compuestos fenólicos en papas de pulpa morada.

Se utilizaron cuatro cultivares andinos pertenecientes a *Solanum tuberosum tetraploid Andigenum*, los cuales fueron seleccionadas en base a la intensidad del color morado de la pulpa de sus tubérculos. El cultivar 703268 (Boloña) tiene tubérculos de pulpa morado claro, el cultivar 703488 (Challina) tiene tubérculos de pulpa morado intermedio, el cultivar 704058 (Leona) tiene tubérculos de pulpa morado oscuro, y el cultivar 704429 (Guincho) tiene tubérculos de pulpa morado intensamente oscuro. Los cuatro cultivares crecieron en Comas, Junín, Perú (3.335 m.s.n.m, metros sobre el nivel del mar) entre Octubre de 2009 y Febrero de 2010, y fueron recolectados a los 180 días después de la siembra.

Se recolectaron al azar veinte tubérculos puros y medianos de los cuatro cultivares escogiendo tubérculos de diferentes plantas y surcos. Los tubérculos fueron llevados al laboratorio donde se prepararon muestras liofilizadas y molidas después de una semana de la cosecha.

Los tubérculos fueron lavados con agua (para eliminar residuos de tierra), enjuagados con agua destilada y secados con papel secante.

Para el caso de las muestras crudas, se utilizaron 10 tubérculos crudos, los tubérculos fueron cortados longitudinalmente en cuatro partes. De cada sección se obtuvieron rodajas hasta obtener una muestra representativa de 100 g, la cual fue congelada inmediatamente en nitrógeno líquido, mantenida a  $-70^{\circ}\text{C}$ , y luego liofilizada, molida en un tamiz de malla 40, y almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Para el caso de las muestras cocidas, se utilizaron doce tubérculos sin pelar para cada cultivar, los cuales fueron colocados en ollas de acero inoxidable que contenían 2 l de agua herviente. Dos tubérculos (control) fueron usados para determinar el tiempo requerido de cocción de cada cultivar. Los tubérculos se consideraron cocidos cuando un estilete de acero inoxidable pudo penetrar fácilmente un tubérculo control. Cada cultivar requirió un tiempo de cocción distinto que osciló entre los 20 y 25 min. Los tubérculos cocidos fueron pelados y preparados igual que los crudos.

IV.1.3 Para caracterizar la concentración y bioaccesibilidad de carotenoides en papas cocidas de pulpa amarilla.

Se utilizaron siete cultivares de papa diploide perteneciente a *Solanum tuberosum diploid Andigenum group* (Figura IV.1). Tres cultivares pertenecen al grupo *Goniocalyx* y cuatro al grupo *Phureja*. Los siete cultivares crecieron en Comas, Perú, entre Octubre de 2011 y Febrero de 2012 con un tratamiento agronómico uniforme.

Se recolectaron al azar doce tubérculos sanos y medianos de cada una de los siete cultivares tomando tubérculos de diferentes plantas y surcos. Los tubérculos fueron llevados al laboratorio en donde fueron lavados con agua para eliminar los residuos de tierra, enjuagados con agua destilada y colocados en ollas de acero inoxidable, cubiertos con agua y cocinados a temperatura uniforme. Se usaron dos tubérculos (tubérculos control) para determinar el tiempo requerido de cocción en

cada cultivar considerándose que los tubérculos estaban cuando un estilete pudo penetrar fácilmente los tubérculos control. Cada cultivar requirió un tiempo distinto de cocción, el cual varió entre 20 y 25 min.

Los tubérculos cocidos fueron pelados, troceados longitudinalmente en cuatro secciones, y de cada sección, se tomaron rodajas hasta obtener una muestra representativa de 200 g. Las muestras fueron inmediatamente congeladas con nitrógeno líquido, colocadas a -70°C, y posteriormente liofilizadas, molidas con una malla de metal 40, y almacenadas a 70°C hasta el análisis.

V.1.4. Para caracterizar la concentración y bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en papas de pulpa morada y roja cocidas.

Se utilizaron un total de dieciocho cultivares andinos, de los cuales nueve pertenecen a *Solanum tuberosum tetraploid Andigenum* y nueve a *Solanum tuberosum diploid Andigenum* (cinco cultivares al Grupo: *Stenotomum*, un cultivar al Grupo: *Goniocalyx* y tres cultivares al Grupo: *Phureja* (Ovchinnicova et al., 2011). Seis de los cultivares tenían pulpa de color rojizo o rosado (Figura IV.2) y los otros doce tenían pulpa morada (Figura IV.3). Los siete cultivares crecieron en Comas, Perú, entre Octubre de 2011 y Febrero de 2012 con un tratamiento agronómico uniforme.

<p><b>Número CIP:</b> 701862 <b>Nombre Común:</b> Amarilla Tumbay <b>Taxonomía:</b> <i>Solanum tuberosum diploid</i> <i>Andigenum</i> (Grupo: <i>Goniocalix</i>)</p> 	<p><b>Número CIP:</b> 702472 <b>Nombre Común:</b> Amarilla del Centro <b>Taxonomía:</b> <i>Solanum tuberosum diploid</i> <i>Andigenum</i> (Grupo: <i>Goniocalix</i>)</p> 
<p><b>Número CIP:</b> 703282 <b>Nombre Común:</b> Ishkupuru <b>Taxonomía:</b> <i>Solanum tuberosum diploid</i> <i>Andigenum</i> (Grupo: <i>Goniocalix</i>)</p> 	<p><b>Número CIP:</b> 703566 <b>Nombre Común:</b> Desconocido <b>Taxonomía:</b> <i>Solanum tuberosum diploid</i> <i>Andigenum</i> (Grupo: <i>Phureja</i>)</p> 
<p><b>Número CIP:</b> 704218 <b>Nombre Común:</b> Yema de Huevo <b>Taxonomía:</b> <i>Solanum tuberosum diploid</i> <i>Andigenum</i> (Grupo: <i>Phureja</i>)</p> 	<p><b>Número CIP:</b> 705799 <b>Nombre Común:</b> Desconocido <b>Taxonomía:</b> <i>Solanum tuberosum diploid</i> <i>Andigenum</i> (Grupo: <i>Phureja</i>)</p> 



Figura IV.1. Cultivares con pulpa color amarillo usados para evaluar la bioaccesibilidad de carotenoides en papas cocidas.

Se recolectaron al azar doce tubérculos sanos y medianos de cada uno de los 7 cultivares tomando tubérculos de diferentes plantas y surcos. Los tubérculos fueron llevados al laboratorio en donde fueron lavados con agua para eliminar los residuos de tierra, enjuagados con agua destilada y colocados en ollas de acero inoxidable, cubiertos con agua y cocinados a temperatura uniforme. Se usaron dos tubérculos (tubérculos control) para determinar el tiempo requerido de cocción en cada accesión considerándose que los tubérculos estaban cuando un estilete pudo penetrar fácilmente los tubérculos control. Cada accesión requirió un tiempo distinto de cocción, el cual varió entre 20 y 25 min.

Los tubérculos cocidos fueron pelados, troceados longitudinalmente en 4 secciones y de cada sección se tomaron rodajas hasta obtener una muestra representativa de 200 g. Las muestras fueron inmediatamente congeladas con nitrógeno líquido, colocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , y posteriormente liofilizadas, molidas con una malla de metal 40, y almacenadas a  $70^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis.

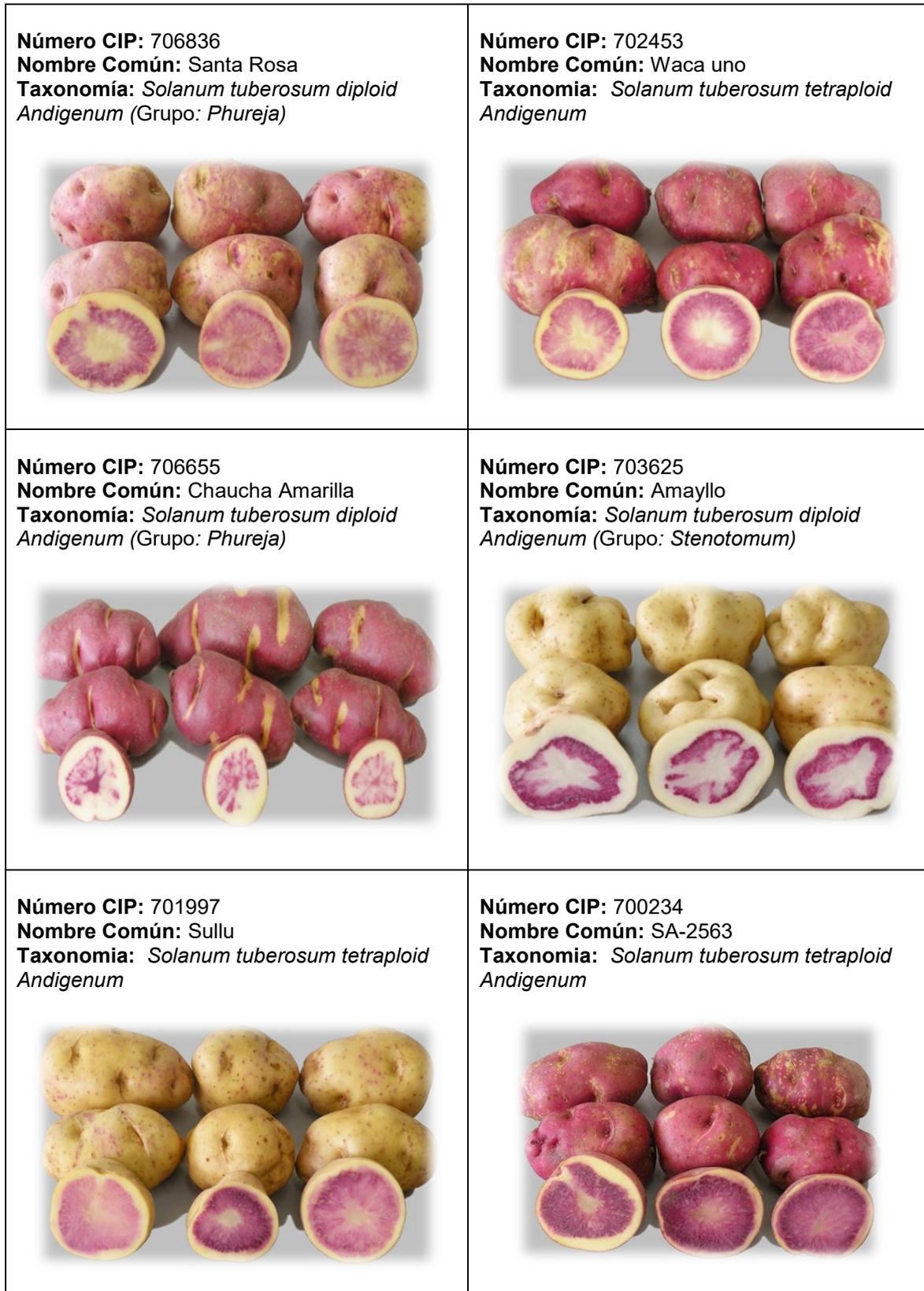


Figura IV.2. Cultivares de pulpa roja usados para caracterizar la concentración y bioaccesibilidad de fenólicos en papas cocidas.



Figura IV.3. Cultivares de pulpa morada usados para caracterizar la concentración y bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en papas cocidas.

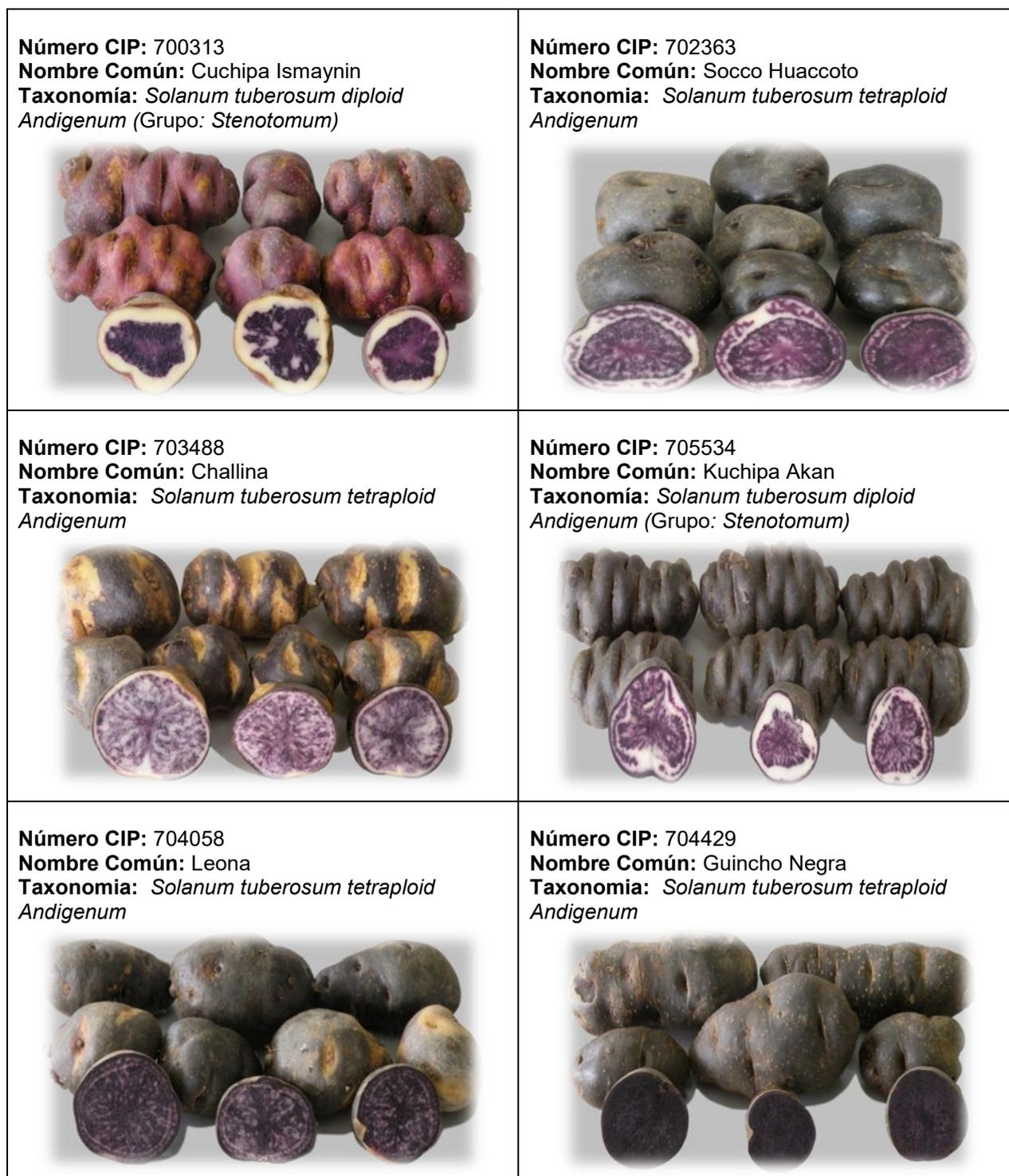


Figura IV.3. (Continuación). Cultivares de pulpa morada usados para caracterizar la concentración y bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en papas cocidas.

## **IV.2 MÉTODOS ANALÍTICOS**

Los métodos utilizados para evaluar los diferentes parámetros determinados en esta tesis se pueden clasificar en los siguientes grupos:

- Métodos espectrofotométricos con los que se analizaron compuestos fenólicos totales (FT), antocianinas totales (AT) y actividad antioxidante (AA).
- Métodos cromatográficos empleados para la cuantificación de carotenoides, ácidos fenólicos (AF) y antocianinas individuales.
- Método para la digestión *in vitro* para evaluar la bioaccesibilidad de carotenoides y compuestos fenólicos.

Previamente a la aplicación de los métodos de análisis para FT, AT y AA, se realizó la optimización del método para aplicarlo en muestras liofilizadas de papa. Los detalles de dicha optimización se presentan como un capítulo de los resultados y discusión.

### **IV.2.1 Métodos espectrofotométricos**

#### **Compuestos fenólicos totales**

Los FT fueron analizados de acuerdo al método descrito por Waterhouse (2002), el cual fue optimizado para papas crudas y cocidas, liofilizadas.

#### **Materiales**

Vaso de precipitado de 500 ml, 100 ml y 50 ml.

Embudo de buchner ( $\varnothing$ = 9 cm)

Matraz aforado de 1 l, 250 ml, 50 ml y 25 ml

Frascos ámbar 1 l y 500 ml

Matraz de kitasato de 500 ml

Pipeta Pasteur de plástico  
Papel aluminio  
Papel filtro whatman # 4 y # 2  
Pipetor automático de 100 a 1000 µl  
Pipetor automático de 500 a 5000 µl  
Probetas de 100 ml y 50 ml  
Otros materiales de uso habitual en el laboratorio.

#### Equipamiento

Agitador Calentador RT 5 power (IKA® - WERKE) (USA)  
Balanza analítica de 0,0001 g de precisión (METTLER-TOLEDO) (SUIZA)  
Baño maría AL – 12 (LAUDA) (ALEMANIA)  
Bomba de vacío (GAST MANUFACTURING) (USA)  
Espectrofotómetro visible – UV 160A (SHIMADZU CORPORATION) (JAPON)  
Estufa (LAB-LINE) (USA)  
Lavador ultrasónico 551OD – DTH (BRANSON) (USA)  
Vortex labdancer (IKA) (USA)

#### Reactivos, estándares y disolventes:

Ácido clorogénico, (SIGMA-ALDRICH) (INDIA)  
Ácido cafeico, (SIGMA-ALDRICH) (SWITZERLAND)  
Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 20%, (MERCK) (ALEMANIA)  
Metanol 60 y 80%, (MERCK) (ALEMANIA)  
Reactivo Folin-Ciocalteu 2N, (MERCK) (ALEMANIA)

#### Procedimiento:

El método optimizado para el análisis de FT consistió en lo siguiente: se pesó 0,2-1 g de muestra cruda o cocida, liofilizada y molida, y se extrajo con 10 ml de metanol (80% en muestras crudas y 60% en muestras cocidas) durante 10 min usando sonicación. La extracción se repitió con 10 ml del mismo disolvente usando además de la sonicación, calor a 80°C durante 5 min. Se filtró el extracto metanólico incluyendo los

componentes fenólicos y se llevó hasta 25 ml con metanol. Se diluyó cien  $\mu\text{l}$  del extracto metanólico en agua destilada (1:20), y seguidamente, se mezcló con 500  $\mu\text{l}$  del reactivo Folin-Ciocalteu (2N) durante 6 min. Luego, se agregó 1500  $\mu\text{l}$  de disolución saturada con carbonato de sodio y se mantuvo a 40°C durante 30 min. Se midió la absorbancia de esta disolución a 765 nm y se calculó la concentración de FT usando una recta de calibrado de ácido clorogénico dentro del intervalo comprendido entre 100 a 1500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La linealidad de la recta de calibrado fue buena con un valor  $R^2 = 0,998$ . El ensayo de FT usando el reactivo Folin-Ciocalteu mide la reducción de la capacidad antioxidante de una muestra (Prior et al., 2005). Este reactivo es de color amarillo y está constituido por una mezcla de ácido fosfotungsténico y ácido fosfomolibdico. En presencia de fenoles, y en medio alcalino, se reduce a una mezcla de óxidos de tungsteno y de molibdeno de color azul que presenta una absorción máxima a 765 nm.

#### **Antocianinas totales**

El análisis de AT se realizó en base al método propuesto por Jansen y Flamme (2006) para papas frescas. Dicho método fue optimizado para muestras liofilizadas de papa.

#### **Materiales**

Vaso de precipitado de 500 ml, 100 ml y 5 ml

Matraz aforado de 1 l, 500 ml, 50 ml y 25 ml

Frascos ámbar de 1 l y 500 ml

Papel filtro Whatman # 2

Pipetor automático de 100 a 1000  $\mu\text{l}$

Pipetor automático de 500 a 5000  $\mu\text{l}$

Probetas de 100 ml, 50 ml y 25 ml)

Tips de 5 ml y 1 ml

Tubos de centrifuga Dupont

Tubos de ensayo (16x150 mm)

Otros materiales de uso habitual en el laboratorio

#### Equipamiento

Balanza analítica AB-204 (METTLER-TOLEDO) (SUIZA)

Baño maría (PRECISION SCIENTIFIC) (USA)

Centrifuga 5B10R (EPPENDORF) (ALEMANIA)

Espectrofotómetro visible UV 160 – A (SHIMADZU CORPORATION) (JAPÓN)

Estufa (LAB-LINE) (USA)

Lavador Sonicador 551OE - DTH (BRANSON) (USA)

#### Reactivos, estándares y disolventes

Etanol P.A (95.8 %) (MERCK) (ALEMANIA)

Ácido clorhídrico P.A (37.0 %) (MERCK) (ALEMANIA)

#### Procedimiento

El método optimizado para el análisis de AT consistió en lo siguiente: dependiendo de la intensidad del color de la muestra, se pesó entre 0,05 y 0,5 g de muestras crudas o cocidas, liofilizadas y molidas y se extrajo con 10 ml de etanol al 95%: HCl 1,5M (80:20) usando sonicación durante 10 min. Se realizaron 2 extracciones más con 5 ml de la misma disolución usando sonicación durante 10 min, y adicionalmente, calentando a 80°C durante 5 min durante la tercera extracción. Se centrifugo y filtro el extracto de antocianinas resultante y se llevó a 25 ml con la disolución de extracción. Para las muestras moradas se midió la absorbancia del extracto a 545 nm y se calculó la concentración de AT usando el coeficiente de extinción ( $3,02 \times 10^4$ ) y el peso molecular de malvidina-3- $\rho$ -cumaroil-glucósido (718,5 g /l) mientras que para las muestras rojas se midió la absorbancia a 515 nm, y se calculó la concentración de AT usando el coeficiente de extinción ( $2,73 \times 10^4$ ) y el peso molecular de pelargonidina-3-glucósido (486,5 g /l) (Jansen y Flamme, 2006).

La concentración de FT y AT fue determinada por triplicado y se expresó como mg por 100 g de peso fresco (PF) y convertido a  $\mu\text{g}$  por 100g de peso seco (PS) usando el porcentaje de materia seca correspondiente.

### **Actividad antioxidante**

La evaluación de la AA se realizó a través de los ensayos ABTS y DPPH, basados en los métodos descritos por Re et al. (1999) y Brand-Williams et al. (1995), respectivamente, los cuales fueron optimizados para papas liofilizadas. El radical ABTS es el más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de las antocianinas, ya que presentan una absorción máxima próxima a la región infrarroja (734nm), con lo que se reducen posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacciones secundarias.

### **Materiales**

Vasos de precipitado vidrio 250ml, 100ml, 50ml y 25ml

Matraz aforado de 50ml y 25ml

Pipetor automático de 25 a 250ul

Pipetor automático de 0.5 a 5ml

Probeta de 250ml, 100ml y 50ml

Tubo de centrifuga Falcon BD 12ml

Tubos de vidrio 10ml (100mm x 11mm)

Otros materiales de uso habitual en el laboratorio

### **Equipamiento**

Agitador (IKA) (USA)

Balanza analítica AB-204 (METTLER) (SUIZA)

Centrifuga U320 (BOECO) (ALEMANIA)

Espectrofotómetro visible – UV 160A (SHIMADZU) (JAPON)

Reactivos

ABTS, ácido 2,2'-azinobis(3-ethylbenzotiazolin-6- sulfónico (SIGMA-ALDRICH) (USA)

K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, persulfato de potasio (SIGMA-ALDRICH) (JAPAN)

DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (SIGMA-ALDRICH) (USA)

Metanol P.A 99,9% (MERCK) (ALEMANIA)

Etanol P.A 95,8% (MERCK) (ALEMANIA)

Trolox, ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxilico (SIGMA-ALDRICH) (SUIZA)

Procedimiento:

El método optimizado consistió en lo siguiente: se pesó 500 µg de muestras de papa (cruda o cocida), liofilizadas y molidas y luego se extrajó dos veces usando 80% para las muestras crudas y 60% de metanol para las muestras cocidas, usando sonicación durante 30 min. El extracto fue centrifugado a 9000 x g durante 10 min.

Para la evaluación de AA mediante el método ABTS, se mezcló 150 µL del sobrenadante con 2850 µL de 7mM ABTS durante 10 min y se midió el color azul a 734 nm. Para la evaluación de AA por el método DPPH, se mezcló 150 µl del sobrenadante con 2850 µl de 0,1 mM DPPH durante 30 min y se midió el color amarillo a 517 nm. La AA fue calculada usando una curva de calibrado de Trolox dentro de un rango de 200 a 800 µM Trolox/l. La AA estuvo expresada como µg de Equivalentes Trolox por 100 g PS (µg Equiv. Trolox /100g PS) Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

## **IV.2.2 Métodos cromatográficos**

### **Carotenoides individuales**

El análisis de los carotenoides se llevó a cabo mediante el método descrito por Burgos et al., 2009, el cual fue desarrollado a partir del método propuesto por Kimura et al. (2007) para análisis de carotenoides en maíz.

#### Materiales

Vasos de precipitado de plástico de 600 ml y 250 ml

Vasos de precipitado de vidrio de 1 l, 250 ml y 100 ml

Embudos con filtro incorporado de 150 ml

Filtro PTFE de 0,22 $\mu$ m

Matraz aforado de 25ml

Matraz de 1 l y 125 ml

Matraz de kitasato de 1 l y 500 ml

Peras de decantación de 500 ml

Pipeta volumétrica de 5 ml

Pipetor automático de 100 a 1000  $\mu$ l

Pipetor automático de 500 a 5000  $\mu$ l

Pisceta de plástico de 800 ml, 500 ml y 125 ml

Probetas de 50 ml

Tips de 5 mL y 1 ml

Tubo de vidrio grueso de 100 ml

Tubos con tapa rosca de 20 ml

Utensilios de cocina (cuchillos, peladores, rayadores de hojuelas)

Viales de 1 ml

Otros materiales de uso habitual en el laboratorio

#### Equipamiento

Agitador de 5 posiciones (IKA - WERKE) (USA)

Balanza analítica AB-204 (METTLER-TOLEDO) (SUIZA)

Columna cromatográfica C30 (YMC) (USA)

Detector de arreglo de fotodiodos UV (WATERS) (USA)  
Equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia: HPLC 2695 (WATERS) (USA)  
Espectrofotómetro visible UV 1800 (SHIMADZU) (JAPON)  
Estufa (BINDER) (USA)  
Homogenizador ultra turrax T 25 básico (IKA) (USA)  
Procesador de alimentos (MOULINEX) (CHINA)  
Sonicador 2210 (BRANSON) (USA)  
Otros materiales de uso habitual en el laboratorio

#### Reactivos

Acetona grado HPLC 99,8 % (MERCK) (ALEMANIA)  
Acetona P.A 99,8 % (MERCK) (ALEMANIA)  
Acetonitrilo grado HPLC 99,9 % (MERCK) (ALEMANIA)  
BHT: 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (SIGMA-ALDRISH) (USA)  
Cloruro de sodio 99,5 % (MERCK) (ALEMANIA)  
Éter de petróleo 95,8 % (MERCK) (ALEMANIA)  
Éter dietílico 99,7 % (MERCK) (ALEMANIA)  
Hidróxido de potasio 85 % (MERCK) (ALEMANIA)  
Lana de vidrio (LABCENTER) (BRASIL)  
Metanol grado HPLC 99,9 % (MERCK) (ALEMANIA)  
Metanol P.A 99,9 % (MERCK) (ALEMANIA)  
Metil ter-butil éter grado HPLC 99,8 % (SIGMA-ALDRISH) (USA)  
Nitrógeno gaseoso (10 m<sup>3</sup>) (PERU)  
Sulfato de sodio anhidro 99,0 % (MERCK) (ALEMANIA)

#### Procedimiento:

En resumen, se pesó 2-8 g de tejido y luego se extrajo con acetona durante 1 minuto usando un homogenizador a 21,500 rpm. Se repitió la extracción hasta desaparición del color en el residuo. Se transfirieron los extractos a éter de petróleo y se saponificaron con un volumen equivalente de KOH metanólico al 10%, manteniéndolos en un cuarto oscuro a

temperatura ambiente durante toda la noche (16-20h). Se recuperaron los carotenoides saponificados con la ayuda de éter dietílico y acetona, y se aforó a 25 ml con éter de petróleo. Se midió la absorbancia del extracto a 450 nm y se calculó la concentración de carotenoide total usando el coeficiente de extinción para mezcla de carotenoides (2,500) indicado por Davies (1976).

Para el análisis de los carotenoides individuales, se secó 15 ml del extracto con una corriente de nitrógeno, luego se re-reconstituyó en 1 ml de acetona de grado HPLC, y seguidamente, se filtró a través de un filtro PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore). Se inyectó 10  $\mu\text{l}$  del extracto en un cromatógrafo líquido (HPLC), equipado con un sistema de separación (modelo 2995), con una bomba cuaternaria, con un sistema de muestreo automático, un sistema de separación y un detector de matriz de diodos (modelo 2696) controlado por el software Empower. La separación fue llevada a cabo en una columna polimérica YMC C30 (3  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 250 mm) usando como fase móvil un gradiente lineal de metanol:metil-terc-butil éter empezando en 100:0, siguiendo hasta 93:7 en 15 min, luego a 90:10 en 35 min, luego a 60:40 en 45 min y manteniendo esta proporción durante 15 min. El flujo se fijó a 0,8 ml/min con una re-equilibración de 15 min.

La concentración de carotenoides individuales se expresó como  $\mu\text{g}$  por 100 g de peso fresco (PF) y convertido a  $\mu\text{g}$  por 100g de peso seco (PS) usando el porcentaje de materia seca correspondiente.

### **Ácidos fenólicos**

La extracción de AF fue realizado siguiendo el método descrito por Andre et al. (2007) con algunas modificaciones para adaptarlo a muestras liofilizadas. La determinación de AF fue realizada de acuerdo al método HPLC propuesto por Xiaoyun et al. (2009).

### Materiales

Columna cromatográfica C18 (Symmetry, 5  $\mu$ m, 4.6 mm x 250 mm)

Vasos de precipitado de vidrio de 250ml y 100ml

Filtro hidrofílico PVDF 0.45 $\mu$ m

Matraz aforado de 1L, 25 mL y 5 mL

Papel Whatman #1

Pipetor automático de 100 a 1000 $\mu$ l

Pipetor automático de 500 a 5000 $\mu$ l

Probeta 250ml

Tubo de centrifuga de vidrio Dupont

### Equipamiento

Balanza analítica AB-204 (METTLER - TOLEDO)

Baño María AL12 (LAUDA) (ALEMANIA)

Centrífuga 5B10R (EPPENDORF) (ALEMANIA)

Detector de arreglo de diodos UV-visible (WATERS) (USA)

Bloque de secado (TECHNE) (REINO UNIDO)

Equipo de HPLC 2695 (WATERS) (USA)

Estufa (BINDER) (USA)

Lavador ultrasónico 5510 (BRANSON) (USA)

### Reactivos

Acetona HPLC (MERCK) (ALEMANIA)

Ácido acético glacial (MERCK) (ALEMANIA)

Acetonitrilo para HPLC (MERCK) (ALEMANIA)

Metanol P.A. (MERCK) (ALEMANIA)

Metanol para HPLC (MERCK) (ALEMANIA)

Procedimiento:

Se pesaron 0,1 g de muestras crudas y cocidas, liofilizadas y molidas y se extrajo con 3,5 ml de una solución que contenía metanol: agua milli-Q: ácido acético (80:19.5:0.5) usando sonicación por 20 min. El extracto fue centrifugado a 9,000 x g y el sobrenadante fue filtrado. Se repitió la extracción 2 veces más y usando las mismas condiciones y usando adicionalmente calor a 80°C en la tercera extracción. Se concentró el extracto filtrado conteniendo AF usando una corriente de N<sub>2</sub> a 40°C, y finalmente se suspendió en 5 ml de agua destilada.

El análisis por HPLC fue realizado en un cromatografo Waters modelo 2995 con sistema de separación usando una columna de fase reversa C18 (5 µm, 4,6 mm x 250 mm) y un gradiente de elución compuesto de 1% de ácido acético en agua (eluyente A) 100% y acetonitrilo con 0,1% de ácido acético (eluyente B). El gradiente empezó con 3% de B durante 7 min, aumentó de 3%-40% entre 7 y 45 min, y alcanzó el 100% de B a los 46 min, se mantuvo en esa proporción hasta el min 51 y luego descendió al 3% de B en 6 min para finalmente realizar un equilibrio de 13 min. El flujo fue fijado en 0,7 ml/min. La detección de compuestos fenólicos fue realizada con un detector de diodos UV-visible (Waters modelo 2696), a las longitudes de onda de los máximos de absorción correspondientes. La identificación de AF se basó en la comparación entre los estándares de ácido clorogénico (AC) y cafeico (ACa) y las muestras de los tiempos de retención y el espectro de absorción visible obtenido. La concentración de AC y ACa de las muestras fue calculada usando los estándares de la curva de AC con valores de 10 a 200 µg/ml y a los estándares de la curva obtenida por ACa que oscila entre 0,2 a 1,6 µg/ml, respectivamente. La determinación de AF en cada muestra fue realizada por triplicado y las concentraciones fueron expresadas en mg por 100 g PS.

### **Antocianinas Individuales**

La caracterización de antocianinas individuales se realizó a través de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS) y se llevó a cabo en el Instituto “Plant and Food Research” de Nueva Zelanda donde la doctoranda Gabriela Burgos tuvo la oportunidad de hacer una estancia de aprendizaje y entrenamiento de 1 mes en mayo del 2011.

En resumen el método consistió de lo siguiente: se pesó 0,05 g de papas liofilizadas y molidas y se extrajo con 10 ml de ácido acético al 15% usando agitación. Se repitió la extracción con 5ml de la misma disolución, se centrifugo el extracto de antocianinas a 10,000 rpm y se filtró a través de una membrana de 0,22 $\mu$ m. Se inyectó 5  $\mu$ l del extracto filtrado en un cromatógrafo líquido acoplado a un detector de masas (LC-MS). Los datos fueron adquiridos por masas parentales de m/z 150-2000 amu con MS3 y procesados con la ayuda del software Xcalibur®2.1. La separación se realizó usando una columna ThermaSphere TS-130 y una fase móvil que contenía 0,1% de ácido fórmico en agua (A) y 0,1% ácido fórmico en acetonitrilo (B) a 30°C con un flujo de 200  $\mu$ l/min, utilizando una gradiente que empezó a 100:0, proporción que fue mantenida hasta los 5 min, siguiendo hasta 50:50 a los 45 min, luego a 5:95 a los 50 min, manteniendo esta proporción constante hasta los 55 min, para luego cambiar a 100:0 a los 60 min, y finalmente equilibrar durante 10 minutos. La detección de antocianinas se realizó usando un detector de PDA y un detector de masas (API-MS) con ionización electro spray (ESI) en la forma positiva y negativa. El cromatógrafo estaba equipado con una bomba cuaternaria y un equipo para auto muestreo.

#### Materiales

Tubos de centrifuga Falcon (12 ml)

Columna ThermaSphere TS-130

Filtro (25mm) 0,2 $\mu$ m polipropileno

Probeta de 50ml

### Equipamiento

Centrífuga 5B10R (EPPENDORF) (ALEMANIA)

Equipo de cromatografía líquida (THERMO ELECTRON CORPORATION) (USA).

Inyector automático Thermo Accela Open (PAL HTC-xt con DLW)

Detector de PDA (THERMO FINNIGAN) (USA)

Detector de masas API-MS (LTQ, 2D linear ion-trap), (THERMO FINNIGAN) (USA)

Software Xcalibur®2.1 (Thermo Electron Corporation) (USA)

### Reactivos

Ácido acético al 15% (MERCK) (ALEMANIA)

Ácido fórmico (SIGMA-ALDRICH) (USA)

Acetonitrilo grado HPLC 99,9 % (MERCK) (ALEMANIA)

### **IV.2.3. Método para la digestión in vitro para evaluar la bioaccesibilidad de carotenoides y compuestos fenólicos**

La digestión de las muestras se realizó usando un modelo *in vitro* basado en los trabajos de Serrano et al. (2005) y Failla y Chitchumroonchokchai (2005).

### Materiales

Vaso de precipitado de vidrio 250ml, 100ml y 50ml

Vaso de precipitado de plástico 600ml y 50ml

Filtro PTFE 0,22um

Filtro (25mm) 0,2um polipropileno

Matraz aforado 25ml

Matraz de 1l y 250ml

Pipetor de 100 a 1000µl

Pipetor de 500 a 5000 $\mu$ l

Probeta de 50ml

Tubo de vidrio grueso de 100 ml y 45ml

#### Equipamiento

Agitador de 5 posiciones (IKA) (USA)

Balanza analítica AB-204 (METTLER - TOLEDO)

Baño María AL18 (LAUDA) (ALEMANIA)

Centrífuga 5810R (EPPENDORF) (ALEMANIA)

Columna cromatográfica C30 (YMC) (USA)

Detector de arreglo de diodos UV -visible (WATERS) (USA)

Equipo de HPLC 2695 (WATERS) (USA)

Estufa (Binder) (USA)

Lavador ultrasónico 5510 (Branson) (USA)

Potenciómetro (Hanna Instruments) (PORTUGAL)

#### Reactivos

$\alpha$ -amilasa Sigma A-3176 (SIGMA ALDRICH) (USA)

Ácido clorhídrico P.A 37% (MERCK) (ALEMANIA)

Acetona P.A, (MERCK) (ALEMANIA)

Buffer fosfato (MERCK) (ALEMANIA)

Cloruro de potasio (MERCK) (ALEMANIA)

Extracto de bilis porcina Sigma B-8631, (SIGMA) (USA)

Pepsina Sigma P-7012, (SIGMA) (USA)

Pancreatina Sigma L-3126, (SIGMA) (USA)

Procedimiento:

Se hidrató 500 mg de muestra liofilizada y molida de papa con 5 ml de agua destilada, se incubó con 1 ml de  $\alpha$ -amilasa (30 mg/ml tampón fosfato, 0,1 M, pH 6,9) a 37°C durante 10 min (para simular la fase salival). Luego, se llevó a pH 2 y se incubó con 0.4 ml de pepsina (300 mg/ml HCl-KCl, 0,2 M, pH 2,0) a 37°C durante 1 hora (simulando la fase gástrica) y después se llevó a pH 7 y se incubó con 1,5 ml de pancreatina (5 mg/ml tampón fosfato, 0,1 M, pH 7,5) y 3,0 ml de extracto biliar porcino (17,5 mg/ml fosfato, 0,1 M, pH 7,0) a 37°C durante 2 horas (fase duodenal). Luego, se centrifugaron las muestras digeridas a 3000 x g durante 10 min, se recolectaron los sobrenadantes (fase micelar) y se filtró a través de un filtro de polipropileno de 0,2  $\mu$ m.

Para la evaluación de la estabilidad y bioaccesibilidad de carotenoides se realizó el análisis de carotenoides en la muestra después de la fase gástrica, la fase duodenal y micelar (sobrenadante filtrado). Para ese propósito, se agregó acetona a la mezcla obtenida después de las fases gástrica y duodenal y al sobrenadante filtrado, se realizó la transferencia a éter de petróleo, y se procedió como se describió anteriormente para las muestras sin digerir.

En el caso de la evaluación de la bioaccesibilidad de AT, 2,5 ml del sobrenadante filtrado fue enrasado a 25 ml con la disolución extractante usada para el análisis de antocianinas totales y fue analizado de la misma manera que para las muestras sin digerir.

En el caso de la evaluación de la bioaccesibilidad del AC, 2,5 ml del sobrenadante filtrado fue enrasado a 5 ml con agua destilada para luego inyectar 25  $\mu$ l de esta disolución en el HPLC bajo las mismas condiciones que las muestras sin digerir.

### **IV.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las pruebas estadísticas se realizaron usando el software<sup>17</sup> SAS/STAT (versión 9.1) (De Mendiburu, 2010) y R (R Development Core Team, 2011).

Para evaluar el efecto de la cocción sobre la concentración de carotenoides en los siete cultivares de pulpa amarilla, se realizó un análisis de varianza ANOVA bajo un diseño de bloques completamente al azar con tres repeticiones. Se consideraron tres factores: año de cosecha, cultivar y tratamiento (crudo o cocido). El año de cosecha fue considerado como factor al azar mientras que el cultivar y el tratamiento como factores fijos. El factor cultivar se consideró anidado dentro del factor año de cosecha. Las medias se compararon mediante efectos simples. En el caso de la anteraxantina y zeaxantina que no presentaron una distribución estadística normal, se aplicó la prueba no paramétrica de Friedman para cada accesión.

Los efectos del solvente y el tiempo de sonicación en la extracción de FT, AT, AC y AA de muestras crudas y cocidas proveniente de los cultivares con pulpa morada fueron analizados mediante ANOVA, bajo un diseño completamente aleatorizado con 3 repeticiones, considerando a los cultivares, tratamiento (crudo o cocido), concentración o tipo de solvente y el tiempo de sonicación como factores. La comparación de medias se realizó mediante efectos simples.

Para evaluar el efecto de la cocción en la concentración de FT, AT, AC y AA en los cuatro cultivares de pulpa morada, se realizó un análisis de varianza ANOVA bajo un diseño completamente aleatorizado con 3 repeticiones, considerando los cultivares y los tratamiento (crudo o cocido) como factores. La comparación de medias se realizó mediante efectos simples.

Los efectos de la fase gástrica, duodenal y micelar en la concentración de luteína y zeaxantina de los siete cultivares andinos de

pulpa amarilla se realizó un ANOVA bajo un diseño de bloques completamente al azar con tres repeticiones. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey.

Para evaluar la variabilidad de FT, AT, AC y AA en los 18 cultivares andinos analizados se realizó un ANOVA bajo un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey.

Las correlaciones entre AA y FT, AT, AC se analizaron mediante la prueba de Pearson.

Los efectos de la digestión in vitro sobre la concentración de AC y AT fueron analizados mediante ANOVA bajo un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones, considerando los cultivares y el tratamiento (antes o después de la digestión in vitro) como factores. La comparación de medias se hizo utilizando una prueba t.

## **V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Este capítulo se ha dividido en cuatro partes. En las tres primeras partes se presentan y discuten los resultados correspondientes a los tres trabajos que han sido publicados. En la cuarta parte se presentan y discuten los resultados de un manuscrito que ha sido enviado para su publicación a la revista “Journal of Agriculture and Food Chemistry”.

- Efecto de la cocción en la concentración de carotenoides de papas nativas Andinas
- Efecto de la cocción en la concentración de fenoles totales, antocianinas totales y ácidos fenólicos y actividad antioxidante en papas de pulpa morada
- Bioaccesibilidad In vitro de luteína y zeaxantina en papas cocidas de pulpa amarilla
- ✓ Concentración y bioaccesibilidad del ácido clorogénico y antocianinas de papas moradas y rojas cocidas.

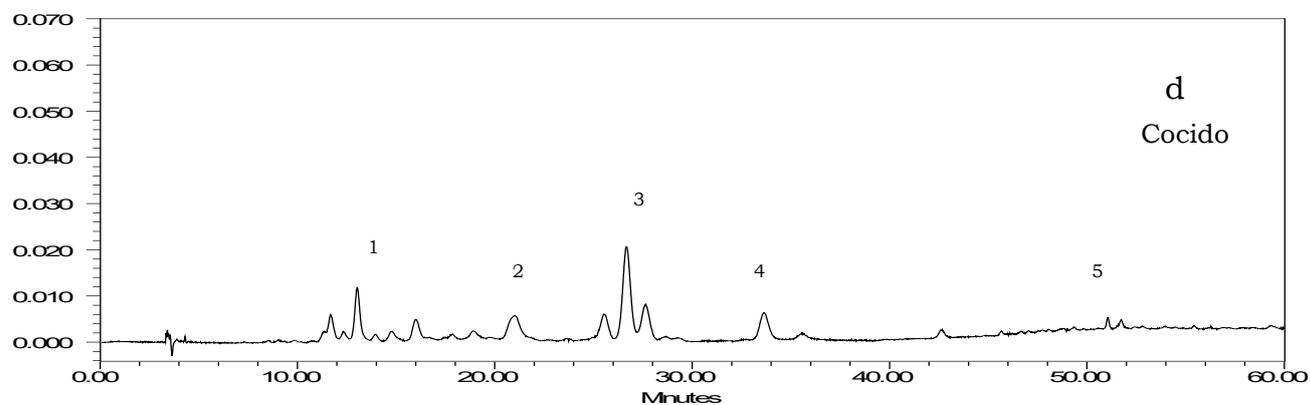
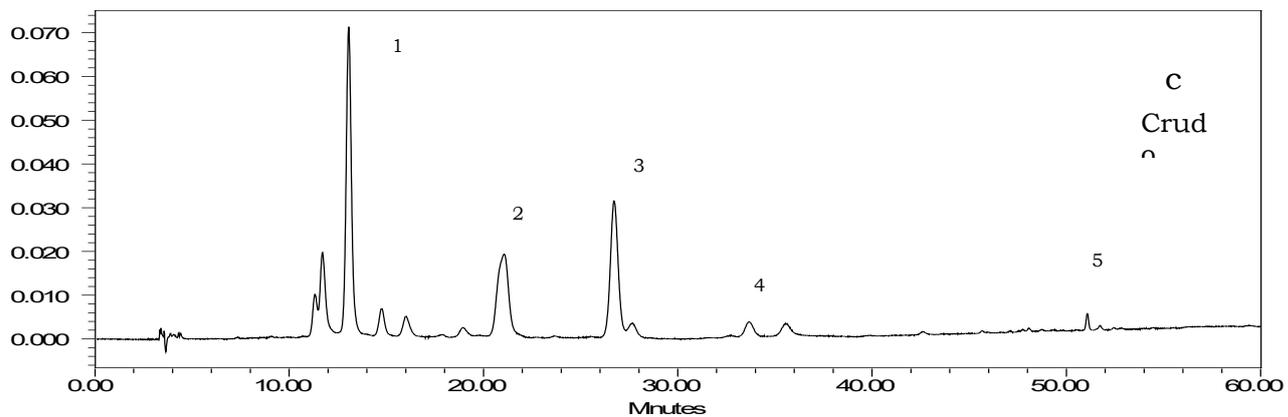
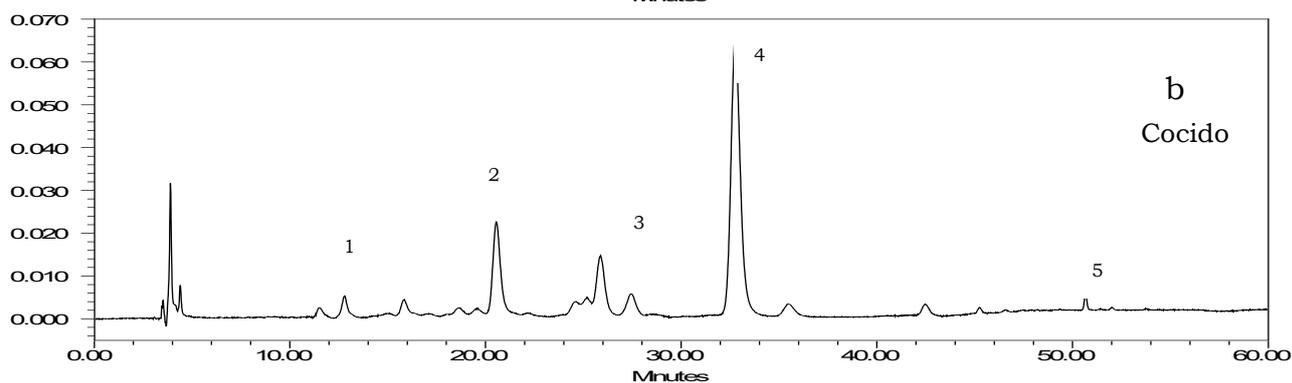
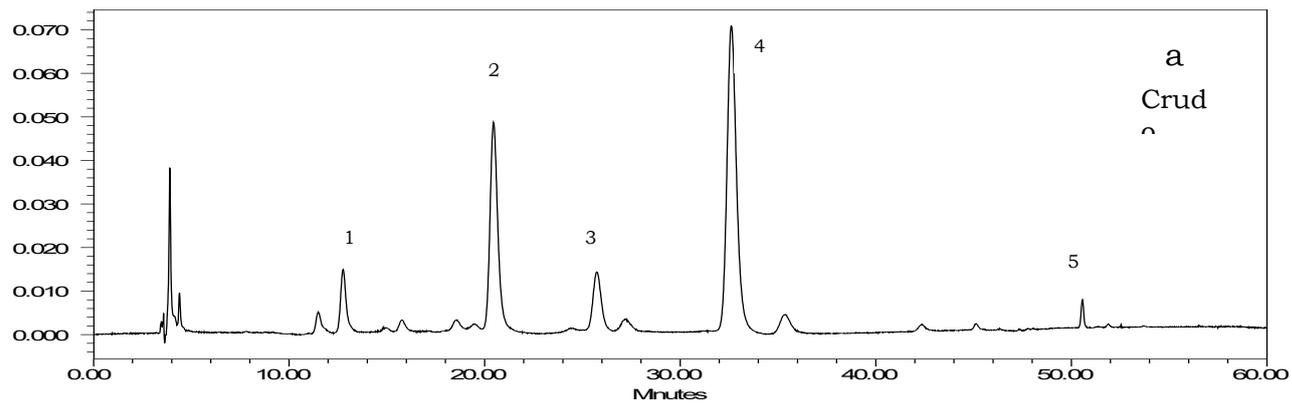
## **V.1. EFECTO DE LA COCCIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE CAROTENOIDES DE PAPAS NATIVAS ANDINAS**

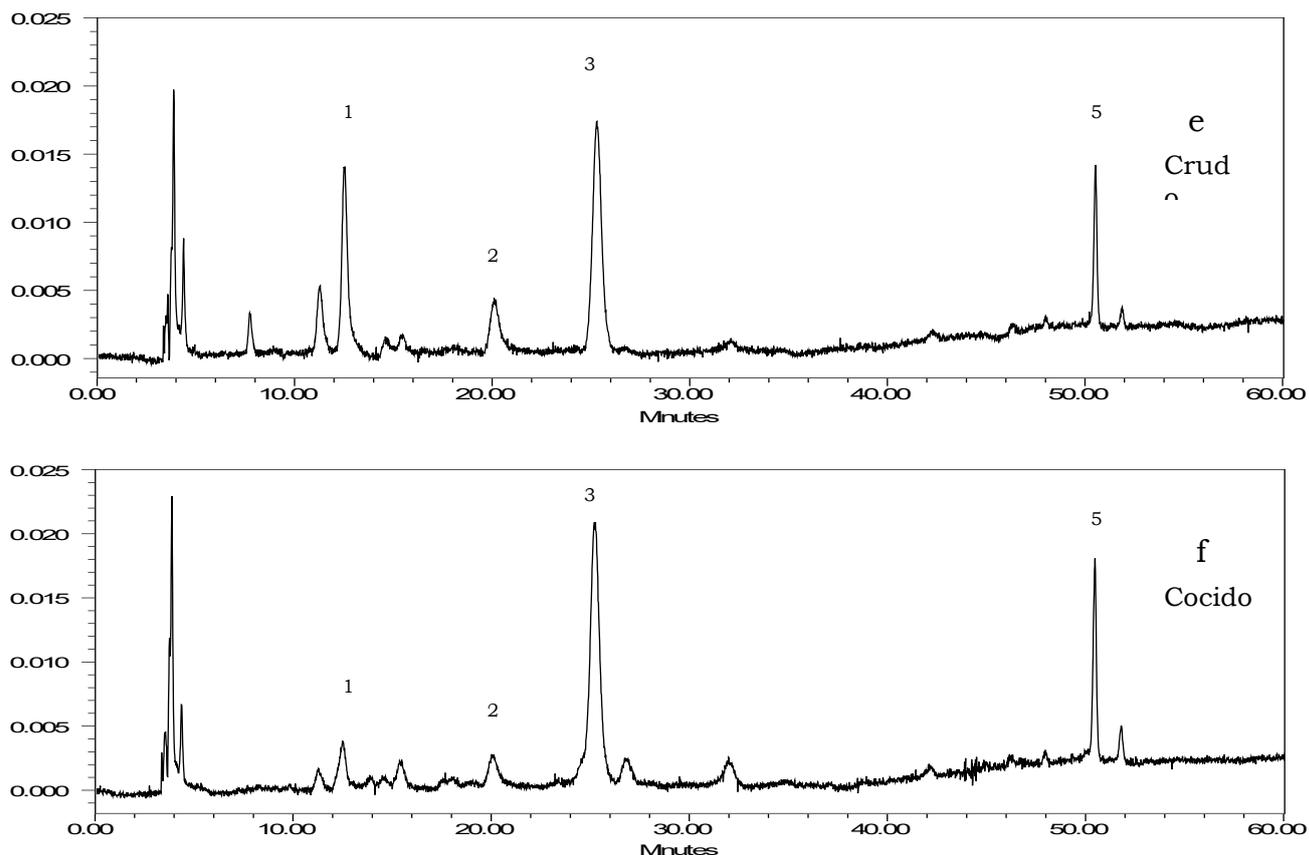
### **V.1.1 Efecto de la cocción por hervido en la concentración total e individual de carotenoides**

En la Figura. V.1.a-f se muestran los cromatogramas típicos de tubérculos crudos y cocidos en cultivares andinos de pulpa color amarillo claro, intermedio y oscuro. Los picos de violaxantina y anteraxantina que son prominentes en los cultivares de pulpa color amarillo claro e intermedio, casi desaparecen en los cromatogramas de los mismos cultivares cuando son analizadas después de la cocción. Asimismo, el pico de anteraxantina, que también es prominente en los cultivares de pulpa color amarillo oscuro, se reduce después de la cocción. Los cromatogramas de las muestras cocidas de los cultivares andinos con pulpa color amarillo intermedio y oscuro, mostraron dos nuevos picos a tiempos de retención cercanos a la luteína. Burmeister et al. (2011) mostró que violaxantina, luteína y un carotenoide no identificado eran los carotenoides principales de cuatro variedades de papa; indicando además que el proceso térmico puede modificar los carotenoides trans a 9-cis o 13-cis o degradarlos. En este estudio, tal y como se aprecia en los cromatogramas, la zeaxantina no es afectada por la cocción e incluso es el carotenoide predominante en los cultivares de pulpa color amarillo oscuro.

Las concentraciones de carotenoides totales, violaxantina, luteína y  $\beta$ -caroteno, fueron afectados por la interacción cocción y cultivar; lo que significa que el efecto de la cocción sobre las concentraciones de estos carotenoides varía en función del cultivar. La prueba Friedman mostró que las concentraciones de anteraxantina y zeaxantina en algunos cultivares andinos fueron significativamente diferentes entre los tubérculos crudos y tubérculos cocidos.

#### IV. Resultados y Discusión





**Figura V.1.** Cromatogramas típicos en muestras provenientes del tubérculo crudo y cocido de cultivares andinos de papa con pulpa color amarillo oscuro (1 y b); pulpa color amarillo intermedio (c y d) y pulpa color amarillo claro (e y f). (1) violaxantina, (2) anteraxantina, (3) luteína, (4) zeaxantina y (5)  $\beta$ -caroteno.

Para 5 de los 7 cultivares usados en este estudio, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de carotenoides totales de tubérculos crudos y cocidos. Sin embargo, se encontraron reducciones significativas de la concentración de carotenoides totales en dos cultivares (701862 y 705799) después de la cocción ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ , respectivamente) (Figura V.2). La concentración de carotenoides totales en tubérculos crudos varió de 1233 a 7563  $\mu\text{g}/100\text{g PS}$ , mientras que la de los tubérculos cocidos de 1460 a 7648  $\mu\text{g}/100\text{g PS}$ . Como se muestra en un estudio previo (Burgos et al. 2009), las concentraciones de

carotenoides totales de los cultivares andinos crudos de pulpa amarillo oscuro eran mayores que la de los cultivares de pulpa amarillo intermedio, y éstas a su vez, mayores que la de los cultivares de pulpa amarillo claro (Figura V.2). El cultivar de pulpa amarillo oscuro, 704218, presentó la concentración más alta de carotenoides totales en tubérculos crudos y cocidos. Estos niveles son similares a la concentración más alta encontrada por Burgos et al. (2009) en papas del grupo Phureja crudas (7360  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , PS) y mayor que el valor más alto indicado previamente por André et al. (2007) en papas Andinas crudas (5477  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , PS), por Griffiths et al. (2007) en papas crudas del grupo Phureja (4087  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , PS, considerando 30% de materia seca) y por Lu et al. (2001) en clones de pulpa amarilla provenientes de cruces de Phureja y Stenotomum (4783  $\mu\text{g}/100\text{g}$  PS, considerando 30% de materia seca).

Los siete cultivares analizados mostraron reducciones significativas de las concentraciones de violaxantina ( $p<0,01$ ) y anteraxantina ( $p<0,05$ ) después de la cocción (Figura V.3) con porcentajes de retención entre 0% a 17% y de 0% a 54% respectivamente. Similarmente, estudios previos han mostrado que los carotenoides epóxido de mango, camote de pulpa blanca, tomates y varios vegetales verdes son muy susceptibles a la mayoría de condiciones utilizadas en la elaboración culinaria de alimentos (Gody y Rodríguez-Amaya, 1987; Almeida y Panteado, 1998; Khachick et al., 1992).

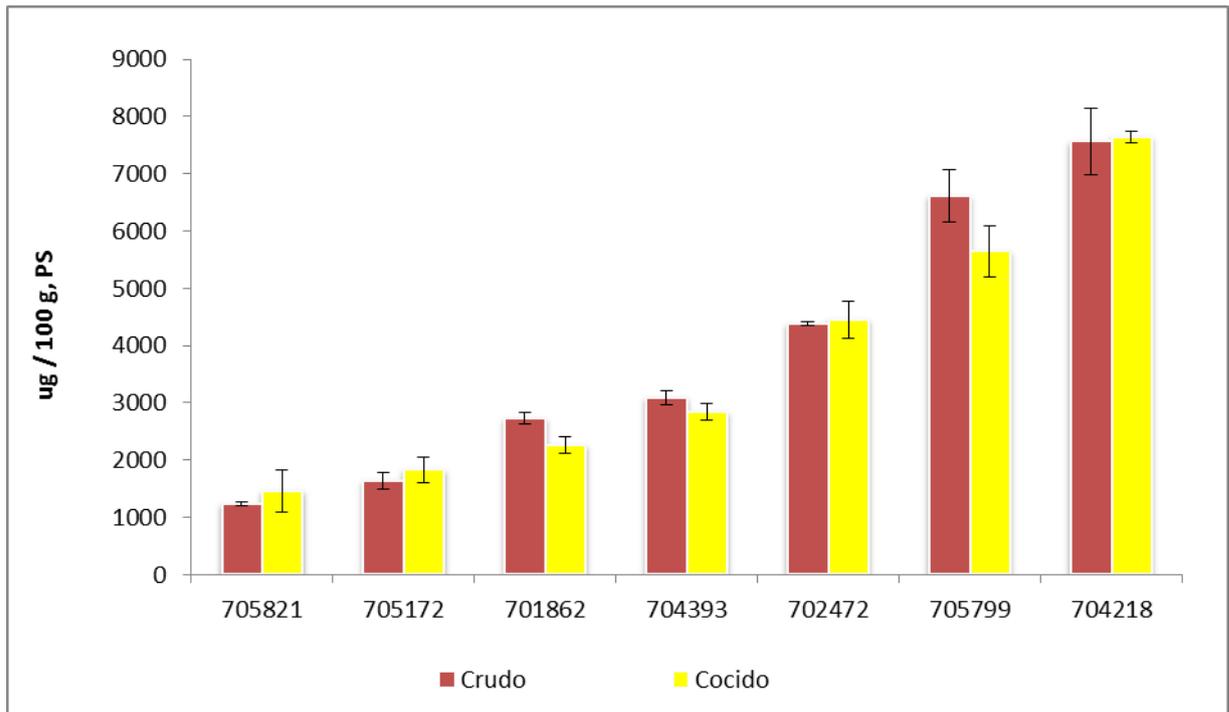


Figura V.2. Concentración de carotenoides totales en papas crudas y cocidas en los siete cultivares andinos estudiados.

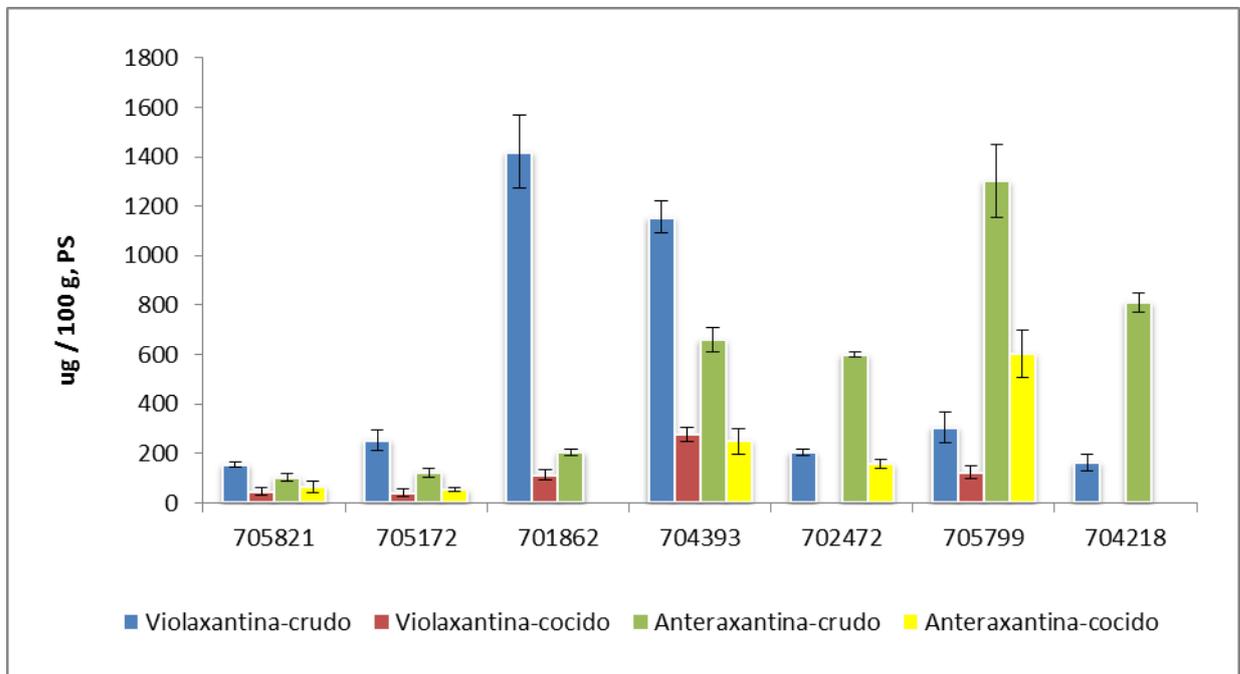


Figura V.3. Concentración de violaxantina y antheraxantina en papas crudas y cocidas de los siete cultivares andinos.

La concentración de luteína no mostró diferencias significativas en cinco de los siete cultivares entre tubérculos crudos y cocidos. Sin embargo, la accesión 701862 tenía una concentración más alta de luteína antes de la cocción ( $p < 0,01$ ), y la accesión 705172, una mayor concentración de luteína después de la cocción ( $p < 0,01$ ) (Figura V.4). En cuanto a la zeaxantina, tres de los siete cultivares no presentaron diferencias significativas en las concentraciones medias obtenidas entre tubérculos crudos y cocidos. Sin embargo, los cultivares 702472 y 705799 tenían mayor concentración de zeaxantina antes de la cocción ( $p < 0,05$ ), y los cultivares 701862 y 704393, mayores concentraciones después de la cocción. ( $p < 0,05$ ) (Figura V.4).

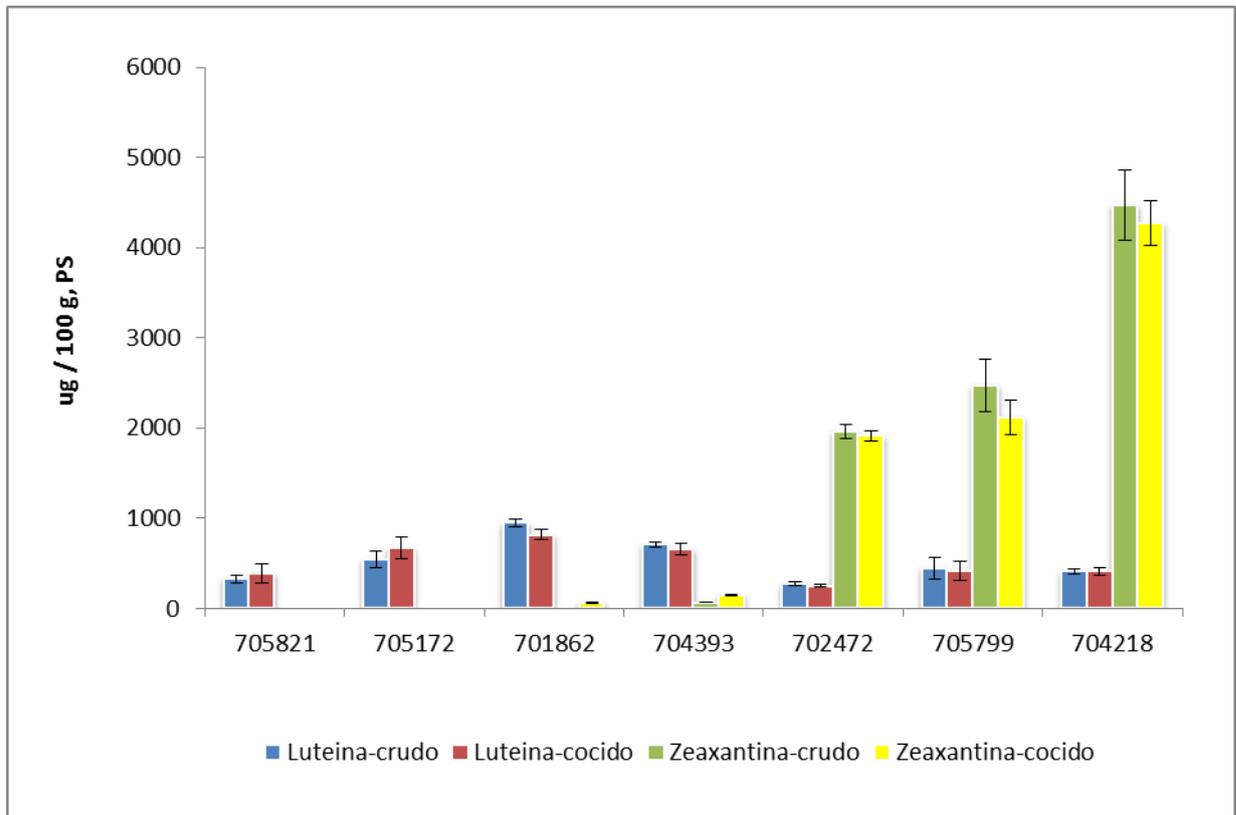


Figura V.4. Concentraciones de luteína y zeaxantina en papas crudas y cocidas en los siete cultivares andinos estudiados.

La reducción de la concentración de luteína y zeaxantina después de la cocción se explica fácilmente por el hecho de que los carotenoides son degradados durante la cocción. Sin embargo, el incremento de estas concentraciones después de la cocción es difícil de explicar. Un estudio reciente que evaluó el efecto de la cocción sobre la concentración individual de carotenoide en tres variedades, solo detectó y cuantificó luteína en las muestras y afirmó que la luteína no fue afectada por la cocción (Blessington et al., 2010). Un estudio previo señaló que las concentraciones de luteína y zeaxantina de las papas de pulpa amarilla eran mayores después de cocer al vapor y en microondas, sugiriendo que la cocción altera la estructura celular liberando estos componentes (Clevidence et al., 2005). Otro estudio que evaluó diferentes tipos de cocción en vegetales, concluyó que la cocción al vapor (3-5 min), microondas (1,5-5 min) y por hervido (9 min) no tuvo efecto en la concentración de luteína, y que en muchos casos los carotenoides son más disponibles después de la cocción debido a la liberación de carotenoides desde el interior de las células (Clevidence et al., 2000; Khachick et al., 1992).

La concentración de luteína en los tubérculos crudos oscila entre 327 y 950  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , PS, y la de los tubérculos cocidos, entre 389 y 950  $\mu\text{g}/100\text{g}$  PS, siendo el cultivar 701862 de pulpa color amarillo intermedio el que mostró la concentración más alta de luteína (sobre los 800  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  PS). Sin embargo, este valor es menor a la concentración más alta obtenida por Lu et al., 2001 (1770  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , PS), André et al., 2007 (1769  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , PS) y Griffiths et al., 2007 (1420  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , PS).

La concentración de zeaxantina osciló desde niveles traza hasta más de 4000  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , PS, tanto en tubérculos crudos como cocidos; siendo el cultivar 704218 de pulpa amarillo oscuro el que mostró la concentración mayor. Los otros dos cultivares de pulpa amarillo oscuro, 702472 y 705799, tenían concentraciones en torno a los 1900  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , PS. El cultivar 704218 tenía una concentración de zeaxantina incluso más alta

que las concentraciones mayores previamente publicadas por André et al., 2007 (1700  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , PS), Lu et al., 2001 (180  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , PS) y Griffiths et al., 2007 (2385  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , PS).

Con respecto al  $\beta$ -caroteno, los dos cultivares de pulpa amarillo claro tenían mayor concentración en los tubérculos cocidos que en los crudos, y los cultivares de pulpa amarillo intermedio y oscuro redujeron sus concentraciones de  $\beta$ -caroteno después de la cocción. La concentración de  $\beta$ -caroteno en tubérculos crudos y cocidos varía entre 0 y valores superiores a 120  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  PS; en ambos tratamientos. André et al., 2007 encontraron un rango de  $\beta$ -caroteno entre 42 y 219  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  PS.

#### **V.1.2. Concentración de luteína y zeaxantina expresada en peso fresco (PF) en papas cocidas**

Se ha sugerido que una mayor ingesta de luteína y zeaxantina, los pigmentos principales de la mácula de la retina humana, está relacionada con un descenso del riesgo de sufrir cataratas y degeneración macular por la edad (Rao y Rao, 2007; Landrum y Bone, 2001). Por ello, en la actualidad, se está tratando de identificar fuentes dietéticas con estos carotenoides.

La Tabla V.1 muestra la concentración de carotenoides totales e individuales, expresada en base al peso fresco (PF), en tubérculos cocidos de los cultivares evaluados en este estudio. El cultivar de pulpa amarillo intermedio, 701862, tenía la concentración mayor de luteína (253  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ); mientras que el cultivar de pulpa amarillo oscuro, 704218, la más alta de zeaxantina (1012  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ).

El consumo de 100 g de papas hervidas pertenecientes al cultivar con la concentración más alta de luteína encontrada en este estudio aportaría una menor cantidad de luteína que la obtenida de la misma

cantidad de otros alimentos tales como la lechuga (1540  $\mu\text{g}$ ; Kimura y Rodriguez-Amaya, 2003), brócoli (3250  $\mu\text{g}$ ; Khachick et al. 1992), perejil (5800  $\mu\text{g}$ ; Hart y Scott, 1995) o espinaca (4180  $\mu\text{g}$ ; Tee y Lim, 1991). Del mismo modo, 100 g de papas hervidas pertenecientes al cultivar con la concentración mayor de zeaxantina encontrada en este estudio, representaría una ingesta de zeaxantina menor que la obtenida a partir de la misma cantidad de maíz con la mayor concentración de zeaxantina (3800  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) (Brenna y Berardo, 2004) y de pimentón rojo (2200  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) (Muller, 1997; Minguez-Mosquera y Hornero-Mendez, 1994). Sin embargo, en zonas donde la papa es un cultivo básico en las que su consumo suele superar los 500 g al día para el caso de las mujeres en edad fértil, el aporte de carotenoides provenientes de papa a la ingesta puede ser significativamente mayor.

Asimismo es importante considerar la biodisponibilidad de los carotenoides, la cual está influenciada por numerosos factores entre los cuales se incluyen: la estructura del carotenoide presente en el alimento, la composición y liberación del carotenoide desde la fuente alimenticia, absorción en el tracto intestinal, transporte dentro de las lipoproteínas sanguíneas y conversiones bioquímicas, además del estado nutricional del consumidor (Kospell y Kospell, 2006; Clevidence et al., 2000). En tal sentido, se requiere investigar sobre la biodisponibilidad de los carotenoides en la papa para tener una información más útil y completa sobre las recomendaciones dietéticas adecuadas de estos compuestos.

**Tabla V.1.** Concentración total e individual de carotenoides<sup>1</sup> ( $\mu\text{g}/100\text{g}$  PF) en papas crudas y cocidas de los siete cultivares andinos estudiados.

Carotenoides	Tratamiento	Número CIP						
		705821	705172	704393	701862	702472	705799	704218
Violaxantina	Crudo	38 $\pm$ 5	57 $\pm$ 5	294 $\pm$ 19	432 $\pm$ 30	59 $\pm$ 5	72 $\pm$ 10	38 $\pm$ 8
	Cocido	11 $\pm$ 4	10 $\pm$ 4	78 $\pm$ 10	36 $\pm$ 7	n.d.	34 $\pm$ 7	n.d.
Anteraxantina	Crudo	25 $\pm$ 3	28 $\pm$ 2	168 $\pm$ 14	63 $\pm$ 8	172 $\pm$ 7	310 $\pm$ 17	190 $\pm$ 4
	Cocido	16 $\pm$ 4	12 $\pm$ 1	71 $\pm$ 15	n.d.	45 $\pm$ 4	163 $\pm$ 23	n.d.
Luteina	Crudo	81 $\pm$ 8	123 $\pm$ 11	180 $\pm$ 10	290 $\pm$ 22	77 $\pm$ 5	105 $\pm$ 21	96 $\pm$ 6
	Cocido	95 $\pm$ 19	155 $\pm$ 10	185 $\pm$ 14	253 $\pm$ 5	73 $\pm$ 6	113 $\pm$ 23	96 $\pm$ 8
Zeaxantina	Crudo	n.d.	n.d.	17 $\pm$ 1	n.d.	562 $\pm$ 16	588 $\pm$ 32	1048 $\pm$ 61
	Cocido	n.d.	n.d.	41 $\pm$ 3	21 $\pm$ 1	555 $\pm$ 13	571 $\pm$ 33	1013 $\pm$ 55
$\beta$ -caroteno	Crudo	20 $\pm$ 2	27 $\pm$ 4	7,4 $\pm$ 0,3	12 $\pm$ 2	7,3 $\pm$ 0,9	15 $\pm$ 2	n.d.
	Cocido	26 $\pm$ 3	32 $\pm$ 3	n.d.	9,2 $\pm$ 0,6	n.d.	10 $\pm$ 2	n.d.
Carotenoides totales	Crudo	305 $\pm$ 12	373 $\pm$ 9	787 $\pm$ 37	833 $\pm$ 32	1259 $\pm$ 42	1578 $\pm$ 27	1773 $\pm$ 93
	Cocido	358 $\pm$ 77	422 $\pm$ 4	801 $\pm$ 36	702 $\pm$ 8	1290 $\pm$ 62	1524 $\pm$ 58	1813 $\pm$ 77

<sup>1</sup>Valores medios  $\pm$  desviación estándar (n = 3)

A pesar de la gran cantidad de investigaciones que relacionan un mayor consumo de alimentos con carotenoides, con la reducción del riesgo a sufrir enfermedades crónicas, hasta la fecha no se han establecido niveles adecuados de la ingesta de luteína y zeaxantina en la dieta. Esto puede ser debido a que aún no se conoce si los beneficios para la salud, asociados a los alimentos que contienen carotenoides, se deben a los carotenoides o a otra u otras sustancias presentes en ellos. Sin embargo, el “Institute of Medicine of the National Academy of Sciences” apoya las recomendaciones de varias organizaciones de la salud, en las que se ha propuesto el consumo de cinco o más porciones de frutas y vegetales cada día para mantener un buen estado de salud (IOM, 2000). Las papas de pulpa amarilla podrían ser recomendadas como una fuente de luteína y zeaxantina.

## **V.2. EFECTO DE LA COCCIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES, ANTOCIANINAS TOTALES Y ÁCIDOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PAPAS DE PULPA MORADA**

### **V.2.1. Optimización de las condiciones de extracción de FT, AT y AA en muestras coloreadas.**

La composición del disolución extractante y el tiempo de extracción son parámetros que tienen un gran impacto en la determinación final de la cantidad de antioxidantes (Pellegrini et al., 2007; Michiels et al., 2012).

Las condiciones de extracción de los métodos usados para análisis de FT, AT y evaluación de la AA en este estudio fueron optimizadas para su aplicación a muestras liofilizadas y molidas provenientes de tubérculos crudos y cocidos con pulpa coloreada.

En lugar del uso de calor y agitación para extraer los diferentes compuestos fenólicos de la papa, se planteó la sonicación como método alternativo y efectivo. La sonicación ofrece un efecto mecánico, el cual permite una mayor penetración del solvente dentro de la muestra, aumentando la superficie de contacto entre la fase sólida y líquida; lo que permite la difusión rápida del soluto desde la fase sólida al solvente (Rostagno et al., 2003).

#### Optimización de las condiciones de extracción de FT

Waterhouse (2002) indica que el uso de metanol al 80% y sonicación son las condiciones más recomendadas para la extracción de fenólicos a partir de material vegetal liofilizado y molido. En este estudio como parte de la optimización del método de extracción de FT se probaron diferentes concentraciones de la disolución extractante, los tiempos de sonicación y

el número de extracciones necesarias para obtener una extracción eficiente.

Se extrajeron los FT en muestras liofilizadas y molidas de papa cruda y cocida, pertenecientes a cuatro cultivares andinos, usando disoluciones de metanol con concentraciones entre 60 y 100% y ajustando el tiempo de sonicación a 30 min. El efecto de la concentración de metanol fue diferente dependiendo de la accesión considerada, pero, en general, las concentraciones de FT determinadas en muestras crudas fueron mayores ( $p < 0,001$ ) cuando las muestras que eran extraídas con metanol al 80 o 90%, mientras que las concentraciones determinadas en muestras cocidas fueron mayores ( $p < 0,001$ ) cuando se extrajo con metanol al 60% (Figura V.5). Este resultado sugiere que la extracción de FT en muestras cocidas se facilita debido a la mayor proporción de agua en la disolución de extracción. Es probable que el tratamiento culinario produzca modificaciones en los FT, como por ejemplo cambios de su solubilidad, la cual influye sobre la eficiencia de la extracción con diferentes disoluciones.

Se evaluaron diferentes tiempos de sonicación comprendidos entre 5 y 30 min, usando MeOH al 80% y 60% para la extracción de FT en muestras crudas y cocidas, respectivamente. Se encontró que 5 min eran suficientes para extraer eficientemente los FT de ambos tipos de muestra de papa (cruda y cocida). Con objeto de asegurar una extracción máxima, en el método optimizado se consideró un tiempo de sonicación de 10 min para cada cultivar.

Al evaluar el número de extracciones mínimas necesarias para obtener la máxima extracción de FT, se encontró que no había incremento de la concentración de FT determinados después de una segunda extracción, y por tanto, se concluyó que dos extracciones eran suficientes para la extracción de FT.

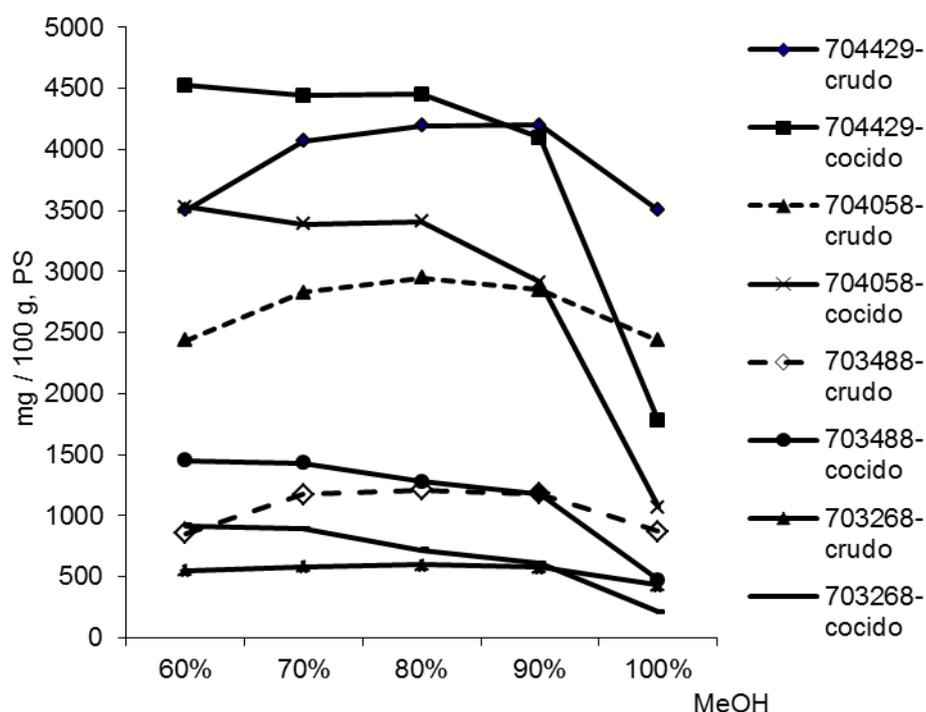


Figura V.5. Efecto de la concentración de metanol (MeOH) sobre la extracción de compuestos fenólicos totales de muestras liofilizadas provenientes de tubérculos crudos y cocidos.

#### Optimización de las condiciones de extracción del método de AT

Los métodos convencionales para extraer antocianinas usan un solvente orgánico acidificado, el cual generalmente es etanol o metanol (Dai y Mumper, 2010). Análogamente a los FT, se probaron diferentes mezclas del solvente y diferentes tiempos de sonicación con objeto de seleccionar las condiciones más adecuadas para la extracción de AT.

Se extrajeron las AT de muestras liofilizadas y molidas de papa cruda y cocida de cuatro cultivares andinos usando las siguientes mezclas de disolventes: EtOH: 1,0 M HCl (75:25) como lo describe Jansen y Flamme (2006), EtOH : 1,0 M HCl (80:20) y EtOH : 1,5 M HCl (75:25) y EtOH : 1,0 M HCl (80:20), fijando el tiempo de sonificado a 30 min. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de AT determinadas con

diferentes disoluciones de extracción (Figura V.6), lo cual sugiere que cualquiera de las disoluciones probadas podría ser utilizada para extraer AT tanto en muestras de papas crudas como cocidas.

Se evaluaron 4 tiempos de sonicado (30, 20, 10 y 5 min) usando EtOH: 1,0 M HCl (75:25) para la extracción de AT en muestras cocidas y crudas de los cuatro cultivares. Se encontró que 5 min de sonicación eran suficientes para obtener la máxima extracción de las AT en todas las muestras de papa estudiadas.

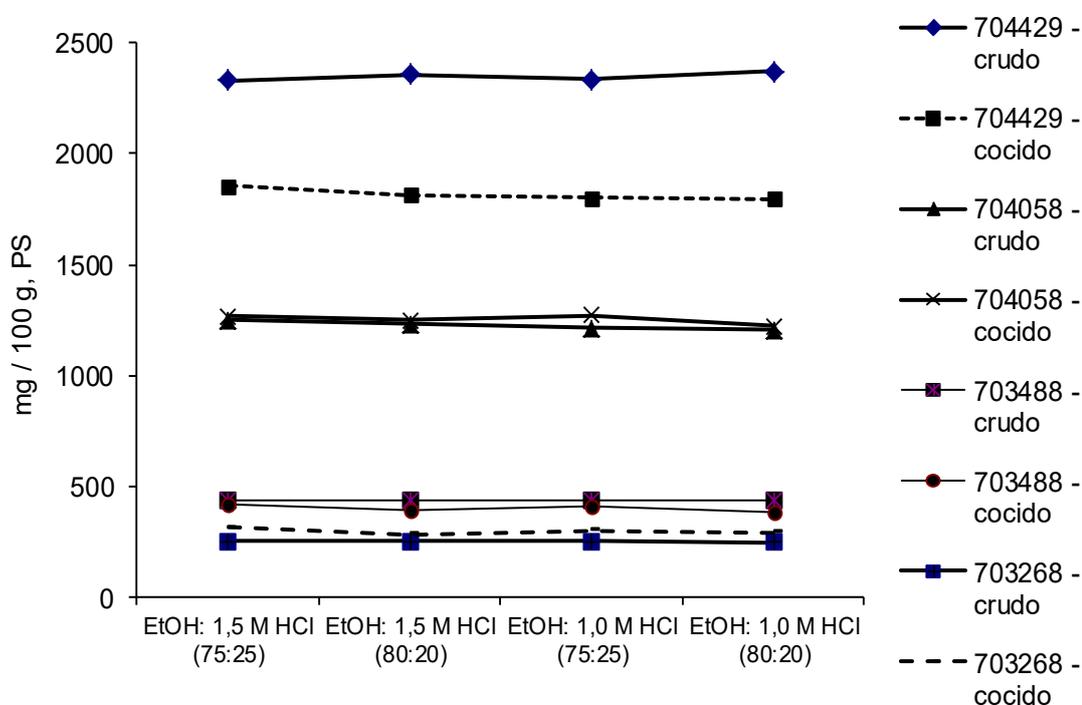


Figura V.6. Efecto de la disolución extractante en la extracción de antocianinas totales de muestras liofilizadas provenientes de tubérculos crudos y cocidos.

#### Optimización de las condiciones de extracción para la evaluación de la actividad antioxidante

Se extrajo los antioxidantes en las muestras liofilizadas y molidas provenientes de tubérculos crudos y cocidos de 4 cultivares andinos

usando metanol al 60%, 70%, 80%, 90% y 100%, y ajustando el tiempo de sonicación a 30 min.

En general, la AA determinada mediante los métodos ABTS y DPPH en las muestras crudas y cocidas de los 4 cultivares eran mayores ( $p < 0,001$ ) cuando las muestras fueron extraídas con metanol al 80%, mientras que las AA determinadas en muestras cocidas fueron mayores ( $p < 0,001$ ) cuando se extrajo con metanol al 60% (Figura V.7 y V.8). Como se indicó anteriormente para los FT, la extracción de los compuestos fenólicos antioxidantes en muestras cocidas se favorece por una proporción mayor de agua en la disolución de extracción.

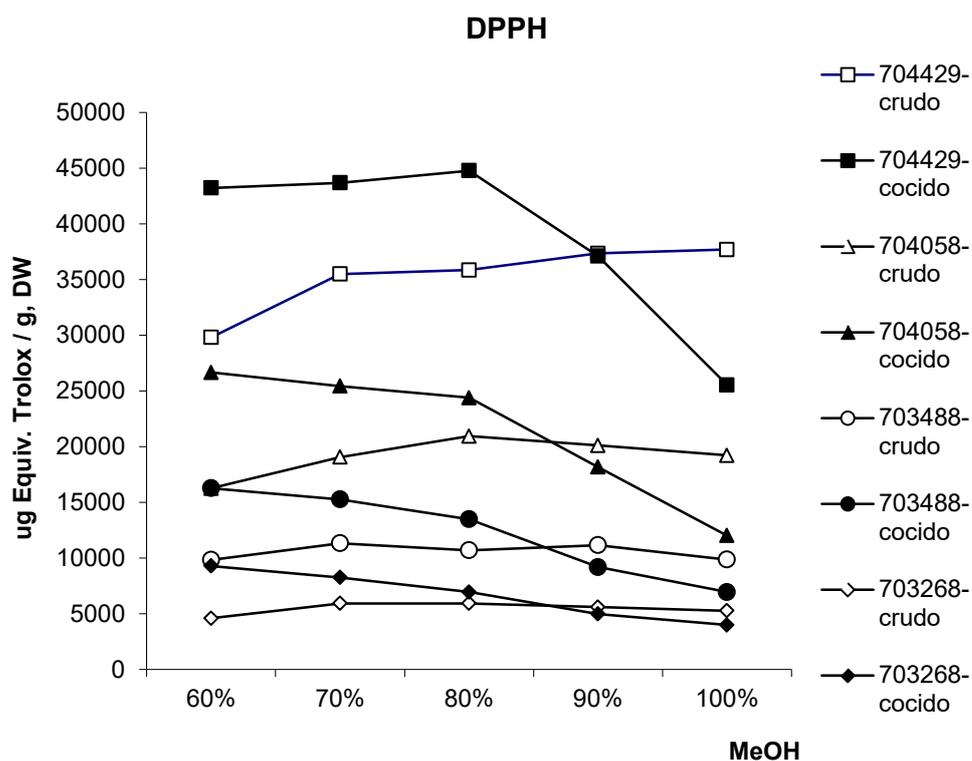


Figura V.7. Efecto de la concentración de metanol (MeOH) en la actividad antioxidante de muestras liofilizadas crudas y cocidas evaluadas por el método de DPPH

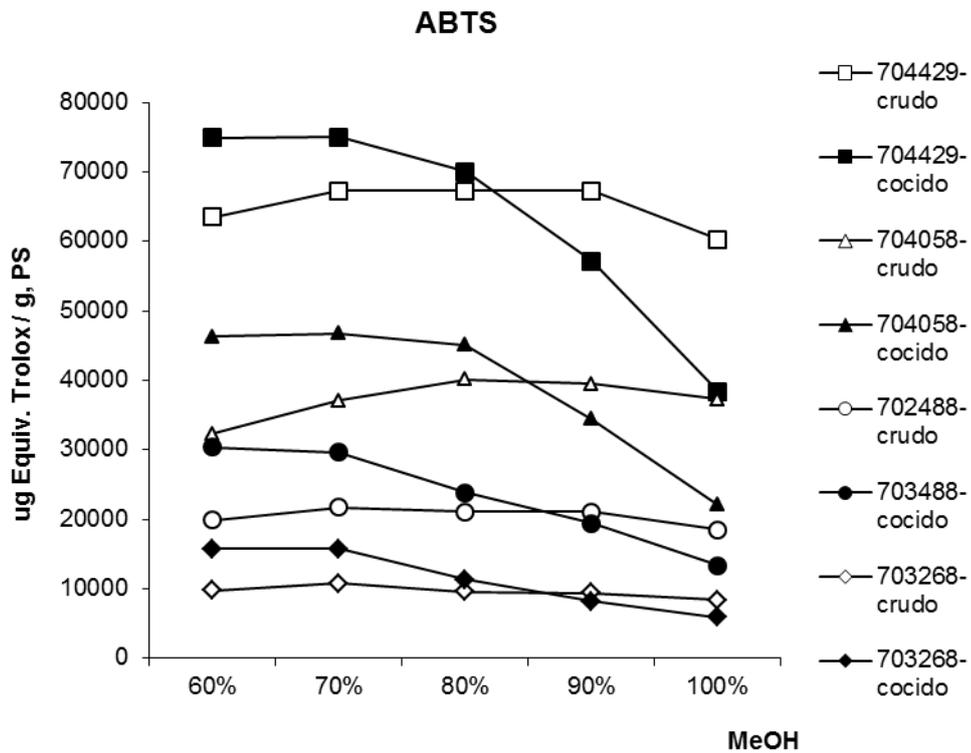


Figura V.8. Efecto de la concentración de metanol (MeOH) en la actividad antioxidante de muestras liofilizadas crudas y cocidas evaluadas por el método de ABTS

### V.2.2 Efecto de la cocción por hervido sobre la concentración de FT, AT y AF en papas de pulpa morada

La Figura V.9 muestra los cromatogramas de papas crudas (a-d, parte superior) y cocidas (e-f, parte inferior) de los cuatro cultivares andinos considerados. El AC fue el ácido fenólico predominante tanto en papas crudas como cocidas. El ácido cafeico (ACa), se observó en todas las muestras de papa cruda; sin embargo, no fue encontrado en las muestras cocidas de los cultivares 703268, 704058 o 704429, y en el caso del cultivar 703488, disminuyó drásticamente.

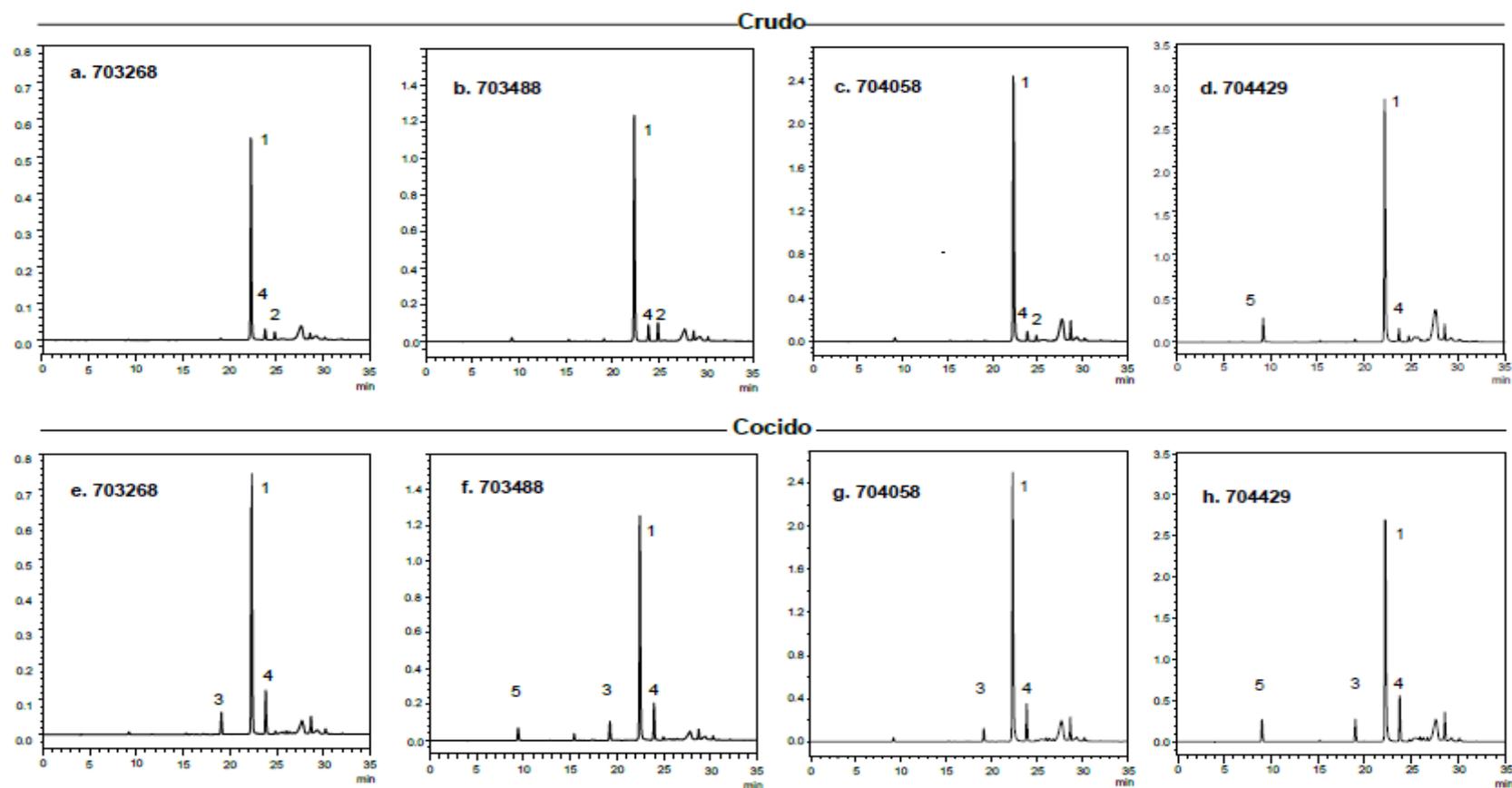


Figura V.9. Cromatogramas en papas con pulpa morada crudas (a-d) y cocidas (e-h) de cuatro cultivares andinos estudiados. 1: 5-O-ácido cafeoilquinico o ácido clorogénico, 2: ácido cafeico, 3 y 4: isómeros del ácido clorogénico, 5: pico no identificado.

El cromatograma de las muestras crudas y cocidas de todos los cultivares muestran un pico a 23,8 min, el cual es mayor en las muestras de tubérculos cocidos con respecto a las correspondientes muestras de tubérculos crudos. Los cromatogramas de las muestras provenientes de tubérculos cocidos, presentaron además un pico prominente a un tiempo de retención de 19,1 min, el cual no aparece en las muestras provenientes de tubérculos crudos. Ambos picos (a tiempos de retención de 19 y 23 min) tuvieron el mismo espectro de absorción que el AC. Basados en esta información, y comparando con otras investigaciones (Andre et al., 2007), se concluyó que estos picos corresponden a los isómeros del AC. Asimismo se observó un pico no identificado a 9,1 min, tanto en las muestras de tubérculos crudos como en las muestras cocidas. Esto sugiere que en el proceso de cocción se producen modificaciones y transformaciones de los compuestos fenólicos.

El análisis de varianza ANOVA de las concentraciones de FT, AT y AC puso de manifiesto diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) en la interacción entre la cocción y el cultivar. Así, la concentración de FT determinada en las muestras de tubérculos cocidos de los cuatro cultivares fue mayor que la encontrada en las correspondientes muestras de tubérculos crudos (Figura V.10). Con excepción del cultivar 704429, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de AT y AC determinadas en tubérculos crudos y cocidos (Figura V.10). Para el cultivar 704429, la concentración de AT determinada en los tubérculos crudos fue mayor que en los tubérculos cocidos, mientras que la concentración de AC determinada en los tubérculos cocidos fue mayor que en los tubérculos crudos.

El hecho de que la concentración de FT en todos los cultivares y que la concentración de AC determinada en muestras cocidas del cultivar 704429 fueron mayores que en las muestras crudas, puede ser atribuido a una extracción más eficiente obtenida en las muestras cocidas. Estos resultados concuerdan con estudios previos que muestran niveles más

altos de FT y AC en muestras de papas cocidas con respecto a las correspondientes muestras de papa crudas (Blessington et al., 2010). La cocción podría producir una hidrólisis de diferentes componentes, liberando componentes fenólicos y haciéndolos más disponibles para la extracción.

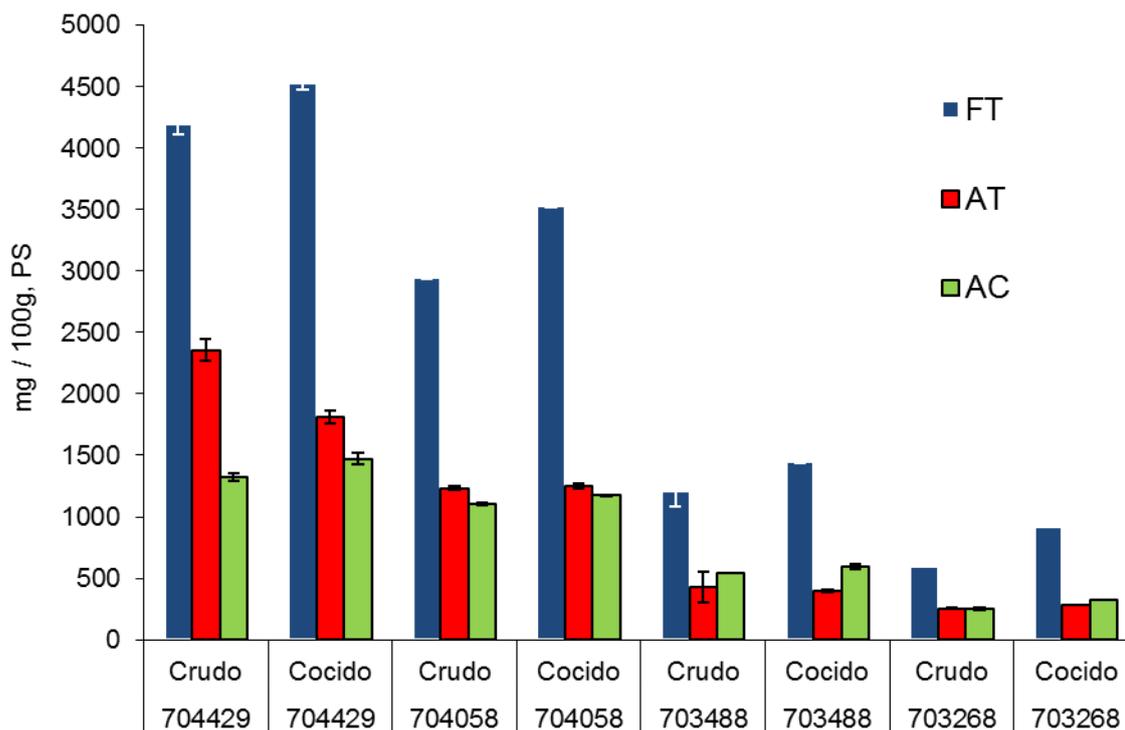


Figura V.10. Concentraciones de compuestos fenólicos totales (FT), antocianinas totales (AT) y ácido clorogénico (AC), representada por el valor medio ( $n=3$ )  $\pm$  desviación estándar, en papas crudas y cocidas de los cuatro cultivares andinos con pulpa morada estudiados.

Por otro lado, nuestros resultados parecen contradecir lo descrito por Xiaoyun et al. (2009) y Perla et al. (2011). Ambas investigaciones describen que la concentración de los FT en papas cocidas, a microondas o al vapor, es menor que la encontrada en papas crudas. Sin embargo, hay una diferencia significativa entre la metodología utilizada por estos investigadores (Xiaoyun et al., 2009; Perla et al., 2011) y la usada en este estudio. En esas investigaciones, los FT y el AC de muestras, tanto crudas

como cocidas, fueron extraídos usando metanol al 80%. En este estudio se ha demostrado que mientras el metanol al 80% tiene el mejor rendimiento de extracción para los FT en muestras crudas; con el uso del metanol al 60% se obtiene la mayor concentración en papas cocidas, comparándola con las concentraciones obtenidas cuando se utiliza metanol con una concentración igual o mayor que 70%.

El rango de los FT osciló entre 596 a 4196 mg de AC equivalente/100 g PS en papas crudas y de 915 a 4525 mg de AC equivalente/100 g PS en papas cocidas. El cultivar 704429 presentó la concentración más alta de FT tanto en muestras crudas como cocidas. Las concentraciones de FT obtenidas en las papas moradas usadas en este estudio, son claramente más altas que las descritas anteriormente por Reyes et al. (2005) en papas crudas de pulpa morada y roja (304 a 724 mg/100 g PS). Del mismo modo, la concentración de FT en las papas cocidas de pulpa morada obtenida en este estudio, es considerablemente mayor que la concentración observada en papas cocidas de pulpa no morada previamente reportada por otros autores tales como Blessington et al. (2010) (56-252 mg/100 g PS) y Xiaoyun et al. (2009) (80-224 mg/100 g PS).

Las AT oscilan entre 253 a 2357 mg/100 g PS en papas crudas y de 284 a 1814 mg/100 g PS en las correspondientes muestras de papas cocidas. El rango de variación de la concentración de AT en papas crudas es similar a la descrita por Lewis et al. (1998) (340 a 2333 mg/100 g PS) en papas crudas de pulpa morado claro a oscuro; y significativamente mayor a los valores encontrados por Lachman et al. (2009) (2,8 a 297 mg/100 g PS) y Reyes et al. (2005) (44 a 696 mg/100 g PS) en papas crudas de pulpa morada y roja. El cultivar 704429 mostró la concentración mayor de AT en papas crudas y cocidas. Este cultivar también presentó la concentración más alta de AT en un estudio llevado a cabo en papas crudas publicado por Andre et al. (2007). Ese estudio también señaló que la antocianina principal en papas de pulpa morado

oscuro era petunidina-3-p-coumaroil-rutinosida-5-glucosido, comúnmente conocida como petanina. Lewis et al. (1998) indicó que los tubérculos de pulpa roja contienen mayoritariamente pelagonidina-3-p-coumaroil-rutinósido-5-glucósido y una cantidad menor de peonidina-3-p-coumaroil-rutinósido-5-glucósido; y que las papas de pulpa morada contienen petunidina-3-p-coumaroil-rutinósido-5-glucósido y malvidina-3-p-coumaroil-rutinósido-5-glucósido.

La concentración de AC oscila entre 252 a 1319 mg/100 g PS en papas crudas y de 321 a 1492 mg/100 g PS en papas cocidas. Un rango similar para la concentración de AC (17-1274 mg/100 g PS) fue publicado por André et al. (2007) en tubérculos crudos de papa nativas Andinas y un rango similar también fue encontrado por Lewis et al. (1998) en papas crudas de pulpa morada clara a oscura (12-360 mg/100 g PS) y por Verde et al. (2004) en papas crudas no pigmentadas de Tenerife (25-225 mg/100 g PS).

### **V.2.3. Efecto de la cocción en la AA de papas moradas**

La AA determinada en muestras de papas cocidas mediante los métodos ABTS y DPPH fue mayor ( $p < 0,001$ ) que en las correspondientes muestras de papas crudas (Figura V.11). Estos resultados concuerdan con otros estudios que observaron que la AA de frutas y vegetales cocidos es mayor cuando se le compara con las muestras crudas no cocidas (Yamaguchi et al., 2001; Dewanto et al., 2002; Miglio et al., 2008). Xiaoyun et al. (2009) estudiaron los efectos de la cocción por hervido, del microondas y horneado sobre la capacidad antioxidante de ocho cultivares y encontraron que las papas cocidas retienen entre 68 y 97% del valor ORAC, dependiendo del proceso de cocción y la variedad. Análogamente a lo indicado para los FT, en ese estudio el disolvente usado para la extracción de antioxidantes en muestras crudas y cocidas fue metanol al 80%. En el presente estudio, se demostró que el uso de metanol al 60%

permitió extraer una mayor cantidad de compuestos antioxidantes a partir de muestras cocidas, comparada con la cantidad extraída al usar metanol al 80%.

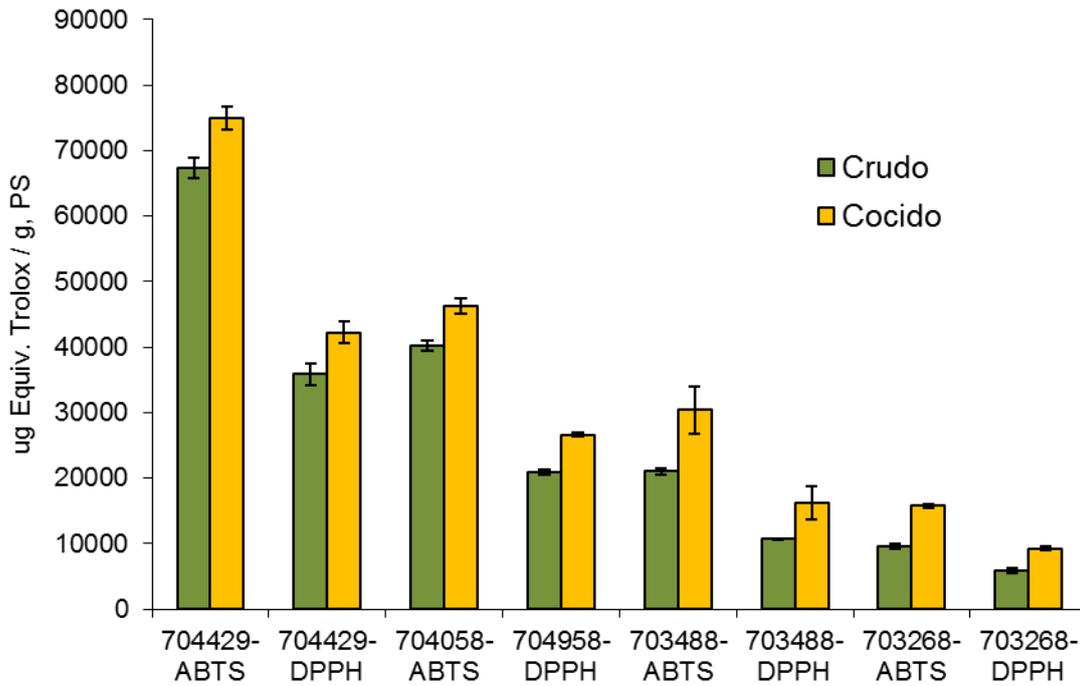


Figura V.11. Actividad antioxidante obtenida usando los métodos de ABTS y DPPH en papas crudas y cocidas de los cuatro cultivares andinos de pulpa morada estudiados.

La AA de los cuatro cultivares andinos de pulpa morada usados en este estudio determinada por el método ABTS, osciló entre 9533 y 67276  $\mu\text{g}$  Equiv. Trolox/g PS en papas crudas y entre 15753 y 74912  $\mu\text{g}$  Equiv. Trolox/g PS en papas cocidas; y cuando se determinó mediante el método DPPH, osciló entre 5933 y 35849  $\mu\text{g}$  Equiv. Trolox/g PS en papas crudas y entre 9292 y 42223  $\mu\text{g}$  Equiv. Trolox/g PS en papas cocidas. Estos resultados están de acuerdo con lo descrito por Lachman et al. (2012), quienes encontraron que las variedades de papas de pulpa morada cocidas por hervido, aumentan (4,22 veces) su contenido de AA y de AT.

Los cultivares 704058 y 704429 mostraron la mayor AA en tubérculos crudos y cocidos. La AA de los tubérculos crudos pertenecientes a estos cultivares determinada mediante el método DPPH (20940 y 35849  $\mu\text{g}$  Equiv. Trolox/g PS, respectivamente) es considerablemente mayor que la AA encontrada por Cevallos-Casas y Cisneros Zevallos (2003) en tubérculos crudos de cultivares de pulpa de color morado y rojo (2052 a 5704  $\mu\text{g}$  Equiv. Trolox/g PS, considerando un contenido de materia seca del 25%).

La AA determinada mediante ABTS fue entre un 61-92% mayor que la determinada mediante DPPH. Los ensayos ABTS y DPPH están asociados con la eliminación de electrones y radicales pero dan resultados diferentes. Por ejemplo, un estudio reciente publicado por Lachman et al. (2009) mostró que los valores de AA en muestras de papa con pulpa de color rojo y morado medidos mediante ABTS, fueron 2,5 veces mayores que los obtenidos usando el método DPPH. Del mismo modo, Floegel et al. (2011) encontró que la actividad antioxidante detectada utilizando el método ABTS fue significativamente mayor en frutas, vegetales y bebidas, comparada con el método DPPH. Por consiguiente, es fundamental que la comparación entre la AA de diferentes alimentos se base en el uso del mismo método de análisis.

#### **V.2.4. Niveles de AT y AA en papas moradas cocidas, expresadas en base al peso fresco (PF)**

Se calculó la concentración de AT y AA en base al peso fresco usando para su cálculo el porcentaje correspondiente de materia seca obtenido en cada cultivar.

La concentración de AT en papas cocidas de los cuatro cultivares andinos usados en este estudio varía de 72 y 419 mg/100 g PF, mientras que la AA en papas cocidas oscilo desde 4017 a 17304  $\mu\text{g}$  Equiv. Trolox /g PF cuando se utilizó el método ABTS; y de 2369 a 9754  $\mu\text{g}$  Equiv. Trolox

/g PF cuando se utilizó el método DPPH. El cultivar 704429 de pulpa morado oscuro mostró la concentración mayor de AT y AA.

La concentración de AT en papas cocidas del cultivar 704429 (por encima de 400 mg/100 g PS) es menor que la de los arándanos (558 mg/100 g PF; Hosseinian y Bea, 2007), moras (589 mg/100 g PF; Wada y Ou, 2002), berenjena (750 mg/100 g PF; Wu et al., 2006) y maíz morado (1642 mg/100 g PF; Cevallos-Casals y Cisneros Zevallos, 2003). Del mismo modo, la AA de dicho cultivar 704429 (sobre 17000 µg Equiv. Trolox/g PF usando el método ABTS) es menor comparada con la obtenida en fresa, mora y arándano usando también el método ABTS (alrededor de 25030-50000 µg Equiv. Trolox/g PF) (García-Alonso et al., 2004). Sin embargo, la contribución de cualquier alimento a la ingesta de antocianina, y como consecuencia, a la AA, también depende de la cantidad de alimento consumido y de la biodisponibilidad de las antocianinas y otros compuestos fenólicos que aportan la AA. Por ejemplo, el consumo promedio de arándanos, arándanos agrios y berenjena en los Estados Unidos es menos de 1 g/día (Wu et al., 2006), mientras que el consumo promedio de papa en algunas áreas como la Sierra del Perú, donde es un alimento básico de elevado consumo, puede alcanzar valores de 500 g/día (incluyendo papas de pulpa morado oscuro). Por otro lado, la estabilidad y biodisponibilidad de las antocianinas está afectada significativamente por los restos de azúcar y grupos acilados que éstas presenten. Mientras que los arándanos son la fuente principal de antocianinas a nivel mundial aportando principalmente antocianinas no aciladas (Wu et al., 2006), las antocianinas presentes en la papa son principalmente antocianinas aciladas (Lachman y Hamouz, 2005). Si bien hay estudios que indican que la biodisponibilidad de antocianinas de los arándanos es baja no existe ese tipo de estudios para las antocianinas de papa.

### V.3. BIOACCESIBILIDAD IN VITRO DE LUTEÍNA Y ZEAXANTINA EN PAPAS COCIDAS DE PULPA AMARILLA

En las Tablas V.2 y V.3 se exponen las concentraciones de luteína y zeaxantina, respectivamente, en tubérculos cocidos de los siete cultivares andinos evaluados, antes y después de la digestión gástrica y duodenal así como de la micelarización, simuladas. Las concentraciones de luteína y zeaxantina en las muestras no digeridas de las siete cultivares, osciló entre 65,4 y 395  $\mu\text{g}/100\text{ g PS}$  y entre 51,3 y 1196  $\mu\text{g}/100\text{ g PS}$ , respectivamente. Los valores obtenidos en las muestras liofilizadas y molidas son comparables a aquellos publicados previamente en tubérculos cocidos de cultivares similares con pulpa amarilla, analizadas directamente sin liofilizar ni moler (de 73 a 253  $\mu\text{g}/100\text{ g PS}$  para luteína y de 0 a 1048  $\mu\text{g}/100\text{ g PS}$  para zeaxantina).

Tabla V.2. Concentración de luteína en los siete cultivares andinos con diferentes intensidades de pulpa amarilla estudiados, antes y después de cada uno de los dos procesos de digestión, y después de la micelarización

Número CIP	Luteína (mg/100 g PF)*			
	PC <sup>1</sup>	FG <sup>2</sup>	FD <sup>3</sup>	FM <sup>4</sup>
701862	395,7 <sup>a</sup> ± 10,6	367,1 <sup>b</sup> ± 16,1	319,6 <sup>c</sup> ± 12,1	280,6 <sup>d</sup> ± 9,7
702472	168,4 <sup>a</sup> ± 4,1	152,9 <sup>a</sup> ± 5,9	126,0 <sup>b</sup> ± 6,2	106,9 <sup>b</sup> ± 5,4
703282	263,2 <sup>a</sup> ± 13,5	245,0 <sup>a</sup> ± 6,6	210,7 <sup>b</sup> ± 4,6	185,2 <sup>c</sup> ± 16,9
703566	155,7 <sup>a</sup> ± 5,4	134,1 <sup>b</sup> ± 3,4	132,0 <sup>b</sup> ± 4,7	99,7 <sup>c</sup> ± 6,6
704218	65,4 <sup>a</sup> ± 2,5	58,6 <sup>a</sup> ± 5,8	49,0 <sup>a</sup> ± 4,0	21,7 <sup>b</sup> ± 2,9
705799	295,0 <sup>a</sup> ± 10,6	246,1 <sup>b</sup> ± 22,3	231,7 <sup>b</sup> ± 3,3	180,3 <sup>c</sup> ± 14,4
706751	132,1 <sup>a</sup> ± 2,6	98,3 <sup>b</sup> ± 1,7	92,9 <sup>b</sup> ± 4,6	62,5 <sup>c</sup> ± 5,9

<sup>1</sup>: Papas cocidas no digeridas (PC), <sup>2</sup>: fase gástrica (FG), <sup>3</sup>: fase duodenal (FD), <sup>4</sup>: fase micelar (FM)

\* Medias (n=3) ± DS. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar.

Tabla V.3. Concentración de zeaxantina en los siete cultivares andinos con diferentes intensidades de pulpa amarilla estudiados, antes y después de cada uno de los dos procesos de digestión, y después de la micelarización

Número CIP	Zeaxantina (mg / 100 g PF)*			
	PC <sup>1</sup>	FG <sup>2</sup>	FD <sup>3</sup>	FM <sup>4</sup>
701862	51,3 <sup>a</sup> ± 1,6	46,4 <sup>a</sup> ± 3,4	39,1 <sup>a</sup> ± 3,4	31,5 <sup>a</sup> ± 1,4
702472	697,1 <sup>a</sup> ± 14,6	667,7 <sup>a</sup> ± 22,3	584,9 <sup>b</sup> ± 18,2	470,2 <sup>c</sup> ± 26,0
703282	66,6 <sup>a</sup> ± 5,9	52,9 <sup>a</sup> ± 3,9	42,5 <sup>a</sup> ± 3,0	38,2 <sup>a</sup> ± 2,2
703566	1.196,2 <sup>a</sup> ± 32,1	1.085,9 <sup>b</sup> ± 32,8	1.033,8 <sup>b</sup> ± 59,7	665,4 <sup>c</sup> ± 39,4
704218	1.106,1 <sup>a</sup> ± 17,6	1.066,0 <sup>a</sup> ± 39,6	944,0 <sup>b</sup> ± 39,1	608,3 <sup>c</sup> ± 64,5
705799	654,2 <sup>a</sup> ± 34,9	611,3 <sup>a</sup> ± 25,1	547,2 <sup>b</sup> ± 25,1	463,9 <sup>c</sup> ± 21,4
706751	682,7 <sup>a</sup> ± 28,2	652,2 <sup>a</sup> ± 19,7	575,1 <sup>b</sup> ± 27,1	404,1 <sup>c</sup> ± 56,1

<sup>1</sup>: Papas cocidas no digeridas (PC), <sup>2</sup>: fase gástrica (FG), <sup>3</sup>: fase duodenal (FD), <sup>4</sup>: fase micelar (FM)

\* Medias (n=3) ± DS. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para cada cultivar.

En los siete cultivares, las concentraciones de luteína y zeaxantina mostraron una disminución después de la digestión, más o menos significativa dependiendo del cultivar, en el orden siguiente fase gástrica > fase duodenal > fase micelar. Mientras que la concentración de luteína en sólo tres cultivares (701862, 703566 y 705799) y de zeaxantina en sólo uno (703566), fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) menores después de la fase gástrica (Tabla V.2 y V.3); la concentraciones de luteína y zeaxantina en la mayoría de las cultivares fueron menores ( $p < 0,05$ ) después de la fase duodenal (Tabla V.2 y V.3). Estos resultados sugieren que la luteína y zeaxantina proveniente de papas es menos estable en las condiciones duodenales que en las gástricas.

La bioaccesibilidad de luteína y zeaxantina (i.e., cantidades transferidas hacia los sobrenadantes después de la digestión *in vitro*) en todos los cultivares fue significativamente ( $p < 0,05$ ) menor que la cantidad

encontrada en muestras no digeridas (Tabla V.2 y V.3), con valores de bioaccesibilidad en luteína que están entre 21 y 280  $\mu\text{g}/100\text{ g PS}$  y en el caso de zeaxantina entre 31 y 665  $\mu\text{g}/100\text{ g PS}$ . Es probable que los carotenoides puedan además ser accesibles en porciones posteriores del tracto intestinal debido a la interacción con la microflora intestinal asentada principalmente en el colon. De ahí, que los valores presentados para la fase micelar deberían ser interpretados en términos de bioaccesibilidad en el intestino delgado y no como bioaccesibilidad en la totalidad del intestino.

La Figura V.12 (a y b), representa la estabilidad digestiva y la eficiencia de la micelarización (EM) de la luteína y zeaxantina, respectivamente, en papas cocidas. La estabilidad gástrica y duodenal representa el porcentaje de carotenoide recuperado después de la simulación de la digestión gástrica e intestinal, respectivamente, incluyendo la liberación desde la matriz del alimento; y la EM o bioaccesibilidad *in vitro* representa el porcentaje de carotenoide, presente inicialmente en el alimento, que fue transferido a la fase acuosa filtrada durante la digestión simulada, y que, por tanto, es disponible para la absorción en el intestino (Granado-Lorencio et al., 2007).

La estabilidad digestiva gástrica y duodenal de la luteína y zeaxantina en las papas cocidas con pulpa amarilla evaluadas en este estudio, osciló entre 70 a 95% (Figura V.10, a y b). De forma análoga, Granado-Lorencio et al. (2007) encontraron que la estabilidad de la luteína y zeaxantina en maíz dulce y pimiento rojo después de la fase gástrica y duodenal, fue relativamente alta (>80%); y Chitchumroonchokchai et al. (2004) encontraron que la recuperación de luteína después de la digestión gástrica e intestinal simuladas de la espinaca variaba entre 70-88%.

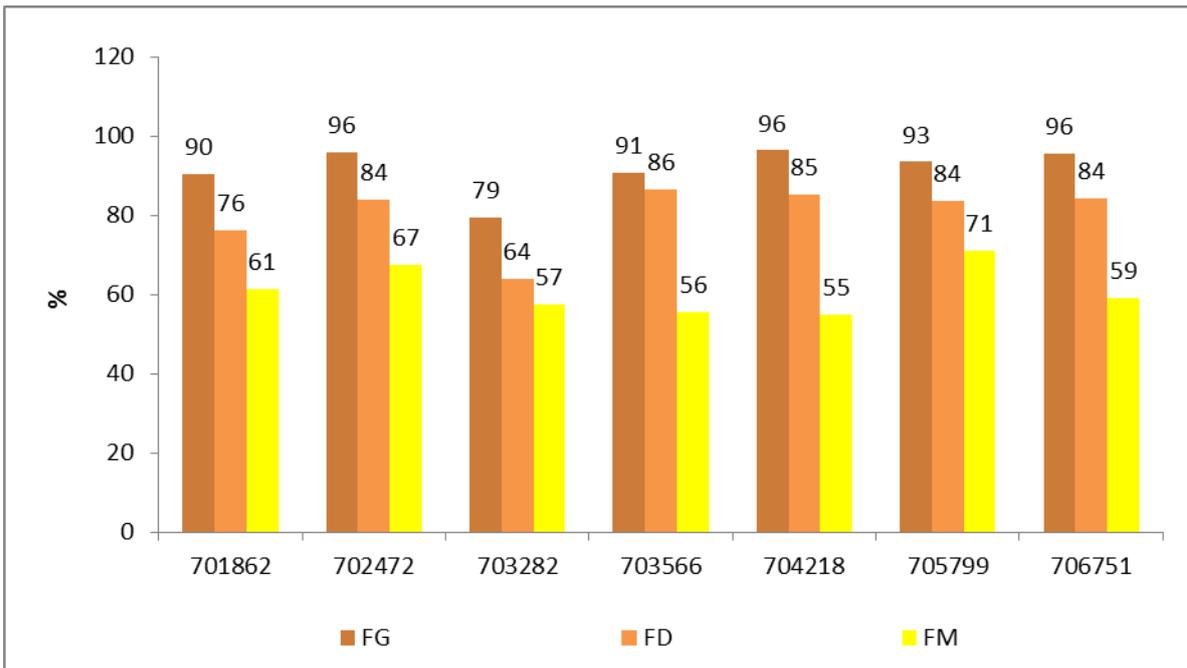


Figura V.12. Estabilidad gástrica y duodenal y eficiencia de micelarización de luteína y zeaxantina después de la digestión *in vitro*.

El perfil cromatográfico después de la fase gástrica y duodenal fue similar al obtenido en papas cocidas antes de la digestión. No se observó aumento significativo en los picos o la aparición de algún pico nuevo.

Granado-Lorencio et al. (2007) reportaron que los perfiles cromatográficos después de la fase duodenal en verduras verdes y no verdes fueron cualitativamente los mismos que los observados inicialmente en los distintos productos frescos no sometidos a tratamiento, pero con una menor cantidad de formas ésteres y mayores cantidades de las correspondientes xantofilas libres. Dado que en este estudio las muestras fueron sometidas a saponificación antes y después de la digestión, no fue posible establecer si había diferencias en los ésteres de carotenoides debido al proceso de digestión. Sin embargo, es importante mencionar que mientras las muestras de diferentes las verduras, analizadas por Granado-Lorencio et al. (2007), tenían entre 10 a 84% de xantofilas libres, las muestras de papa utilizadas en este estudio y analizadas antes de la digestión sin saponificación tuvieron más del 95% de xantofilas libres.

La EM de los carotenoides en los cultivares andinos evaluados osciló entre 33 a 71% para luteína y entre 51 a 71% para zeaxantina (Figura V.12, a y b). Los cultivares 701862 y 103282 tenían mayores EM de luteína (sobre el 70%), y mostraron una concentración ocho veces más de luteína y de cuatro veces más de zeaxantina; y el cultivar 704218, que tenía la menor EM de luteína (33%), tenía una concentración de luteína diecisiete veces menor que la concentración de zeaxantina. También se observó que el cultivar 705799, que tenía la más alta EM de zeaxantina, mostró una concentración de zeaxantina dos veces mayor que la concentración de luteína, mientras que la accesión 704218, que tenía la más baja EM, mostró una concentración de zeaxantina diecisiete veces mayor que la concentración de luteína. Basado en estas observaciones, las diferencias en la EM de luteína y zeaxantina entre las cultivares de papa analizados pueden ser atribuidas a la posible interacción de ambos carotenoides durante la micelarización.

El valor promedio de EM en papa fue de 59% para luteína y de 61% para zeaxantina. Estos valores son similares a las EM descritas en la digestión *in vitro* de maíz dulce y zanahoria (59 y 66% para luteína; y de

54 y 48% para zeaxantina, respectivamente) (Granado-Lorencio et al., 2007) y mayor que las EM para luteína encontradas en espinaca, que fueron 5 y 18% de acuerdo con datos publicados por Granado-Lorencio et al. (2007) y O'Connell et al. (2007), respectivamente. Las diferencias en la EM de luteína entre papa y espinaca pueden explicarse por las diferencias en la localización intracelular de los carotenoides. En hojas, los carotenoides están presentes en cloroplastos, mientras que en frutas y raíces, los carotenoides están ubicados en el cromoplasto. Podría ser que los cloroplastos sean rotos menos eficientemente en el tracto intestinal que los cromoplastos (Van het Hof et al., 2000), lo que explicaría las diferencias observadas en los resultados. Diferencias en las EM también pueden depender de la forma en la que los carotenoides están presentes en la fuente alimentaria. En vegetales de hojas verdes, los carotenoides están formando complejos carotenoide-proteína, mientras que en raíces y frutas están presentes de forma semicristalina (Ryan et al., 2008).

La EM de zeaxantina en los dos cultivares de papa con los niveles más altos de este carotenoide estuvo alrededor del 60%. Chitchumroonchockchai y Failla (2004), evaluaron la bioaccesibilidad de zeaxantina de goji, pimiento naranja y rojo, verduras con concentraciones elevadas de zeaxantina, y particularmente, ésteres de zeaxantina, y reportaron que las EM de zeaxantina en pimiento naranja y rojo oscilaban entre el 50-70%, mientras que en goji digerido era de sólo el 24%.

El cultivar 701862 mostró la concentración más alta de luteína bioaccesible (280 µg/100 g PS). Este valor es mayor que la concentración luteína bioaccesible encontrada para brócoli y pimiento rojo (67 y 77 µg/100 g PS, respectivamente). Sin embargo, mientras la EM encontrada en luteína de papa es mayor que la observada en luteína de vegetales de hoja verde, la concentración de luteína bioaccesible en el cultivar andino 701862 es menor que la concentración de luteína bioaccesible indicada para espinaca (471 µg/100g PS) (O'Connell et al., 2007).

Los cultivares 703566 y 704218 mostraron las concentraciones más altas de zeaxantina bioaccesible (sobre 600  $\mu\text{g}/100\text{ g PS}$ ). Estos valores son mayores que los publicados por Granado-Lorencio et al. (2007) para pimiento rojo y maíz dulce (81 y 208  $\mu\text{g}/100\text{ g PS}$ , respectivamente), pero menores que los valores indicados por Chitchumroonchockchai y Failla (2004) en goji y pimiento naranja y rojo (24792, 18156 y 6783  $\mu\text{g}/100\text{ g PS}$ , respectivamente).

Considerando el consumo promedio de papa en los Andes del Perú, Ecuador y Bolivia (500 g por día), la luteína bioaccesible aportada por el cultivar 701862 puede alcanzar cerca de 1400  $\mu\text{g}$ , lo que representaría el 14% del nivel de ingesta de luteína con supuestos efectos beneficiosos para la salud (10 mg/día) (American Optometric Association, 2009). Del mismo modo, la zeaxantina bioaccesible aportada por las cultivares de pulpa de color amarillo oscuro: 703566 y 704218 pueden alcanzar cerca de 3000  $\mu\text{g}$ , lo que supone un 50% más del nivel de ingesta de zeaxantina (2 mg/día) que se ha sugerido tiene efectos beneficiosos para la salud (American Optometric Association, 2009). Además, la cantidad de zeaxantina bioaccesible obtenida por el consumo de 500 g de papas de los cultivares 703566 y 704218, representa una cantidad similar a la obtenida por el consumo de 15 g de goji. Se ha indicado que el consumo diario de 15 g de goji fresco durante 28 días puede aumentar a 2,5 veces la concentración de zeaxantina en el plasma de humanos (Cheng et al., 2005). Por tanto, es probable que el consumo de 500 g de papas con pulpa amarilla tenga el mismo efecto.

#### **V.4. CONCENTRACIÓN Y BIOACCESIBILIDAD DEL ACIDO CLOROGÉNICO Y ANTOCIANINAS DE PAPAS MORADAS Y ROJAS COCIDAS.**

##### **V.4.1. Concentración de AC en papas cocidas de pulpa morada y rosada**

La concentración del AC en los cultivares de pulpa morada osciló entre 36,2 y 395,7 mg/100g PF y en cultivares de pulpa roja de 14,4 a 48,6 mg/100g PF (Tabla V.4).

El cultivar 704429 presentó la concentración más alta de AC. La cantidad aportada de AC por el consumo de 100 g de tubérculos cocidos de este cultivar es similar a la cantidad máxima aportada por una taza de café (350 mg de AC; Clifford, 1999) y diez veces mayor que la cantidad máxima aportada por una manzana entera (38,5 mg/100g PF; Spanos y Wrolstad, 1992).

Las papas contienen tres isómeros del AC dependiendo de la posición en la que el hidroxycinamato se une al ácido químico (3-, 4- o 5-O), siendo el ácido 5-O-cafeoilquínico (5-O-CQ) el isómero predominante. El ácido 5-O-cafeoylquínico es, también el isómero del AC mayoritario del café y las manzanas (Stalmach et al., 2010; Cliffors, 1999). Los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado una reducción en la oxidación de las lipoproteínas LDL humanas después del consumo de café, sugiriendo que el ácido 5-O-CQ protege contra la oxidación *in vitro* de dichas lipoproteínas, lo cual supone un freno frente a la formación de placas ateroscleróticas (Richelle et al, 2001). El ácido 5-O-CQ tiene además efectos anticancerígenos según estudios experimentales realizados con animales (Stachmal et al., 2010).

Tabla V.4. Concentración de compuestos fenólicos totales (FC), antocianinas totales (AT) y actividad antioxidante determinada por los métodos ABTS y DPPH en doce cultivares andinos de pulpa morada y seis cultivares andinos de pulpa roja.

Número CIP	FT mg/100g PF	AC mg/100g PF	AT mg/100g PF	ABTS μg ET/g, PF	DPPH μg ET/g, PF
Papas de pulpa morada					
703265	126,8 ± 0,7	36,2 ± 0,4	7,9 ± 0,3	2317,1 ± 28,1	1474,9 ± 58,8
703274	180,8 ± 0,5	30,4 ± 0,3	24,3 ± 0,5	4121,2 ± 35,4	1647,4 ± 36,2
706668	199,3 ± 1,1	35,9 ± 2,4	27,9 ± 0,4	3662,1 ± 64,4	2164,7 ± 30,4
705975	162,9 ± 1,5	27,6 ± 0,4	29,2 ± 0,5	3247,9 ± 85,6	1603,4 ± 41,5
703268	202,1 ± 1,9	49,6 ± 2,8	47,5 ± 1,2	3546,8 ± 22,4	2249,7 ± 35,8
706134	188,4 ± 1,8	43,9 ± 2,1	47,7 ± 2,3	4134,9 ± 16,6	2621,1 ± 89,9
700313	245,8 ± 2,8	46,7 ± 0,9	52,9 ± 0,2	3731,7 ± 77,2	2402,7 ± 100,0
702363	249,8 ± 2,2	377,0 ± 1,8	75,8 ± 1,2	3891,6 ± 21,0	2238,2 ± 16,7
703488	345,0 ± 4,9	102,4 ± 2,1	81,0 ± 1,1	5126,7 ± 121,6	3440,2 ± 438
705534	331,1 ± 4,1	79,3 ± 2,9	105,3 ± 1,1	4449,6 ± 41,9	2826,1 ± 25,9
704058	585,6 ± 6,3	184,3 ± 7,2	214,5 ± 7,2	8734,6 ± 38,8	5348,1 ± 92,0
704429	1133,9 ± 4,1	395,7 ± 20,0	459,0 ± 8,2	17864,9 ± 167,5	13915,8 ± 63,2
Papas de pulpa roja					
706836	159,8 ± 0,9	14,5 ± 1,4	8,2 ± 0,3	3022,7 ± 50,2	1356,7 ± 30,1
702453	155,0 ± 1,0	29,1 ± 2,5	17,9 ± 1,5	2860,1 ± 14,2	1552,5 ± 19,6
706655	161,1 ± 0,7	33,4 ± 1,6	21,9 ± 0,9	4287,5 ± 45,9	1665,3 ± 43,0
703625	105,78 ± 0,6	29,2 ± 1,2	22,4 ± 0,5	2934,5 ± 123,3	1420,9 ± 24,3
701997	204,5 ± 0,8	45,2 ± 1,4	31,9 ± 0,6	3413,5 ± 30,8	2054,2 ± 30,5
700234	251,2 ± 2,1	48,6 ± 1,4	55,3 ± 3,2	4093,5 ± 51,1	2134,1 ± 87,5

<sup>1</sup>Valores medios ± desviación estándar (n = 3).

#### **V.4.2. Concentración y perfil de antocianinas en papas cocidas de pulpa morada y rosada**

La concentración de AT en papas con pulpa morada osciló entre 7,9 a 459,0 mg/100g PF y en papas con pulpa roja de 8,2 a 55,3 mg/100g PS (Tabla V.4). Los cultivares de pulpa morada 704058 y 704429 mostraron las concentraciones más altas de AT seguidas por 703488 y 705534. La concentración de AT de 704429 fue más de tres veces mayor que el valor más alto observado por Lachman et al. (2012) en papas cocidas de pulpa morada de la variedad Blaue St Galler (154 mg/100 g PS, considerando un 25% de materia seca para su conversión a peso fresco). Una muestra de 100 g de papas pertenecientes al cultivar 704429 provee una cantidad similar al valor más alto de antocianinas encontrado en 100 g de mora y arándano (400 y 500 mg) y una cantidad mayor que la obtenida en 50 g de berenjena o uvas negras (400 mg) (Manach et al., 2004).

Aplicando la cromatografía líquida de alta resolución acoplada con la espectrometría de masas (HPLC-MS) se identificaron las diferentes antocianinas presentes en los cultivares andinos estudiados. En los cultivares de pulpa morada, la antocianina predominante fue la petunidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido, representando del 37 al 78% de las antocianinas totales. Le siguió la peonidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido, cianidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido y pelargonidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido (Figura V.13).

En los cultivares de pulpa roja, la antocianina predominante fue la pelargonidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido, representando del 41 al 75% de las antocianinas totales. Seguidamente, se sitúan la peonidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido, pelargonidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido y cianidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido en proporciones menores (Figura V.14).

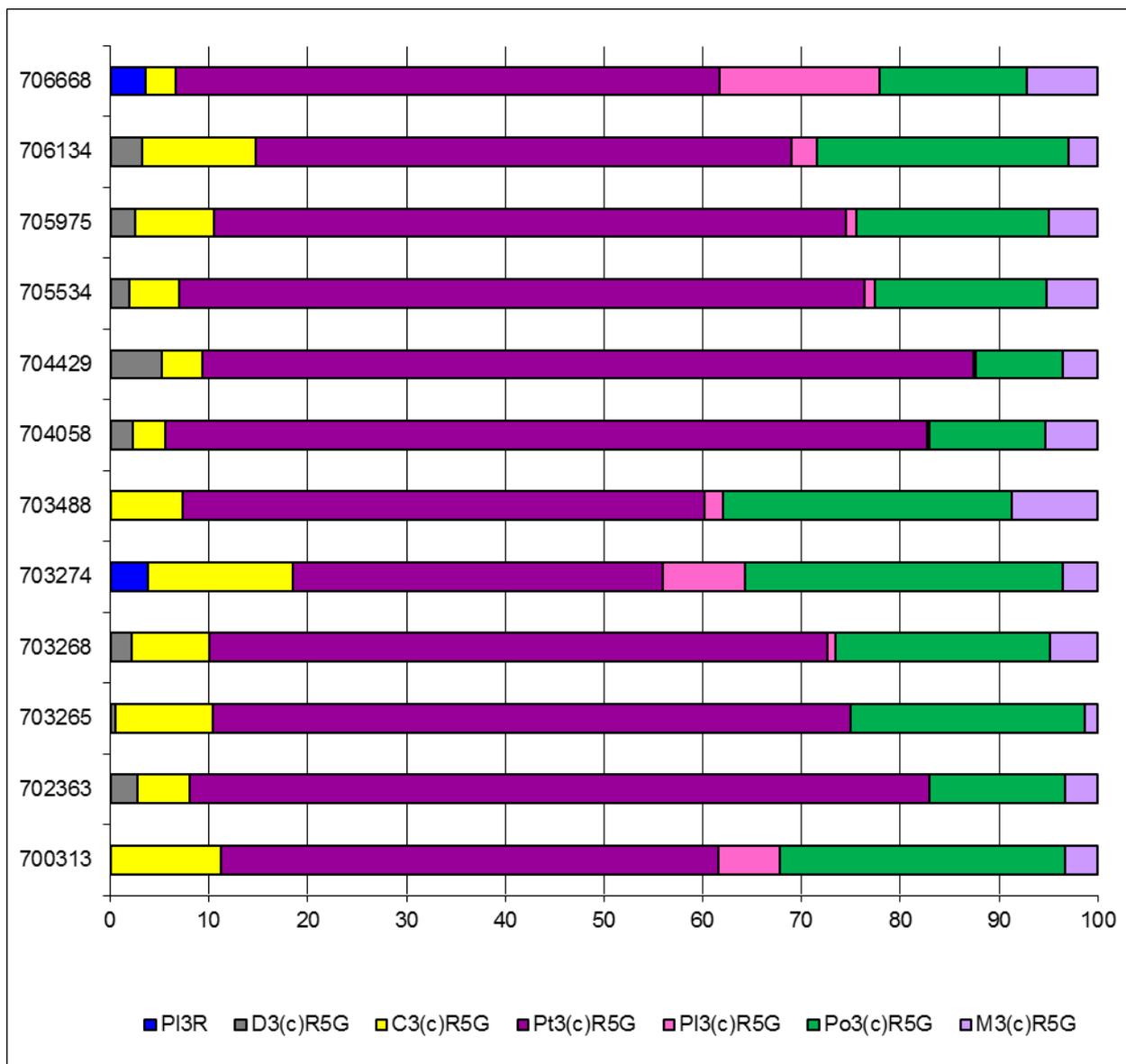


Figura V.13. Perfil de antocianinas presentes en muestras cocidas de tubérculos de los doce cultivares andinos de pulpa morada estudiados.

PI3R: pelargonidina-3-rutinósido, D3(c)R5G: delphinidina-3-(coumaroil)rutinósido-5-glucósido, C3(c)R5G: cianidina-3-(coumaroil)rutinósido-5-glucósido, Pt3(c)R5G: petunidina-3-(coumaroil)rutinósido-5-glucósido, PI3(c)R5G: pelargonidina-3-(coumaroil)rutinósido-5-glucósido, Po3(c)R5G: peonidina 3-(coumaroil)rutinósido-5-glucósido, M3(c)R5G: malvidina 3-(coumaroil)rutinósido-5-glucósido

La presencia de petunidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido, conocida como petanina ha sido observada en tubérculos de pulpa morada de *Solanum andigenum* (André et al., 2007), *Solanum tuberosum*

(Lewis et al., 1998) y diploides *Solanum stenotomum*. Sin embargo, según la información publicada hasta este momento, este trabajo es el primero en el que se ha observado la presencia de petanina en papas cocidas con pulpa morada.

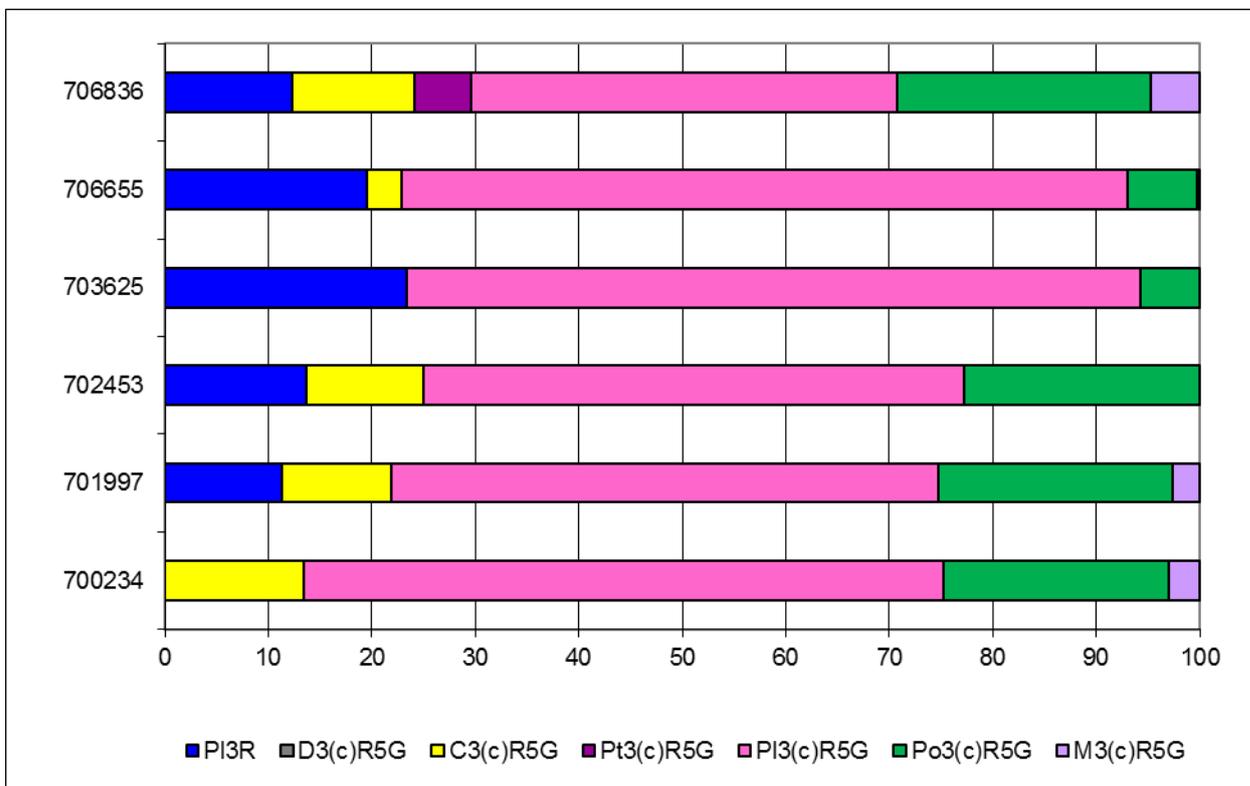


Figura V.14. Perfil de antocianinas en muestras cocidas de tubérculos de los seis cultivares andinos de pulpa roja estudiados.

PI3R: pelargonidina-3-rutinósido, D3(c)R5G: delfinidina-3-(coumaroil)rutinósido-5-glucósido, C3(c)R5G: cianidina-3-(coumaroil)rutinósido-5-glucósido, Pt3(c)R5G: petunidina-3-(coumaroil)rutinósido-5-glucósido, PI3(c)R5G: pelargonidina-3-(coumaroil)rutinósido-5-glucósido, Po3(c)R5G: peonidina 3-(coumaroil)rutinósido-5-glucósido, M3(c)R5G: malvidina 3-(coumaroil)rutinósido-5-glucósido

Las antocianinas predominantes presentes en los cultivares de pulpa roja y morada evaluadas en este estudio están aciladas con ácido hidroxicinámico. Estos resultados están en acuerdo con el trabajo publicado por Fossen y Andersen (2000); en el que se estableció que los pigmentos acilados constituyen más del 98% del contenido de AT en

tubérculos y tallos. Este tipo de antocianinas se caracterizan por ser bastante estables, por lo que pueden ser considerados como un colorante natural para la industria alimentaria. Los frutos altamente pigmentados han sido recomendados como una fuente de antocianina colorante, incluyendo extractos de arándanos, aronias y maíz morado entre otros, sin embargo, la composición de las antocianinas de estas fuentes convencionales está constituida principalmente por mono y di glucósidos no acilados, los cuales tienen una estabilidad limitada frente a la hidratación y los cambios de pH (Giusti y Wrostad, 2003). La acilación de la molécula de la antocianina aumenta su estabilidad mediante reacciones de asociación y co-pigmentación intramolecular y/o intermolecular. Por consiguiente, las antocianinas aciladas de las papas con pulpa morada y rosada pueden aportar la estabilidad necesaria para su aplicación en la industria alimentaria.

Lachman et al. (2009) caracterizaron las antocianidinas de papas de pulpa roja y morada de la Republica Checa mediante HPLC-DAD y observaron que, en las papas de pulpa roja y morada, la antocianidina más abundante fue la petunidina (46%), seguida por la malvidina (23%) y pelargonidina (22%) > cianidina (5%) > peonidina (3%) > delphinidina (0,2%). En este estudio se caracterizaron las antocianinas mediante HPLS-MS y se encontró que, en los cultivares de pulpa morada, la petudina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido, es la antocianina predominante, mientras que en los cultivares de papa con pulpa roja, la predominante fue la pelargonidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido. Resultados similares han sido publicados por Lewis et al. (1998) en papas de pulpa roja, indicando que el perfil de antocianinas en tubérculos de cultivares de papa coloreadas de rojo es dominado por la pelargonidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido. Sin embargo, los mismos autores observaron resultados distintos en papas de pulpa morada, lo cual explicaron debido a que el perfil de antocianinas en tubérculos coloreados de morado fue dominado por la malvidina glucósido de 3-O- $\rho$ -cumaroil rutinósido-5-

glucósido, seguido por la petunidina-3-O- $\rho$ -cumaroil rutinósido-5-glucósido.

#### **V.4.3. Actividad antioxidante en papas cocidas de pulpa morada y roja**

En todas las muestras, la AA determinada por ABTS fue significativamente mayor a la determinada por DPPH. Resultados similares se han encontrado para frutas, verduras y bebidas analizadas por ambos métodos (Floegel et al., 2011)

La AA de las muestras con pulpa morada, determinado mediante ABTS, osciló entre 8743 y 81314  $\mu\text{g}$  Equiv. Trolox/ g PS y de 5565 a 63339  $\mu\text{g}$  Equiv. Trolox/g PS determinado mediante DPPH (Tabla V.4). Por otra parte, la AA de las muestras con pulpa roja, determinada mediante ABTS, osciló entre 12,188 a 16,424  $\mu\text{g}$  Equiv. Trolox/ g PS y entre 5,479 y 7,963  $\mu\text{g}$  Equiv. Trolox/g PS cuando se determinó mediante DPPH (Tabla V.4).

Los cultivares 704852 y 704429, que son de pulpa morada, mostraron una AA (29 y 63  $\mu\text{g}$  Equiv. Trolox/g PS, determinado mediante el ensayo DPPH) significativamente mayor que los valores publicados por Xiuhong et al. (2012) para papas con pulpa morada usando el mismo ensayo (15,2 mg Equiv. Trolox/g). El mismo estudio ha reportado AA determinadas por DPPH en mora, frambuesa, fresa y arándano agrio entre 40 – 60 mg Equiv. Trolox /g.

En la Tabla V.5 se puede observar que la AA determinada por ambos métodos, ABTS y DPPH, se encuentra positivamente correlacionada con un alto grado de significación ( $r = 0,979$ ,  $p < 0,001$ ). Adicionalmente, la AA determinada por ambos métodos (ABTS y DPPH) se correlacionó significativa y positivamente con la concentración de los FT (para ABTS:  $r = 0,972$  y para DPPH:  $r = 0,970$ ,  $p < 0,001$ ); con la concentración de AT

(para ABTS:  $r = 0,973$  y para DPPH:  $r = 0,978$ ,  $p < 0,001$ ); y con la concentración de AC (para ABTS:  $r = 0,969$  y para DPPH:  $r = 0,968$ ,  $p < 0,001$ ).

Tabla V.5. Matriz de correlación entre actividad antioxidante (determinada por ABTS y DPPH), compuestos fenólicos totales, ácido clorogénico y antocianinas totales.

	ABTS	DPPH	FT	AC	AT
ABTS	1	0.9799***	0.9717***	0.9733***	0.9695***
DPPH		1	0.9701***	0.9788***	0.9686***
FT			1	0.9883***	0.9885***
AC				1	0.9787***
AT					1

\*\*\*  $p < 0,001$

#### V.4.4. Bioaccesibilidad del ácido clorogénico y antocianinas totales en papas cocidas de pulpa morada y rosada

En los siete cultivares andinos evaluados, la concentración de AC después de la digestión fue significativamente diferente con respecto a la concentración de AC antes de la digestión ( $p < 0,05$ ) (Tabla V.6). Sin embargo la bioaccesibilidad (%) del AC para los siete cultivares fue alta oscilando entre 82 y 110%, con concentraciones de AC bioaccesible entre 31,9 y 314 mg/100 g PF (Tabla V.6). Estos resultados indican que el AC es estable tanto cuando es sometido a las condiciones ácidas del estómago, como cuando se somete a las condiciones del intestino.

Bermúdez-Soto et al. (2007) han observado que en jugos de aronias, los niveles de ácido neo-clorogénico disminuyeron un 28% después de la digestión pancreática *in vitro* y que los niveles del AC aumentaron cerca del 24% después de la digestión pancreática *in vitro*. Ellos explicaron el

incremento de AC como consecuencia de la isomerización entre el ácido neoclorogénico y el AC durante la incubación pancreática.

Tabla V.6. Concentración de ácido clorogénico (AC) en los siete cultivares andinos de papa con pulpa morada y rosada estudiados, antes y después de la digestión y porcentaje de bioaccesibilidad.

Número CIP	AC (mg/100 g PF)		% Bioaccesibilidad
	Antes de la digestión	Después de la digestión	
702453	29,07 ± 2,04	31,90 ± 0,50	110
703268	49,56 ± 2,30	51,82 ± 1,47	105
700234	48,53 ± 1,18	53,00 ± 3,26	109
703488	103,29 ± 2,54	85,22 ± 11,88	82
705534	79,38 ± 2,33	72,95 ± 1,56	92
704058	188,70 ± 10,63	165,04 ± 5,10	87
704429	394,83 ± 16,43	314,32 ± 5,54	80

<sup>1</sup>Valores medios ± desviación estándar (n = 3).

Tagliacruzchi et al. (2010) han observado que el contenido de ácido cafeico en uvas se reduce en un 75% después de la digestión *in vitro*. Se ha observado que la absorción intestinal del ácido cafeico (95%) es mucho mayor que la del AC (33%) (Scalbert et al., 2002). Sin embargo, se ha demostrado que los diferentes isómeros del AC del café experimentan un metabolismo extensivo en el intestino delgado antes de su absorción (Olthof et al., 2003). Además, cuando pasa al intestino grueso el AC produce su propio y único espectro de catabolitos por acción de la microflora colónica, los cuales una vez absorbidos pueden ser excretados en la orina en cantidades sustanciales. El nivel de la excreción urinaria refleja que cantidades sustanciales de los catabolitos del colon son absorbidos hacia la vena porta y pasa por el cuerpo a través de la circulación sanguínea antes de la excreción. Esto puede suponer aproximadamente un 29% de la ingesta, después del consumo de café. En base a una dieta rica en fruta y vegetales, algunos de estos compuestos

pueden tener un papel importante como compuestos anti-inflamatorios, lo cual ha sido demostrado en modelos experimentales (Del Rio et al., 2010).

La bioaccesibilidad de las AT en los siete cultivares evaluados osciló entre 73 y 74%, con niveles de AT bioaccesibles que se extienden entre 13,5 y 372 mg/100g PF (Tabla V.7).

Tabla V.7. Concentración de antocianinas totales (AT) en los siete cultivares andinos de papa con pulpa morada y rosada estudiados, antes y después de la digestión y porcentaje de bioaccesibilidad.

Número CIP	AT (mg/100 g PF)		% Bioaccesibilidad
	Antes de la digestión	Después de la digestión	
702453	17,72 ± 0,23	13,50 ± 0,34	76
703268	49,87 ± 0,84	39,68 ± 1,73	80
700234	53,39 ± 0,77	39,12 ± 1,28	73
703488	77,94 ± 0,66	49,38 ± 2,31	63
705534	117,02 ± 1,17	94,65 ± 2,21	81
704058	207,65 ± 2,94	173,96 ± 6,07	84
704429	460,69 ± 2,46	372,44 ± 10,78	81

<sup>1</sup>Valores medios ± desviación estándar (n = 3).

Los valores de bioaccesibilidad encontrados en este estudio son mayores que los indicados para aronias (57%, Bermúdez-Soto et al., 2007), uvas (8%, Tagliazucchi et al., 2010) y arándano agrio (5%, McDougall et al., 2005). Las diferencias en la bioaccesibilidad de las antocianinas de la papa comparada con la de las aronias, uvas y arándanos agrios pueden ser explicadas por las diferencias entre los tipos de antocianinas presentes en estos alimentos. Los cultivares de papa con pulpa morada evaluados en este estudio poseen antocianinas aciladas tales como: (petunidina-3-(cumaroil)rutinósido-5-glucósido, peonidina-3-(cumaroil)rutinósido-5-glucósido, cianidina-3-(cumaroil)rutinósido-5-glucósido), y la mayor proporción de antocianinas en las papas de pulpa

rosada son también antocianinas aciladas tales como: (pelargonidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido, peonidina-3-(cumaroil)rutinósido-5-glucósido y cianidina-3-(cumaroil)rutinósido-5-glucósido), mientras que la principal antocianina de las aronias (cianidina 3-galactósido y cianidina 3-arabinosido), de la frambuesa (delfinidina 3-galactósido, delfinidina 3-galactósido y cianidina 3-rutinósido) y de la uva (malvidina 3-glucósido) son antocianinas no aciladas. Las antocianinas aciladas son más resistentes al aumento de pH que las no aciladas, y en consecuencia, resisten mejor la fase intestinal de la digestión. En medio acuoso fuertemente ácido (pH  $\approx$  1), el catión flavilio de color rojo es la especie predominante. Las antocianinas no aciladas son estables solo a valores de pH, en los que los cationes de flavilio son predominantes. Entre los valores de pH de 2 y 4, prevalece la especie inestable quinonoidal azul sin carga, y si el pH aumenta, la ionización de los grupos hidroxilo forman la especie inestable quinonoidal aniónica. A pH entre 5 y 6, las antocianinas no aciladas son inestables mientras que a pH mayores de 6, las antocianinas aciladas se degradan dependiendo de los grupos sustituyentes (Bkowska-Barczak, 2005; Giusti y Wrolstad, 2003).

Según Aura et al. (2005) solo una pequeña parte de las antocianinas de la dieta son absorbidas. Una elevada cantidad de las antocianinas ingeridas llegan al colon, donde son expuestas a la microflora colónica pudiendo ser hidrolizadas liberando un azúcar y el compuesto fenólico libre correspondiente, el cual es posteriormente degradado mediante ruptura del anillo-C a productos de ácidos fenólicos y aldehídos (McGhie y Walton, 2007). Los metabolitos originados por esta acción microbiana sobre las antocianinas pueden contribuir a la mejorar el estado de salud, ya sea directamente en el tracto gastro-intestinal o después de su absorción en el colon a nivel sistémico (Aura et al., 2005).

## **VI. CONCLUSIONES**

Las conclusiones que se extraen de cada uno de los artículos que constituyen este trabajo se resumen a continuación:

Del artículo titulado “Efecto de la cocción en la concentración de carotenoides de papas nativas Andinas” se concluye que la cocción reduce significativamente las concentraciones de violaxantina y anteraxantina pero no necesariamente la concentración de luteína y zeaxantina, las cuales inclusive, para algunos cultivares fueron mayores después de la cocción. El cultivar de pulpa amarillo intermedio, 701862, presentó la concentración más alta de luteína (sobre los 200  $\mu\text{g}/100\text{ g PS}$ ) y el cultivar de pulpa amarillo oscuro, 704218, presentó la concentración más alta de zeaxantina (sobre los 1000  $\mu\text{g}/100\text{ g PS}$ ) tanto en tubérculos crudos como cocidos. Los cultivares de pulpa amarillo oscuro son una fuente significativa de zeaxantina.

Del artículo titulado “Efecto de la cocción en la concentración de fenoles totales, antocianinas totales y ácidos fenólicos y actividad antioxidante en papas de pulpa morada” se concluye que para todos los cultivares evaluados la concentración de FT (compuestos fenólicos totales) y la AA (actividad antioxidante) en tubérculos cocidos fue mayor que en tubérculos crudos. Sin embargo, exceptuando el cultivar de pulpa morado oscuro 704429, las concentraciones de AT (antocianinas totales) y AC (ácido clorogénico) en tubérculos crudos y cocidos no fueron diferentes significativamente. El AF (ácido fenólico) predominante en tubérculos crudos y cocidos de los cultivares con pulpa morada evaluados fue el AC. El ACa (ácido cafeico) también estuvo presente en tubérculos crudos pero disminuyó drásticamente en los tubérculos cocidos de todos los cultivares. Las papas cocidas con pulpa morada son una buena fuente de AT y muestran alta AA.

En relación a la optimización de métodos incluida en el artículo: “Efecto de la cocción en la concentración de fenoles totales, antocianinas

totales y ácidos fenólicos y actividad antioxidante en papas de pulpa morada”, se concluye que la eficacia de la extracción de FT y antioxidantes en muestras liofilizadas y molidas de papas crudas y cocidas es afectada fuertemente por la concentración de metanol. El uso de metanol al 80% produjo un mayor rendimiento de la extracción de FT y antioxidantes en muestras crudas, mientras que el metanol al 60% dio un mayor rendimiento en muestras cocidas.

Del artículo titulado “Bioaccesibilidad *in vitro* de luteína y zeaxantina en papas cocidas de pulpa amarilla” se concluye que la estabilidad digestiva de luteína y zeaxantina en los cultivares evaluados fue alta, entre 70 y 95%. La EM (eficiencia de la micelarización) osciló entre 33 a 71% para luteína y entre 51 a 71% en zeaxantina, siendo el cultivar 701862 el que mostró la cantidad más alta de luteína bioaccesible (280 µg/100 g PS) y los cultivares 703566 y 704218, los que mostraron la cantidad más alta de zeaxantina bioaccesible (sobre 600 µg/100 g PS).

Del artículo titulado “Concentración y bioaccesibilidad del ácido clorogénico y antocianinas de papas moradas y rojas cocidas” se concluye que la bioaccesibilidad de AC y AT en los cultivares evaluados fue alta (82 - 110% y 73 - 84%, respectivamente) y que los cultivares con pulpa color morado oscuro: 704058 y 704429, tuvieron las concentraciones más altas de AC bioaccesible (165 mg/ 100 g PF y 314 mg/ 100 g PF, respectivamente) y de AT bioaccesible (174 mg/100 g PF y 372 mg/ 100 g PF, respectivamente). También se concluyó que la mayoría de las antocianinas presentes en el tubérculo cocido de los cultivares evaluados fueron aciladas y que, mientras en los cultivares de pulpa morada la antocianina predominante fue la petunidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido (37 al 78% de las AT), en los cultivares de pulpa rojiza, la antocianina predominante fue la pelargonidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido (41 al 75% de las AT). La AA estuvo significativamente correlacionada con la concentración de FT, AT y AC.

Como conclusiones generales de este trabajo de tesis se pueden extraer las siguientes:

- ✓ La cocción redujo significativamente las concentraciones de violaxantina y anteraxantina, pero no necesariamente la concentración de luteína y zeaxantina en los tubérculos de papa.
- ✓ Las concentraciones de FT y los niveles de AA en tubérculos cocidos fueron mayores que en tubérculos crudos. Sin embargo, con la excepción del cultivar 704429, las concentraciones de AT y AC en tubérculos crudos y cocidos no fueron diferentes significativamente.
- ✓ La mayoría de las antocianinas presentes en el tubérculo cocido de los cultivares evaluados fueron aciladas y mientras en los cultivares de pulpa morada, la antocianina predominante fue la petunidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido, en los cultivares de pulpa rojiza, la antocianina predominante fue la pelargonidina-3-(cumaroil) rutinósido-5-glucósido.
- ✓ Si bien la estabilidad digestiva de luteína y zeaxantina en todos los cultivares evaluados fue alta, entre 70 y 95%, la EM o bioaccesibilidad osciló entre 33 a 71% para luteína y entre 51 a 71% en zeaxantina.
- ✓ La bioaccesibilidad de AC y AT en todos los cultivares evaluados fue alta (82 - 110% y 73 - 84%, respectivamente).
- ✓ Los cultivares de pulpa amarilla intensamente oscura son una fuente significativa de zeaxantina bioaccesible y los cultivares de pulpa morada intensamente oscura son una fuente significativa de AC y AT bioaccesible a la dieta humana, especialmente en poblaciones con alto consumo de papas con pulpa amarilla y morada.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Almeida L, Penteado M. 1988. Carotenoids and provitamin A value of white fleshed Brazilian sweetpotatoes (*Ipomoea batatas* Lam). *Journal of Food Composition and Analysis*, 1, 341–352.
- American Optometric Association. 2009. Diet, nutrition and eye health. [http://www.aoa.org/documents/nutrition/Diet\\_Nutrition:Eye\\_Health\\_booklet.pdf](http://www.aoa.org/documents/nutrition/Diet_Nutrition:Eye_Health_booklet.pdf)
- Andre CM, Oufir M, Guignard C, Hoffmann L, Hausman J, Evers Larondelle, et al. 2007. Antioxidant profiling of native andean potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) reveals cultivars with high levels of b-carotene, a-tocopherol, chlorogenic acid and petanin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10839–10849.
- Aura AM, Marín-Lopez P, O’Leary KA, Willianson G, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K, Santos-Buelga C. 2005. In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European Journal of Nutrition*, 44, 133-142.
- Balík J, Kumšta M, Rop O. 2013. Comparison of anthocyanins present in grapes of *Vitis vinifera* L. varieties and interspecific hybrids grown in the Czech Republic. *Chemical Papers*, 67 (10),1285-1292.
- Belanger J, Johns T. 2008. Biological diversity, dietary diversity, and eye health in developing country populations: Establishing the evidence-base. *Eco Health*, 5, 244–256.
- Bermúdez-Soto MJ, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT. 2007. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102, 865–874.
- Blessington T, Nzaramba MN, Scheuring D, Hale AL, Reddivari L, Miller Jr. JC. 2010. Cooking methods and storage treatments of potato: effects on carotenoids, antioxidant activity, and phenolics. *American*

- Journal of Potato Research*, <http://dx.doi.org/10.1007/s12230-010-9150-7>.
- Bonierbale M, Burgos G, zum Felde T, Sosa P. 2010. Composition nutritionnelle des pommes de terre. *Cahiers de nutrition et diététique*, 45, S28- S36.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 25–30.
- Brenna OV, Berardo N. 20 04. Applications of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to the evaluation of carotenoids in maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5577–5582.
- Breithaupt D, Bamedi A. 2002. Carotenoids and carotenoid esters in potatoes (*Solanum tuberosum* L.): New insight into an ancient vegetable. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7175-7181.
- Brown CR. 2005. Antioxidants in potato. Invited review. *American Journal of Potato Research*, 82, 163–172.
- Burgos G, Amoros W, Morote M, Stangoulis J, Bonierbale M. 2007. Iron and Zinc Concentration of native Andean potato varieties from a human nutrition perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 668-675.
- Burgos G, Auqui S, Amoros W, Salas E, Bonierbale M. 2009. Ascorbic acid concentration of native Andean potato varieties as affected by environment, cooking and storage. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22 (6), 533–538.
- Burgos G, Salas E, Amoros W, Auqui M, Muñoa L, Kimura M, Bonierbale M. et al. 2009. Total and individual carotenoid profiles in the Phureja group of cultivated potatoes: I. Concentrations and relationships as determined by Spectrophotometry and High Performance Liquid

- Chromatography (HPLC). *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 503–508.
- Burmeister A, Bondiek S, Apel L, Kuhne C, Hillebrand S, Fleishman P. 2011. Comparison of carotenoid and anthocyanin profiles of raw and boiled *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja* tubers. *Journal of Food Composition and Analysis*, doi:10.1016/j.jfca.2011.03.006.
- Camire ME, Kubow S, Donnelly DJ. 2009. Potatoes and Human Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 823-840.
- Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández ML, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859–871.
- Cevallos-Casals B, Cisneros Zevallos L. 2003. Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean purple corn and red-fleshed sweet potato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3313–3319.
- Cheng CY, Chung WY, Szeto YT, Benzie IFF. 2005. Fasting plasma zeaxanthin response to *Fructus barbarum* L. (wolfberry; kei tze) in a food-based human supplementation trial. *British Journal of Nutrition*, 93, 123-30.
- Chitchumroonchokchai C, Schwartz SJ, Failla ML. 2004. Assessment of lutein bioavailability from meals and supplement using simulated digestion and Caco Human Intestinal Cells. *Journal of Nutrition*, 134, 2280-2286.
- Chitchumroonchokchai Ch, Failla M. 2006. Hydrolysis of Zeaxanthin Esters by Carboxyl Ester Lipase during Digestion Facilitates Micellatization and Uptake of the Xanthophyll by Caco-2 Human Intestinal Cells. *Journal of Nutrition*, 136, 588-594.

- Clevidence B, Haynes KG, Rao DD, Novotny DJ. 2005. Effect of cooking method on xanthophyll content of yellow-fleshed potato. *United States Japan Natural Resources Protein Panel*, 34, 280–284.
- Clevidence B, Paetau I, Smith C. 2000. Bioavailability of carotenoids from vegetables. *HortScience*, 35(4), 585–588.
- Clifford MN. 1999. Review: Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 362–372.
- Dai J, Mumper R. 2010. Review plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313–7352.
- De Mendiburu, F. 2010. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.0-9.
- Del Rio D, Stalmach A, Calani L, Crozier A. 2010. Review: Bioavailability of Coffee Chlorogenic Acids and Green Tea Flavan-3-ols. *Nutrients*, 2, 820-833.
- Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (10), 3010–3014.
- Duthie G, Duthie S, Kyle J. 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Review*, 13, 79–106.
- Englyst HN, Kingman SM, Cummings JH. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46, S53-S50.
- Estrada RN. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. CIP-IPGRI-PRACIPA-IBTA-PROINPA-COSUDE-CID.
- Failla M, Chitchumroonchokchai C. 2005. In vitro models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in

- foods. HarvestPlus Technical Monograph 3. Washington, DC and Cali; IFPRI and CIAT.
- Failla ML, Huo T, Thskkar SK. 2008. In vitro screening of relative bioavailability of carotenoids from foods. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17, 200-203.
- FAOSTAT. 2012. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Fernández-García E, Carvajal-Lérida I, Pérez-Gálvez A. 2009. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29, 751-760.
- Floegel A, Kim D, Chung S, Koo S, Chun O. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 1043-1048.
- Fraser P, Bramley P. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43, 228-265.
- Friedman M. 1996. A review: Nutritional value of proteins from different food sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 6-29.
- García-Alonso M, Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo J. 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry*, 84, 13-18.
- Giusti MM, Wrolstad RE. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14, 217-225.
- Gody H, Rodríguez-Amaya D. 1987. Changes in individual carotenoids on processing and storage of mango (*Mangifera indica*) slices and pure. *International Journal of Food Science and Technology*, 22, 451-460.
- Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Pérez-Sacristán B, Blanco-Navarro I, Blásquez-García S. 2007. Comparative in Vitro bioaccessibility of carotenoids from relevant

- contributors to carotenoids intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6387-6390.
- Griffiths W, Dale F, Morris W, Ramsay G. 2007. Effects of season and postharvest storage on the carotenoid content of *Solanum phureja* potato tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 379–385.
- Hart DJ, Scott KJ. 1995. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, 54, 101–111.
- Holst B, Williamson G. 2008. Nutrients and phytochemicals from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 73-82.
- Hosseini FS, Bea T. 2007. Saskatoon and wild blueberries have higher antho-cyanin content than other Manitoba berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (26), 10832–10838.
- IOM. 2000 . DRI Dietary Reference intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington DC: National Academy Press.
- Iwanski W, Tevini M, Stute R, Hilbert R. 1983. Carotinoidgehalt und-Zusammensetzung verschiedener deutscher Kartoffelsorten und deren Bedeutung für die Fleischfarbe der Knolle. *Potato Research*, 26, 149–162.
- Jansen G, Flamme W. 2006. Coloured potatoes (*Solanum tuberosum* L.) – antho-cyanin content and to tuber quality. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 1321–1331.
- Jansen G, Flamme W, Schuler K, Vandrey M. 2001. Tuber and starch quality of wild and cultivated potato species and cultivars. *Potato Research*, 144, 137-146.

- Khachik F, Goli M, Beecher G, Holden J, Lusy W, Tenorio M, et al. 1992. Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 390–398.
- Kimura M, Kobori CK, Rodriguez-Amaya DB, Nestel P. 2007. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweetpotato, cassava and maize for plant breeding trials. *Food Chemistry*, 100, 1734–1746.
- Kimura M, Rodriguez-Amaya DB. 2003. Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2603–2607.
- Kospell D, Kospell D. 2006. Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. *TRENDS in Plant Science*, 11(10).
- Krinky NI, Jhonson EJ. 2005. Carotenoide actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516.
- Kumar D, Singh BP, Kumar P. 2004. An overview of the factors affecting sugar content of potatoes. *Annals of Applied Biology*, 145, 247-256.
- Kurilich AC, Juvich JA. 1999. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1948-1955.
- Lachman J, Hamouz K. 2005. Red and purple colored potatoes as significant antioxidant source in human nutrition – a review. *Plant Soil and Environment*, 11, 477–482.
- Lachman J, Hamouz K, Orsa´k M, Pivec V, Hejtmánková K, Pazderu K, Dvorá k P, Cepl J. 2012. Impact of selected factors – cultivar, storage, cooking and baking on the content of anthocyanins in coloured-flesh potatoes. *Food Chem-istry*, 133, 1107–1116.
- Lachman J, Hamouz K, Musilova J, Hejtmankova K, Kotikova Z, Pazderu K, Domkarova J, Pivec V, Cimr J. 2013. Effect of peeling and three cooking methods on the content of selected phytochemicals in

- potato tubers with various colour of flesh. *Food Chemistry*, 138, 1189-1197.
- Lachman J, Hamouz K, Sulc M, Orsak M, Pivec V, Hejtmankova A, et al. 2009. Cultivar differences of total anthocyanins and anthocyanidins in red and purple-fleshed potatoes and their relation to antioxidant activity. *Food Chemistry*, 114, 836–843.
- Landrum J, Bone R. 2001. Lutein, zeaxanthin and macular pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385, 28–40.
- Lewis C, Walker J, Lancaster J, Sutton K. 1998. Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: Colored cultivars of *Solanum tuberosum* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 45–57.
- Lu W, Haynes K, Wiley E, Clevidence B. 2001. Carotenoid content and color in diploid potatoes. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 126, 722–726.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Mattila P, Hellstrom J. 2006. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 152–160.
- McDougall GJ, Fyffe S, Dobson P, Stewart D. 2005. Anthocyanins from red wine – Their stability undersimulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66, 2540-2548.
- McGhie TK, Walton M. 2007. Review: The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57, 702-713.
- Michiels JA, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, Dommes J. 2012. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, 130, 986–993.

- Miglio C, Chiavaro E, Visconti A, Fogliano V, Pellegrini N. 2008. Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 139–147.
- Minguez-Mosquera M, Hornero-Mendez D. 1994. Comparative study of the effect of paprika processing on the carotenoids in peppers (*Capsicum annum*) of Bola and Agridulce varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 555, 1560.
- Muller H. 1997. Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection. *A Lebensm Unters Forsch*, 204, 88–94.
- O'Connell O, Ryan L, O'Brien N. 2007. Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutrition Research*, 27, 258-264.
- Olthof MR, Hollman PC, Buijsman MN, van Amelsvoort JM, Katan MB. 2003. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. 2003. *Journal of Nutrition*, 133(6), 1806-1814.
- Ovchinnikova A, Krylova E, Gavrilenko T, Smeckalova T, Zhuk M, Knapp S, Spooner D. 2011. Taxonomy of cultivated potatoes *Solanum* section *Petota*: Solanaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165, 107-155.
- Palozza P, Krinsky NI. 1992. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: An overview. *Methods Enzymology*, 213, 403-420.
- Pascual-Teresa S, Sanchez-Ballesta MT. 2008. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews*, 7, 281–299.
- Pellegrini N, Colombi B, Salvatore S, Brenna OV, Galaverna G, Del Rio D. 2007. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 (1), 103–111.

- Perla V, et al. 2011. Effects of cooking methods on polyphenols, pigments and antioxidant activity in potato tubers. *LWT - Food Science and Technology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.08.005>.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods, and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4290–4302.
- Puchau B, Zulet MA, Gonzalez de Echavarri A, Hermsdorff HH, Martinez JA. 2010. Dietary total antioxidant capacity is negatively associated with some metabolic syndrome features in healthy young adults. *Nutrition*, 26 (5), 534–541.
- R Development Core Team. 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. , ISBN: 3- 900051-07-0, <http://www.R-project.org/>.
- Rao V, Rao L. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55, 207–216.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans CA. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Reyes, Miller LF, Cisneros-Zevallos JC. 2005. Antioxidant capacity, anthocyanins and total phenolics in purple and red fleshed potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes. *American Journal of Potato Research*, 82, 271–277.
- SAS. 2008. SAS/STAT 9.2. Users Guide. Cary, NC; SAS Institute Inc.
- Richelle M, Tavazzi I, Offord E. 2001. Comparison of the Antioxidant Activity of Commonly Consumed Polyphenolic Beverages (Coffee, Cocoa, and Tea) Prepared per Cup Serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3438–3442.

- Rodriguez-Amaya D. 1997. Carotenoides y Preparación de Alimentos: La Retención de los Carotenoides Provitamina A en Alimentos Preparados, Procesados y Almacenados. John Snow, Inc./OMNI Project, 99p.
- Rodriguez-Amaya D. 2001. A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI Press, Washington,DC.
- Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy flavonoids. *Journal of Chromatography*, 1012, 119–128.
- Ryan L, Connell O, Sullivan O, Aherne S, Brien N. 2008. Micellarization of carotenoids from raw and cooked vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63, 127-133.
- Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101, 492-501
- Scalbert A, Monrad C, Manach C, Remesy C. 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56, 276-282.
- Seddon J, Ajan U, Sperduto R. 1994. Dietary carotenoids. Vitamin A, C and E and age related macular degeneration. *Journal of the American Dietary Association*, 273, 1413–1420.
- Serrano J, Goñi I, Saura-Calixto. 2005. Determination of  $\beta$ -caroteno and lutein available from green leafy vegetables by an in vitro digestion and colonic fermentation method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2936-2940.
- Sies H. 2010. Polyphenols and health: Update and perspectives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501, 2–5.
- Spanos GA, Wrolstad RE. 1992. Phenolics of Apple, Pear, and White Grape Juices and Their Changes with Processing and Storage-A Review?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1478-1487.

- Stalmach A, Steiling H, Williamson G, Crozier A. 2010. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501, 98–105.
- Tagliacruzchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte. 2010. In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120, 599-606.
- Tee ES, Lim CL. 1991. Carotenoid composition and content of Malaysian vegetables and fruits by AOAC and HPLC methods. *Food Chemistry*, 41, 303–339.
- Van het Hof K, West C, Weststrate J, Hautvast J. 2000. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *Journal of Nutrition*, 130, 503-506. ISSN 0022-3166.
- Verde M, Rodríguez D, Rodríguez E, Díaz C. 2004. Content of free phenolic compounds in cultivars of potatoes harvested in Tenerife (Canary Islands)? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (5), 1323–1327.
- Wada L, Ou B. 2002. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon cane-berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (12), 3495–3500.
- Waterhouse A. 2002. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. *University of California, Davis, USA*, pp. I1.1.1–I.1.1.8.
- Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. 2006. Concentration of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (11), 4069–4075.
- Xiaoyun X, Wende L, Zanhui L, Trust B, Arnie WH. 2009. Phenolic content, composition, antioxidant activity, and their changes during domestic cooking of potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10231–10238.

- Yamaguchi T, Mizobuchi T, Kajikawa R, Kawashima H, Miyabe F, Terao J, Takamura H, Matoba T. 2001. Radical-scavenging activity of vegetables and the effect of cooking on their activity. *Food Science and Technology Research*, 7, 250–257.
- Yang M, Koo SI, Song WO, Chun OK. 2011. Food Matrix Affecting Anthocyanin Bioavailability: Review. *Current Medicinal Chemistry*, 18 (2), 291-300.
- Yeum K, Russell R. 2002. Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annual Review of Nutrition*, 22, 483-504.