

INFORME FINAL

Recepción y tratamiento de las muestras

Las zanahorias naranjas y moradas se reciben en el ICTAN, se cortan en rodajas de aproximadamente 0.5 cm de grosor, descartando los extremos y se muelen empleando un homogeneizador.

1) MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos empleados

Metanol, (MeOH) de grado HPLC suministrado por VWR (Pensilvania, EE. UU.) y cloroformo por LabScan (Bangkok, Tailandia). El DPPH, la 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), el cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), el cloruro de potasio, el hidróxido de sodio (NaOH) y los estándares de acetato de sodio anhidro se adquirieron de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El etanol (EtOH), el pentano, el ciclohexano y el ácido clorhídrico (HCl) suministrados por Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, España). El agua destilada se obtiene de un sistema de purificación (Macron Fine Chemicals, EE. UU.). El agua Milli-Q se produjo mediante un sistema de purificación de agua Elix 3 Millipore acoplado a un módulo Milli-Q (modelo Advantage A10) (Millipore, Molsheim, Francia). Todos los productos químicos, disolventes y reactivos fueron de grado analítico.

Cálculo de la humedad de las muestras

El contenido de humedad de las zanahorias naranjas y moradas se calcula gravimétricamente mediante secado hasta peso constante. Para ello las muestras cortadas se introducen en crisoles en una estufa de aire forzado (Selecta EQ-088-CAM, Barcelona, España). Este proceso se realiza por cuadruplicado y es necesario para proporcionar los resultados en peso seco (dry weight, DW).

Extracción de las muestras para los métodos de capacidad antioxidante (DPPH y FRAP) y contenido en antocianinas totales (TAC)

Se pesa una cantidad de muestra y se añade el disolvente de extracción en proporción 1:2. Se homogeneiza la mezcla empleando un Ultra-Turrax (T18 Digital, IKA, Staufen, Alemania) y se agita durante 1 h a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Se centrifuga y se filtra el sobrenadante. El proceso de purificación de las muestras se lleva a cabo empleando pentano, ciclohexano y cloroformo. Se reduce el volumen de la fase acuosa en un rotavapor y se analiza. Los extractos se realizan por cuadruplicado para cada una de las dos variedades de zanahorias proporcionadas.

Análisis químicos

A) Capacidad antioxidante mediante los métodos DPPH y FRAP

Se realiza mediante los ensayos de DPPH (Smith et al., 1987) y FRAP (Benzie & Strain, 1996). Inicialmente, se preparan las disoluciones de trabajo de los reactivos DPPH* y FRAP. Para el estándar DPPH*, el reactivo comercial se disuelve en MeOH (1000 μM). Para el FRAP, se prepara una mezcla de tampón de acetato (0,3 M) a pH 3,6 con 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) en HCl

(40 mM) y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) en una proporción de 10:1:1. Se siguió el mismo procedimiento para ambos ensayos: cada pocillo se llena con 290 μl de reactivo DPPH* o FRAP y 10 μl del extracto. La mezcla se incuba a 37 °C en oscuridad durante diferentes tiempos: 30 min para DPPH y 20 min para FRAP. La absorbancia se mide a diferentes longitudes de onda empleando un lector de placas (PowerWave): 515 nm para DPPH y 593 nm para FRAP. Cuando es necesario se diluyen los extractos. Se obtuvieron blancos de las soluciones de reactivo DPPH* y FRAP. Los resultados se expresan como mg de equivalentes de Trolox/g DW (mg TE/g DW) para ambos ensayos.

B) Contenido de Antocianinas Totales (TAC)

Se determina mediante el método diferencial de pH (Giusti y Wrolstad, 2001). Los extractos se diluyen inicialmente con dos soluciones tampón: cloruro de potasio 0,025 M a pH 1 y acetato de sodio 0,4 M a pH 4,5. Las mediciones se realizan en el lector de placas a 520 y 700 nm. Los resultados se expresan como μg de equivalentes de cianidina-3-O-glucósido/g DW (μg EC3G/g DW). La estimación de la absorbancia se realiza mediante la ecuación (1).

$$Ec (1) \text{ Abst} = (\text{Abs}_{520\text{nm}} - \text{Abs}_{700\text{nm}})_{\text{pH}=1} - (\text{Abs}_{520\text{nm}} - \text{Abs}_{700\text{nm}})_{\text{pH}=4,5}.$$

C) Extracción y análisis del Contenido Total de Carotenoides (TCC)

El extracto de carotenoides de las muestras de zanahoria se realiza siguiendo el procedimiento descrito por Kultys & Kurek, 2022. Se pesa la muestra y se añade el disolvente de extracción. Se homogeneiza utilizando el homogeneizador Ultra-Turrax y se filtra. Se emplea la cantidad de disolvente de extracción necesaria hasta que la muestra se queda incolora. Posteriormente, se añade hexano y se agita. Finalmente, se recoge el hexano, se diluye en la proporción adecuada y se realiza la medida de su absorbancia a 450 nm utilizando el mismo equipo empleado anteriormente para las medidas de la actividad antioxidante y TAC. La concentración de los carotenoides totales se calcula según Britton (1998) aplicando la ecuación (2):

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/g FW}) = \frac{\text{Absorbancia} \times \text{FD} \times V(\text{mL}) \times 10^6}{(A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100) \times m_{\text{muestra}}(\text{g})}$$

Los resultados se expresan como μg equivalentes de β -carotenoide/g DW (μg E β C/g DW). Las extracciones de carotenoides y medidas espectrofotométricas se realizaron por cuadruplicado.

D) Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se lleva a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.I software, versión 17.2.07 (Statpoint Technologies, Inc.). Las diferencias fueron establecidas usando la prueba Scheffe ($p \leq 0.05$).

2) RESULTADOS

La tabla 1 presenta los valores de actividad antioxidante mediante los métodos de DPPH y FRAP así como los de TAC y TCC.

- Las muestras de zanahoria morada proporcionadas por la empresa presentan una actividad antioxidante significativamente superior a las zanahorias naranjas analizadas y procedentes de la misma empresa. En concreto, la actividad antioxidante fue 13 y 34 veces superior de la zanahoria morada a la zanahoria naranja cuando se emplea el método DPPH y FRAP, respectivamente.
- Las zanahorias naranjas analizadas no contienen antocianinas. Sin embargo, las zanahorias moradas suelen presentar un elevado contenido en antocianinas. Las zanahorias moradas analizadas en este estudio presentaron un valor de TAC de $1.19 \pm 0.27 \mu\text{g EC3G/g DW}$. De hecho, el elevado contenido de antocianinas en las zanahorias moradas es la característica distintiva de esta variedad con respecto a las zanahorias convencionales. Las antocianinas no sólo son las responsables de su intenso color, sino que además son unos de los antioxidantes más potentes que existen en la naturaleza, contribuyendo de manera especial a las propiedades antioxidantes, entre otras propiedades biológicas, de las zanahorias moradas.
- El valor de contenido en carotenoides totales (TCC) en las zanahorias naranjas fue superior al de las zanahorias moradas, debido a la presencia principalmente de β -caroteno y α -caroteno. Sin embargo, la diferencia no fue demasiado grande y se podría decir que el contenido de TCC en las zanahorias moradas fue igualmente satisfactorio.

Tabla 1. Resultados obtenidos de actividad antioxidante, mediante los métodos de DPPH y FRAP, así como los de TAC y TCC

MUESTRAS	Actividad Antioxidante (mg TE/g DW)		($\mu\text{g EC3G/g DW}$)	($\mu\text{g E}\beta\text{c/g DW}$)
	DPPH	FRAP	TAC	TCC
Z. NARANJA	1.28 ± 0.01^a	0.51 ± 0.02^a	n.d.	64.6 ± 0.04^b
Z. MORADA	16.92 ± 0.01^b	17.56 ± 0.02^b	1.19 ± 0.27	51.7 ± 0.03^a

3) BIBLIOGRAFÍA

- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant Anal. Biochem. 239, 70-76.
- Britton, G. Carotenoids. In Methods in Plant Biochemistry, Volume 7. Terpenoids; Dey, P.M., Harborne, J.B., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1998; pp. 473-518
- Kultys, E. & Kurek, M.A. Green extraction of carotenoids from fruit and vegetable byproducts: A review. Molecules 2022, 27, 518-532.
- Smith, R.C., Reeves, J.C., Dage, R.C. & Schnettler, R. A. (1987). Antioxidant properties of 2 imidazolones 2-imidazolthiones. Biochem. Pharmacol., 36, 1457-1460.