

Carotenoides en agroalimentación y salud

Antonio J. Meléndez-Martínez
Coordinador



Carotenoides en agroalimentación y salud

Primera edición: noviembre de 2017

Comité Editorial

Dra. Lourdes Gómez Gómez

Facultad de Farmacia/Instituto Botánico
Universidad de Castilla-La Mancha, sede de Albacete

Dr. Dámaso Hornero Méndez

Instituto de la Grasa
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Dr. Antonio J. Meléndez-Martínez

Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla

Dra. Begoña Olmedilla Alonso

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y
Nutrición

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Dr. Antonio Pérez Gálvez

Instituto de la Grasa
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Coordinador general: Antonio J. Meléndez-Martínez

D.R. © Aguilar-Espinosa, Margarita; Alcalde, María Jesús; Alonso, Gonzalo L.; Álvarez, Rocío; Angaman, Djédoux Maxime; Arhazem, Oussama; Ávalos, Javier; Bagur, María José; Benítez-González, Ana; Berman, Judit; Bonet, María Luisa; Boronat, Albert; Canas, Jose A.; Capell, Teresa; Cárdenas-Conejo, Yair; Carle, Reinhold; Cerda, Ariel; Chacón-Ordóñez, Tania; Christou, Paul; Cuéllar, Fabio A.; De Pourcq, Karel; Dias, Maria Da Graça; Esquivel, Patricia; Estévez-Santiago, Rocío; Farre, Gemma; Gallardo-Guerrero, Lourdes; Gámbaro, Adriana; Gandul-Rojas, Beatriz; García Romero, Josefa; García-Rodríguez, María del Valle; Garrido-Fernández, Juan; Garza-Caligaris, Luz Elena; Gavilán Bravo, Andrés; Ginés, Rafael; Godoy-Hernández, Gregorio; Gómez-Gómez, Lourdes; Hempel, Judith; Heredia, Francisco J.; Hernández-Gras, Francesc; Hornero Méndez, D.; Izquierdo, Marisol; Jarén-Galán, Manuel; Jiménez, Víctor M.; Lado, Joanna; Limón, M. Carmen; Lugo-Cervantes, Eugenia; Luque de Castro, Maria Dolores; Maldonado, Eliana M.; Mapelli-Brahm, Paula; Martínez Vázquez, Ana; Meléndez-Martínez, Antonio J.; Mellado-Ortega, Elena; Mercadante, Adriana Z.; Molina-Calle, María; Murillo, Enrique; Odorissi, Ana A.; Olmedilla-Alonso, Begoña; Ornelas-Paz, José de Jesús; Osorio, Coralia; Palou, Andreu; Pérez-Gálvez, Antonio; Ribot, Joan; Rivera-Madrid, Renata; Robaina, Lidia; Roca, María; Rodrigo, Maria Jesús; Rodríguez-Concepción, Manuel; Rubio-Moraga, Ángela; Ruiz-Sola, M. Águila; Saavedra, Gloria F.; Salinas, M. Rosario; Schweiggert, Ralf M.; Simpson, Kevin; Stange, Claudia; Stinco, Carla M.; Vargas-Murga, Liliana; Vicario, Isabel M.; Zacarías, Lorenzo; Zhu, Changfu; Zorrilla-Lopez, Uxue.

Las opiniones, conceptos, tablas, gráficas, ilustraciones y fotografías que aparecen en cada uno de los capítulos son responsabilidad exclusiva de los autores. Las figuras que aparecen reproducidas en diferentes capítulos se han usado con permiso de sus autores.

Prohibida la reproducción parcial o total de esta obra, por cualquier medio o método, sin autorización previa y por escrito de los titulares del copyright.

Producción: Editorial Terracota, SA de CV / México

Edición: Pilar Tapia

Realización: Jeanette Vázquez Gabriel

Fotografías: Autores y Freeimages

ISBN 978-84-15413-35-6

Distribución:

RED TEMÁTICA IBERCAROT

(referencia 112RT445) <http://carotenoides.us.es>

PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA Y
TECNOLOGIA PARA EL DESARROLLO – CYTED



CAPÍTULO 25

FORMAS DE DEPOSICIÓN DE CAROTENOIDES EN ALIMENTOS VEGETALES Y SUS POSIBLES IMPLICACIONES EN SU BIOACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD

Patricia Esquivel, Víctor M. Jiménez, Tania Chacón-Ordóñez, Judith Hempel, Ralf M. Schweiggert y Reinhold Carle



INTRODUCCIÓN

En las plantas, los carotenoides son generalmente biosintetizados y depositados en diferentes tipos de plastidios. En tejidos vegetales verdes, los carotenoides se encuentran dentro de cloroplastos, los cuales tienen morfología y composición similar. En tejidos vegetales no verdes, estos pigmentos se encuentran en cromoplastos, los cuales pueden tener cierta diversidad estructural (Cazzonelli y Pogson, 2010). Se han descrito cuatro formas de deposición de carotenoides en cromoplastos: aquellos que están disueltos en lípidos, en forma líquido-cristalina, asociados a membranas y en forma sólido-cristalina. Se postula que el tipo de plastidio en el que se encuentran puede tener una importante influencia en la biodisponibilidad de los carotenoides (Schweiggert *et al.*, 2012). Debido a ello, la caracterización ultra-estructural de estos orgánulos es interesante para estimar el potencial de un material vegetal en particular como fuente de carotenoides biodisponibles.

PERFIL DE CAROTENOIDES Y MORFOLOGÍA DEL CLOROPLASTO EN ALIMENTOS VEGETALES VERDES

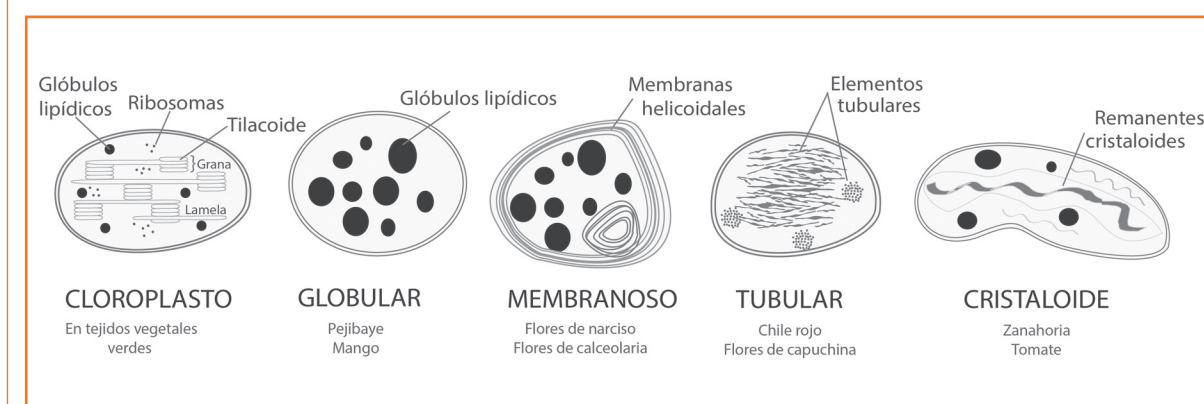
Los carotenoides presentes en los tejidos verdes de las plantas se acumulan en los cloroplastos (Ötles y Çagınd, 2008, Wieslaw, 2010). El perfil de los principales carotenoides en distintos tejidos vegetales verdes es en la mayoría de los casos muy similar, de forma que el β -caroteno se encuentra en una proporción de 20-25% y la luteína de 40-45%. Los otros dos carotenoides típicamente mayoritarios, violaxantina y (9'Z)-neoxantina se encuentran en una proporción menor, concretamente de 10-15% (Britton, 2008). No obstante, el contenido total de carotenoides en estos tejidos es muy variable, al depender de muchos factores.

En general, concentraciones mayores de carotenoides están directamente relacionadas con mayores densidades de cloroplastos. Así, por ejemplo, los vegetales verdes con mayor concentración de carotenoides, como la col rizada, el brócoli

y la espinaca (> 2 mg/100 g en peso fresco), tienen un color verde muy oscuro (Britton y Khachik, 2009).

En la figura 1 se muestra la representación esquemática de un cloroplasto. Destaca la presencia de tilacoides, los cuales están con frecuencia ordenados en forma de pilas conocidas como granas. Los tilacoides son elementos membranosos, ricos en carotenoides, en donde se ubican los complejos antena y los centros de reacción de los fotosistemas. Así, los carotenoides de los tilacoides son de vital importancia para la fotosíntesis y se encuentran en los denominados complejos proteína-pigmento. Otras estructuras portadoras de carotenoides ubicadas en los cloroplastos son los plastoglóbulos, que se describirán con mayor detalle más adelante. En ellos existe un ambiente rico en lípidos para la biosíntesis y deposición de carotenoides. Hay evidencia de que los plastoglóbulos están estrechamente asociados con los tilacoides, e incluso se ha propuesto que entre ellos tiene lugar un abundante intercambio de compuestos lipofílicos (Austin *et al.*, 2006).

FIGURA 1. Tipos de plastidios presentes en plantas. Los ejemplos corresponden a estudios descritos en la literatura para mango (Vásquez-Caicedo *et al.*, 2006), la flor del narciso (Liedvogel *et al.*, 1976), calceolarias (Wrischer y Ljubescic, 1984), la flor capuchina y el chile rojo (Deruère *et al.*, 1994), pejibaye y tomate (Hempel *et al.*, 2014) y zanahoria (Straus, 1950).



En los sistemas biológicos, los carotenoides más lipofílicos, como el β -caroteno, se encuentran comúnmente en el núcleo de pequeñas gotas de lípidos, mientras que aquellos carotenoides ligeramente polares, como la luteína y la zeaxantina, están más asociados a las membranas lipídicas (Borel *et al.*, 1996). La forma de anclaje de los carotenoides a estas membranas también está determinada por su estructura. Carotenoides con mayor polaridad, como por ejemplo los que tienen grupos oxigenados, tienden a acomodar su cromóforo dentro del núcleo hidrofóbico de la membrana (figura 2) (Deming *et al.*, 2002). La orientación de las moléculas dependerá principalmente de los grupos funcionales presentes y de su capacidad para

establecer puentes de hidrógeno con las zonas polares de la membrana (Wieslaw, 2010). Se ha observado que la luteína puede estar orientada tanto de forma vertical como horizontal, debido a la presencia de grupos $-OH$ en ambos extremos de la molécula (Pasenkiewicz-Gierula *et al.*, 2012, Sujak *et al.*, 1999). Por su parte, la orientación vertical u horizontal de la zeaxantina con respecto a la membrana depende de si su configuración es *cis*- o *trans*- (Widomska y Subczynski, 2008). Los carotenoides apolares, como el β -caroteno, tienen cierta movilidad dentro de la región hidrofóbica de la membrana, ya que no establecen puentes de hidrógeno con los lípidos polares en la superficie de la membrana o en la fase polar (Wieslaw, 2010).

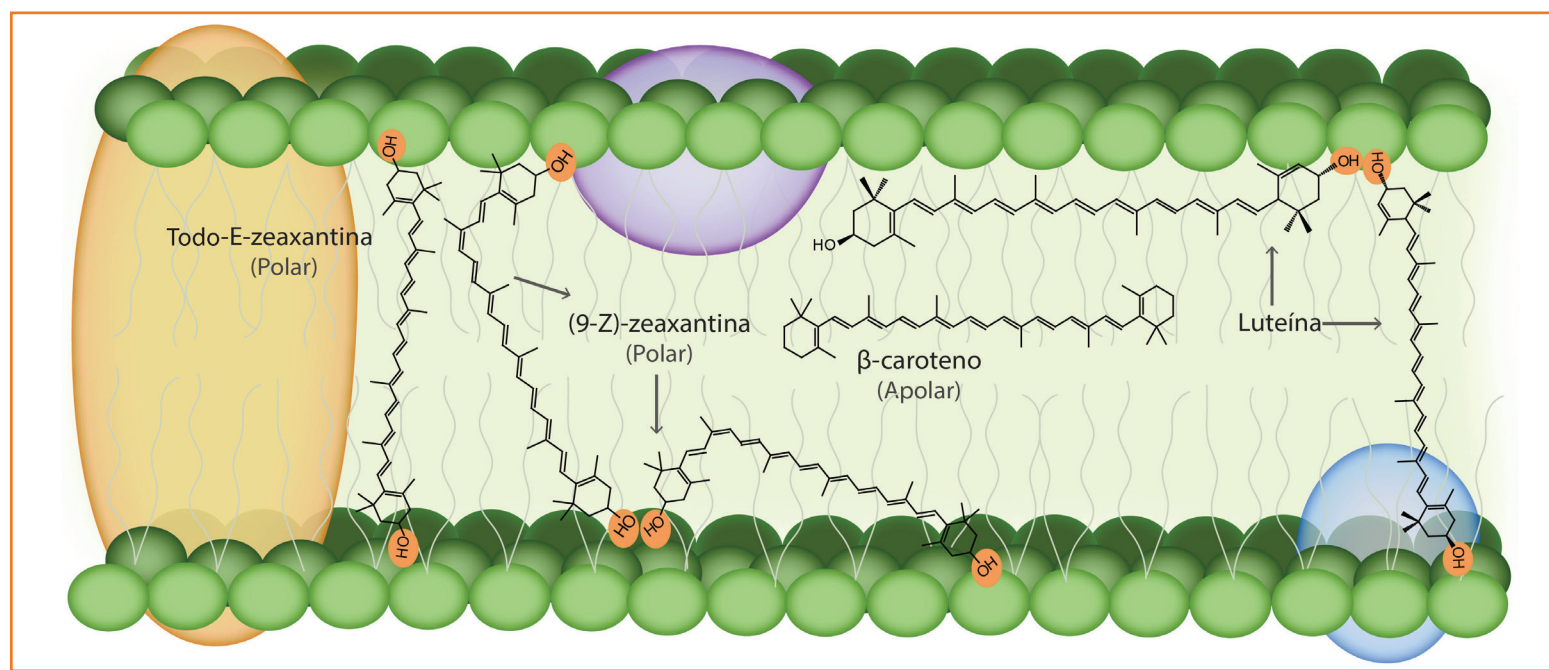


FIGURA 2. Orientación de carotenoides polares (zeaxantina, luteína) y no polares (β -caroteno) dentro de la membrana lipídica. Los círculos alrededor de los grupos hidroxilo indican la presencia de puentes de hidrógeno en las zonas polares de la membrana.

En tejidos verdes comestibles, la mayoría de los carotenoides están fuertemente embebidos en los complejos proteicos de los tilacoides apilados de los cloroplastos. Así, si a estos vegetales no se les realiza ningún tipo de preparación tecnológica o culinaria que facilite su liberación, como por ejemplo cocimiento o adición de aceite, la biodisponibilidad de los carotenoides es extremadamente pobre. Por ejemplo, en un estudio se observó que la absorción de carotenoides después de ingerir una ensalada compuesta por espinaca fresca, lechuga romana, zanahoria y tomates cherry sin adición alguna de aceite, fue prácticamente insignificante. La adición de únicamente 6 g de aceite de canola por porción aumentó considerablemente su biodisponibilidad. Un incremento todavía mayor se observó con la adición de 28 g de aceite por porción (Brown *et al.*, 1989, 2004). Resultados similares se obtuvieron en otro estudio en el que se usaron aguacate y su aceite como fuente de grasa (Unlu *et al.*, 2005). Además de lo anterior, con frecuencia se ha relacionado la aplicación de tratamientos térmicos con un aumento en la biodisponibilidad de carotenoides en tejidos verdes. Sin embargo, en la literatura también se encuentra información contradictoria. Por ejemplo, en un estudio se observó un ligero incremento, aunque mucho menor al esperado, en la biodisponibilidad de carotenoides de espinacas tratadas térmicamente en comparación con su equivalente no tratado (Rock *et al.*, 1998). Por otro lado, Tassi y Amaya-Farfán (2008) no encontraron diferencias en la biodisponibilidad de β -caroteno y luteína entre hojas crudas y cocinadas (durante 5 min a 97°C) de arúgula (*Eruca sativa* L.), aunque la cantidad de carotenoides en las primeras era ligeramente mayor que en las segundas. Es importante considerar que la aplicación de calor a vegetales puede dar lugar a isomerizaciones *trans-cis* (E/Z) y a la degradación de carotenoides. No obstante, la adición de lípidos no parece afectar la composición de los isómeros, tal como se observó

en cloroplastos aislados de espinaca (Aman, Schieber y Carle, 2005). En este sentido, es importante considerar que distintos isómeros geométricos (*cis/trans*) de carotenoides pueden tener diferente actividad provitamina A y biodisponibilidad (Rodríguez-Amaya y Tavares, 1992; Ben-Amotz y Levy, 1996). La desintegración mecánica de los tejidos también suele tener un efecto positivo en la biodisponibilidad de carotenoides de tejidos fotosintéticos. Así, en un estudio se observó un incremento de 14% en los niveles plasmáticos de β -caroteno cuando se consumieron espinacas picadas en comparación con hojas enteras (Van Het Hof *et al.*, 1999). También se observó un incremento en la biodisponibilidad de carotenoides después de tratar espinaca picada con una preparación de pectinasa, hemicelulasa y celulasa para desintegrar la matriz en la cual los carotenoides están inmersos (Castenmiller *et al.*, 1999). En resumen, los vegetales verdes deben ser vistos como una fuente importante de β -caroteno y luteína, especialmente cuando se consumen junto con lípidos y reciben al menos cierto tratamiento mecánico mínimo.

PERFIL DE CAROTENOIDES Y MORFOLOGÍA DE CROMOPLASTOS EN ALIMENTOS VEGETALES EN DONDE PREDOMINAN OTROS COLORES

En tejidos vegetales no fotosintéticos, los carotenoides se encuentran dentro de plastidios especializados, denominados cromoplastos. Cuando los frutos verdes maduran, el aparato fotosintético se degrada y las membranas tilacoidales se desintegran, permitiendo la transformación de cloroplastos en cromoplastos (Hudák, Gálová y Zemanová, 2005; Britton, 2008). Si bien son procesos independientes, se ha sugerido que puede existir cierta interacción entre la degradación de la

clorofila y la carotenogénesis como se observó en mutantes de pimiento que permanecen verdes durante todo el proceso de maduración (Roca *et al.*, 2006). También existe evidencia de que los cromoplastos se pueden originar *de novo* a partir de plastidios no diferenciados, denominados proplastidios (Evert, 2006). Los cromoplastos constituyen el grupo de plastidios con mayor diversidad morfológica y estructural (figura 1). Considerando su variabilidad estructural y, en consecuencia, también su composición, Britton y Khachik (2009) identificaron cinco patrones distintivos de carotenoides de acuerdo con el color de los tejidos vegetales: 1) con contenidos altos de licopeno, como en el tomate (color rojo); 2) con contenidos altos de β -caroteno y sus hidroxí-derivados β -criptoxantina y zeaxantina (color naranja); 3) similar a 2, pero también con α -caroteno y sus hidroxí-derivados, especialmente luteína (color amarillo-naranja); 4) con contenidos altos de epóxidos de carotenoides (color amarillo), y 5) carotenoides que parecen ser únicos o característicos de una especie en particular (colores amarillos, anaranjados o rojos, dependiendo del compuesto predominante), como por ejemplo capsantina y capsorrubina en pimientos rojos (*Capsicum annuum* L.) (Britton y Khachik, 2009). En cualquier caso es importante tener en cuenta que la distribución de los carotenoides en frutos es compleja y heterogénea y que sus niveles pueden variar considerablemente según factores como la variedad, el estado de madurez, la zona y condiciones de cultivo y el manejo poscosecha (Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004).

De forma general los cromoplastos se clasifican de acuerdo con su ultraestructura (Evert, 2006). Pueden ser de tipo globular, tubular, membranoso, cristalino o combinaciones de los anteriores. El que se clasifiquen de una forma u otra depende fundamentalmente de los elementos ultraestructurales que predominan en el estroma (e.g., glóbulos, túbulos,

membranas o cristales) (Hudák, Gálová y Zemanová, 2005; Egea *et al.*, 2010).

Los cromoplastos globulares son los más frecuentes en la naturaleza y se encuentran con frecuencia en pétalos de flores; su presencia en estructuras comestibles es menos frecuente (Jeffery, Holzenburg y King, 2012). Un ejemplo interesante al respecto fue recientemente reportado por Hempel *et al.* (2014) en frutos de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.), aunque había sido también publicado con anterioridad en el flavedo de naranja (Hudák, Gálová y Zemanová, 2005). En los cromoplastos globulares los carotenoides se encuentran dentro de pequeñas gotas de lípidos llamadas plastoglóbulos (figura 3). Estos plastoglóbulos están formados por una monocapa

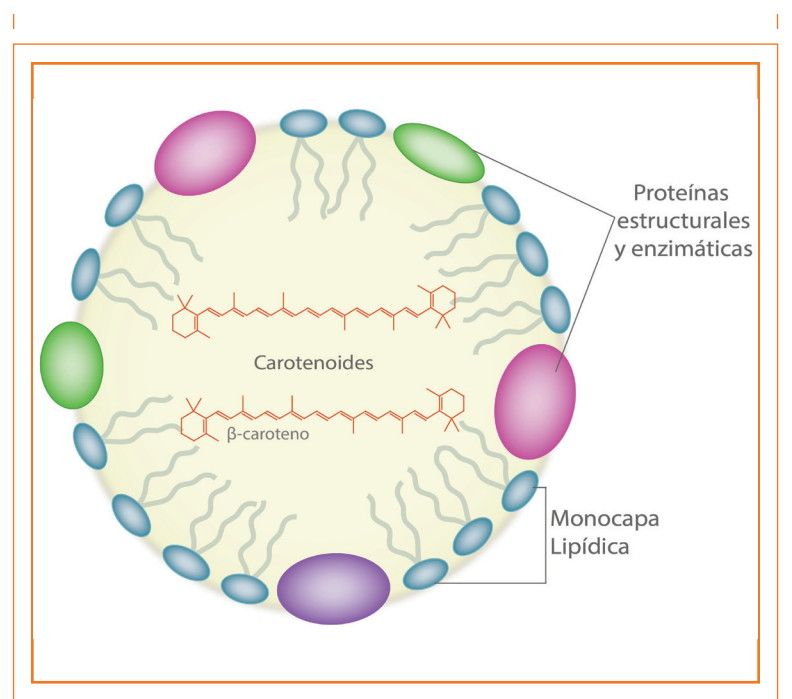


FIGURA 3. Estructura del plastoglóbulo y almacenamiento de carotenoides.

lipídica y varían en tamaño (Bréhélin, Kessler y Van Wijk, 2007). Se ha observado que el número de plastoglóbulos aumenta durante la maduración. En algunos casos, como consecuencia del gran aumento en la concentración de carotenoides, pueden producirse fenómenos de cristalización. Ejemplos típicos son los cristales de β -caroteno en zanahoria o de licopeno en tomate (Ben-Shaul y Shimon, 1965; Harris y Spurr, 1969).

Por otro lado, los cromoplastos tubulares se caracterizan por tener elementos internos con forma de tubo (figura 1). Estos elementos, altamente anisotrópicos, se denominan generalmente túbulos y pueden tener un grosor de entre 20 y 60 nm y una longitud de hasta 10 μ m. Se han encontrado túbulos ramificados y no ramificados (Sitte 1980). Su núcleo aparentemente consiste en una fase líquido-cristalina nemática de carotenoides, rodeada por una monocapa de glicolípidos, fosfolípidos y proteínas bipolares (Sitte, 1981). Se han encontrado cromoplastos tubulares o globular-tubulares en varias flores y frutos, como por ejemplo níspero (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.), mango (*Mangifera indica* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), physalis (*Physalis pubescens* L. y *P. peruviana* L.), baya de serbal (*Sorbus aucuparia* L.), escaramujo (*Rosa rugosa* Thunb.) y papaya (*Carica papaya* L.) de pulpa amarilla (Vásquez-Caicedo *et al.*, 2006; Sitte, 1980, Schweiggert, *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2012).

Los cromoplastos membranosos son los menos frecuentes. Contienen hasta 20 membranas dobles concéntricas (figura 1). Este tipo de cromoplasto se encuentra aparentemente limitado a flores de unas pocas familias de plantas, como Amaryllidaceae (e.g., el narciso). Sin embargo, también se ha descrito su presencia en ciertos cultivares de *Capsicum annuum* L. y en el cultivar de tomate de pulpa amarilla Golden Jubilee (Sitte, 1980; Rosso, 1967).

Los cromoplastos cristalinos representan el cuarto tipo de cromoplastos (figura 1). El ejemplo más prominente es el cromoplasto de las raíces de la zanahoria anaranjada, ricas en β -caroteno. En muchos otros casos, los cristales de carotenoides se pueden observar con microscopía de luz, y se han encontrado formas semejantes a cintas, agujas e incluso helicoidales; se conocen también pequeños cristales submicroscópicos, como los encontrados en algunos cultivares de physalis (Hempel *et al.*, 2014; Schweiggert *et al.*, 2011; Sitte, 1980). Se ha sugerido que la formación de los cristaloides es altamente dependiente del tipo de pigmento acumulado. Así, se ha observado que el (todo-*trans*)-licopeno se acumula de forma consistente en forma cristalina en frutos y vegetales, como la sandía (Sitte, 1980), el pomelo rojo (Purcell, Carra y DeGruy, 1963), la papaya de pulpa roja (Schweiggert *et al.*, 2011), y los frutos no comestibles de *Aglaonema commutatum* Schott (Knoth, 1981).

Es posible encontrar más de un tipo de elemento portador de carotenoides en un mismo cromoplasto. Especialmente, los plastoglóbulos son elementos que se encuentran con frecuencia en todos los tipos de plastidios, por lo que están en cromoplastos clasificados como membranosos, tubulares y cristaloides. Estos dos últimos también pueden contener estructuras membranosas y, en ciertos casos, la clasificación de los cromoplastos basada en su ultraestructura detallada puede volverse arbitraria. Además, es importante considerar que al informar sobre la presencia de tipos particulares de cromoplastos, es fundamental especificar en detalle la especie, el genotipo, el órgano y su estado de desarrollo o madurez, ya que éstos pueden ser determinantes en la presencia de un tipo u otro. Así, por ejemplo se ha observado que los cromoplastos de los frutos de tomate son cristaloides, mientras que los de los pétalos de las flores de esta misma especie son globulares (Sitte, 1980).

DEPOSICIÓN Y BIODISPONIBILIDAD DE CAROTENOIDES EN ALIMENTOS VEGETALES SELECCIONADOS

Pejibaye, pijuayo, chontaduro o pijiguo (*Bactris gasipaes* H.B.K.)

El pejibaye es una palma. Sus usos más relevantes son la producción del fruto, sobre todo para mercados locales, y la producción de palmito, el cual se obtiene a partir de los brotes jóvenes y se comercializa sobre todo a escala internacional. Tradicionalmente, los frutos se consumen después de su cocción debido a la presencia de algunos factores anti-nutricionales (Clement *et al.*, 2004).

El pejibaye cultivado generalmente presenta una gran variabilidad genética, la cual se puede explicar principalmente por su sistema reproductivo con polinización abierta (el polen proviene de otras plantas), aunado a su estado todavía incipiente de domesticación y los fines variables de los pocos programas de mejoramiento genético que se han establecido (Mora-Urpí, Weber y Clement, 1997). Esta diversidad se refleja en sus características morfológicas y fisicoquímicas, como por ejemplo el color. Los dos bancos de germoplasma de pejibaye de mayor importancia en el mundo se encuentran en Costa Rica; en su administración y uso participan en estrecha relación entes estatales y de educación superior de ese país.

El fruto del pejibaye es una drupa con colores externos que varían entre anaranjado, amarillo y rojo. El mesocarpio presenta coloraciones que van del crema al anaranjado. Su contenido de lípidos en promedio es de 15.8% de su peso

seco (Mora-Urpí, Weber y Clement, 1997). El fruto es rico en α -, γ - y β -caroteno y ha sido utilizado como alimento para animales. También ha sido objeto de cierto grado de desarrollo industrial, principalmente para obtener harina para consumo humano (Rojas-Garbanzo *et al.*, 2011). Se ha estimado que la alta concentración de lípidos en el fruto podría favorecer la biodisponibilidad de los carotenoides que contiene. Al respecto, Hempel *et al.* (2014) determinaron contenidos totales de carotenoides en diferentes genotipos de pejibaye que van desde 685 hasta 13.895 $\mu\text{g}/100$ g peso fresco. Al compararse los genotipos con diferente color, se observaron perfiles de carotenoides muy similares pero con diferencias en cuanto a su concentración. Los genotipos de color anaranjado pueden tener niveles de carotenoides hasta diez veces superiores a los de color amarillo (Hempel *et al.*, 2014).

Morfología del cromoplasto del fruto del pejibaye y biodisponibilidad de sus carotenoides

Estudios con microscopía de luz no han puesto de manifiesto la presencia de cromoplastos cristaloides en el fruto del pejibaye (figura 4, A1), tales como los descritos para vegetales ricos en β -caroteno y licopeno como la zanahoria y el tomate, respectivamente. En zanahoria y tomate, los cristales de caroteno aparecen distorsionando la forma del cromoplasto, con longitudes de hasta 30 y 50 μm , respectivamente. En contraste, el mesocarpio y el exocarpio del fruto de pejibaye contienen pequeños cromoplastos globulares redondeados. Los cromoplastos del mesocarpio son de mayor tamaño (diámetro aproximado de 5-10 μm), mientras que los cercanos a la cáscara son más pequeños (diámetro aproximado de 3-4 μm). Estos últimos tienen una mayor intensidad de color (rojo-naranja oscuro) con distintas estructuras globulares internas (Hempel *et al.*, 2014).

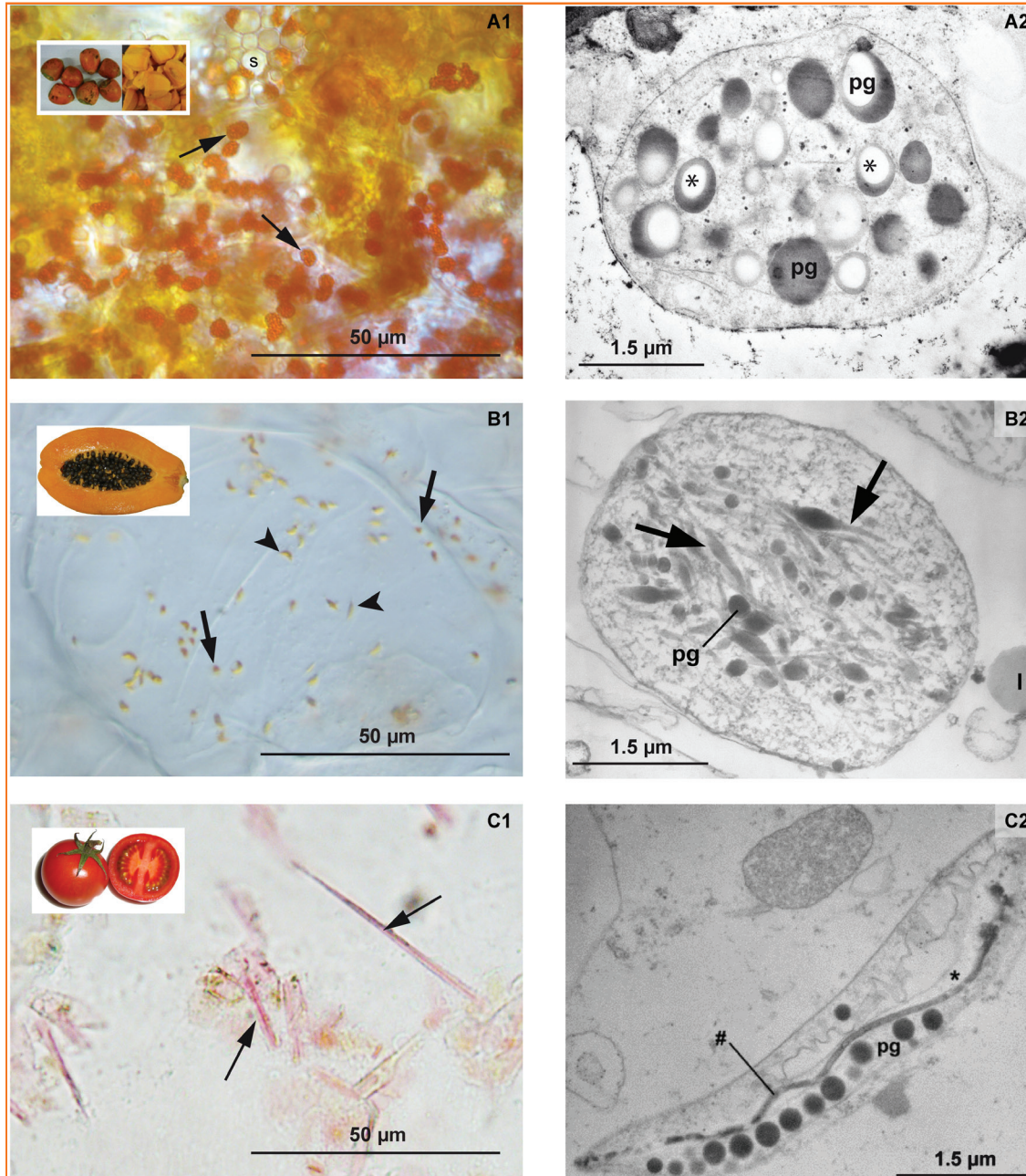


FIGURA 4. Micrografías de luz (A1, B1 y C1) y micrografías electrónicas (A2, B2 y C2) de cromoplastos globulares, tubulares y cristaloides de A) fruto de pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth), B) fruto de papaya (*Carica papaya* L.) de pulpa amarilla y C) fruto de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) de pulpa roja, respectivamente. Las micrografías fueron recopiladas y modificadas con permiso de Hempel *et al.* (2014) y Schweiggert *et al.* (2011). A1) Las flechas señalan cromoplastos de forma redondeada; s, gránulo de almidón; A2) pg, plastoglobulo; *, plastoglobulo con contenido parcialmente extraído durante la preparación de la muestra. B1) Las flechas señalan cromoplastos de forma redondeada; puntas de flecha, cromoplastos levemente elongados; B2) pg, plastoglobulo; l, cuerpo lipídico; C1) Las flechas señalan cromoplastos en forma de aguja; C2) pg, plastoglobulo; *, restos de cristales (cristal de carotenoide extraído durante la preparación de la muestra); #, membrana interna ondulada.

La presencia de cromoplastos globulares en los frutos de pejibaye fue confirmada por medio de microscopía electrónica de transmisión. En las células del exocarpio y del mesocarpio de variedades amarillas y anaranjadas se observaron cromoplastos con plastoglóbulos (figura 4, A2) (Hempel *et al.*, 2014).

Como se mencionó antes, se considera que en los cromoplastos globulares los carotenoides se encuentran disueltos en lípidos. Un prerrequisito para que esto ocurra es la presencia en el material vegetal de un contenido de lípidos suficientemente alto como para asegurar la solubilidad. Hempel *et al.* (2014) estimaron la solubilidad de acuerdo con la metodología de Schweiggert *et al.* (2011), con base en el contenido de carotenoides individuales y utilizando los valores de solubilidad descritos en la literatura (Borel *et al.*, 1996; Garti, Shevachman y Shani, 2004). Se estimó entonces que el contenido de lípidos requerido para la disolución de todos los carotenoides presentes en el pejibaye sería de 0.45 g/100 g peso fresco para frutos de color amarillo, los cuales contenían una concentración aproximada de 3.2 g/100 g peso fresco. Por su parte, los frutos anaranjados tenían 6.1 g de lípidos por 100 g peso fresco, requiriendo 4.4 g de lípidos por 100 g para disolver todos los carotenoides presentes. De acuerdo con estos cálculos, para ambos genotipos se observó que el contenido de lípidos presentes en los frutos era suficiente para garantizar la solubilidad de los carotenoides, apoyando la hipótesis de que los carotenoides del pejibaye se encuentran disueltos en lípidos (Hempel *et al.*, 2014).

Este estado de carotenoides disueltos en lípidos se había descrito con anterioridad para cromoplastos en pétalos de flores (Sitte, 1980). Sin embargo, esta es una forma de almacenamiento excepcional en frutas y vegetales.

Fuentes comunes de carotenoides, como zanahoria, tomate y vegetales verdes, tienen un contenido bajo de lípidos, los cuales no son suficientes para la disolución total de los carotenoides. La zanahoria y el tomate contienen menos de 0.3 g de lípidos por 100 g peso fresco, con un contenido muy alto de carotenoides en comparación con el pejibaye (Surlles *et al.*, 2004; Schweiggert *et al.*, 2012; USDA, 2012). Considerando lo anterior, y como se describirá con mayor detalle más adelante, se recomienda la adición de lípidos en la dieta, como requisito para la absorción eficiente de carotenoides cristalizados presentes en fuentes como el tomate y la zanahoria (Brown *et al.*, 2004). En consecuencia, se considera que los carotenoides del pejibaye, naturalmente disueltos en lípidos, tienen mayor biodisponibilidad que los de tomate y zanahoria, aun sin la adición de otros lípidos para su consumo (Hempel *et al.*, 2014). En concordancia con lo anterior, Cooperstone *et al.* (2015) encontraron mayor biodisponibilidad de todo-*trans*-licopeno (dos veces mayor) y de licopeno total (8.5 veces mayor) en tomates tipo mandarina (*tangerine tomatoes*), en los que predominan cromoplastos globulares, que en tomates rojos comunes, donde predominan cromoplastos cristaloides.

En resumen, los frutos del pejibaye parecen tener un gran potencial nutricional. Contienen carotenoides precursores de vitamina A, los cuales se encuentran disueltos en gotas lipídicas dentro de los cromoplastos y, por lo tanto, son altamente biodisponibles. Además, son frutos con un alto valor energético, por el alto contenido en almidón y lípidos. Actualmente este fruto es subutilizado en América Latina, de donde es originario, y 40% de la producción se utiliza para alimento animal (Clement *et al.*, 2004).

Papaya o lechosa (*Carica papaya* L.)

La papaya es una planta herbácea semi-leñosa, probablemente originaria de la costa caribeña de Mesoamérica, que ahora se cultiva en muchas regiones tropicales y subtropicales. Normalmente tiene un único tallo, al extremo del cual comienza a producir flores a partir de los 3-8 meses. Los primeros frutos se pueden cosechar a los 9-15 meses y pueden variar considerablemente en tamaño (0.1 -10.0 kg), forma (elongada, redondeada o aplanada) y color (amarillo a anaranjado oscuro). Su importancia en el comercio mundial en los últimos años ha aumentado considerablemente (Jiménez, Mora-Newcomer y Gutiérrez-Soto, 2014).

La papaya se considera como una fuente importante de licopeno y de carotenoides precursores de vitamina A, principalmente en países tropicales y subtropicales. En un estudio se comparó la biodisponibilidad al consumir la misma dosis de β -caroteno de papaya, zanahoria y tomate, y se determinó que la absorción *in vivo* es tres veces mayor tras el consumo de papaya. De forma similar a lo indicado antes para pejibaye, estos resultados se atribuyen a la forma de deposición de los carotenoides en papaya. Así, en este fruto se encuentran disueltos en lípidos y en estado cristalino líquido, mientras que en zanahoria y tomate los carotenoides mayoritarios se encuentran en estado cristalino-sólido (Schweiggert *et al.*, 2014).

Conforme progresa la maduración de frutos de papaya se produce un incremento considerable en la acumulación de carotenoides en los cromoplastos. Además, se han observado diferencias dependiendo del genotipo de papaya (Schweiggert *et al.*, 2011, 2011a). Estos autores determinaron concentraciones de carotenoides totales en papaya con

pulpa roja de 59 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. En papaya amarilla el nivel de carotenoides fue menor, concretamente de 34 $\mu\text{g/g}$ peso fresco. La diferencia más llamativa en el perfil de carotenoides de las papayas rojas y amarillas es la presencia de licopeno en una gran proporción en las primeras (aproximadamente 51% del total de carotenoides). En la papaya amarilla sólo se encontraron trazas de este compuesto.

Morfología del cromoplasto del fruto de papaya y biodisponibilidad de carotenoides

En frutos completamente maduros de papaya roja se observaron principalmente estructuras cristaloides elongadas y estructuras redondeadas al microscopio de luz (figura 4, B1), mientras que en frutos equivalentes de papaya amarilla predominaron estructuras redondas y cristaloides pequeñas. Por medio de microscopía electrónica se observaron túbulos, tanto agrupados como sueltos, en ambos tipos de papaya (figura 4, B2). En general, los túbulos estaban organizados de forma paralela. También se observaron transiciones entre estructuras tubulares y globulares. Tanto en una etapa intermedia de madurez como en la madurez completa del fruto rojo se observaron numerosos plastidios con restos cristaloides. El tamaño y forma de los plastidios parecían distorsionados por los cristales. Se pudieron distinguir en el cromoplasto cristaloides, plastoglóbulos y estructuras tubulares (Schweiggert *et al.*, 2011).

Knuth, Hansmann y Sitte (1986) y Simpson *et al.* (1974) describieron cromoplastos glóbulo-tubulares similares a los descritos anteriormente en bayas de *Palisota barteri* Hook y en pimiento (*Capsicum annum* L.). Se observó que los plastoglóbulos de los cromoplastos de la papaya estaban conectados a elementos tubulares, creciendo hacia afuera en diferentes direcciones. Knuth, Hansmann y Sitte (1986) indican

que la acumulación de carotenoides puede ser un requisito para la formación de túbulos. Estos cromoplastos tubulares sólo se observaron en estados avanzados de madurez. La presencia de cristales asociados a las membranas internas del cromoplasto de papaya roja se asoció con la acumulación de licopeno, tal como se había descrito previamente en tomate (Rosso, 1968). El origen de los cromoplastos puede determinar la unión del licopeno a diferentes elementos. En cromoplastos desarrollados a partir de cloroplastos, el licopeno puede encontrarse unido a membranas tilacoidales, lo que podría influir en su biodisponibilidad haciéndolo menos accesible.

Mediante microscopía electrónica se observó la presencia de plastidios con elementos globulares y tubulares en la papaya amarilla, similares a los descritos para la papaya roja, pero sin cristales unidos a las membranas. En la papaya roja, la acumulación del licopeno, poco soluble, resulta en la formación de cristales; lo que no se observó en la papaya amarilla, donde el licopeno está prácticamente ausente (Schweiggert *et al.*, 2011).

En relación con la biodisponibilidad de carotenoides, De Pee *et al.* (1998) asociaron un aumento significativo de β -caroteno y retinol en suero en niños en edad escolar en Indonesia después de consumir una dieta basada en frutos con coloración naranja. Este aumento fue mayor con estos frutos que cuando se aportó una dosis equivalente de carotenoides de vegetales de hoja verde. La absorción predominante de β -caroteno a partir de frutos, como mango y papaya, ha sido también confirmada en mujeres lactantes (Khan *et al.*, 2007). Coincidiendo con estos estudios, una investigación reciente mostró una absorción posprandial de β -caroteno tres veces mayor en la fracción lipoproteica rica en triglicéridos de plasma humano después del consumo de papaya al compararlo con

una dosis equivalente de este compuesto a partir de zanahoria y tomate (Schweiggert *et al.*, 2014). Este mismo grupo había encontrado previamente que la bioaccesibilidad *in vitro* de β -caroteno de mango y papaya es significativamente mayor que de zanahoria y tomate (Schweiggert *et al.*, 2012). Los autores relacionaron la alta biodisponibilidad del β -caroteno en mango y papaya con su forma de deposición a escala nanométrica en los elementos tubulares de los cromoplastos, mientras que la pobre biodisponibilidad de los carotenoides en zanahoria y tomate estaba relacionada con su forma de deposición sólido-cristalina. La solubilización e incorporación de los carotenoides en micelas mixtas durante la digestión es un prerrequisito para que ocurra una absorción eficiente. Esta incorporación en micelas puede ser más efectiva en el caso de los carotenoides de la papaya, que se acumulan en estructuras más pequeñas que en el caso de zanahoria y tomate.

Además de la forma de deposición en los cromoplastos, hay otras propiedades de la matriz del tejido u órgano que pueden contribuir a una mayor o menor biodisponibilidad, como por ejemplo la firmeza, que es mayor en la zanahoria cruda que en la papaya. Sin embargo, Schweiggert *et al.* (2014) encontraron que, a pesar de que los tomates son menos firmes que los frutos de papaya, la biodisponibilidad de β -caroteno fue significativamente mayor en los últimos. También se encontró que la biodisponibilidad de β -caroteno cristalino fue baja y muy similar entre zanahoria y tomate ($P = 0.86$) (Schweiggert *et al.*, 2014).

Independientemente de la razón, la alta biodisponibilidad de los carotenoides presentes en frutos de papaya los hace una fuente excelente de carotenoides importantes para la dieta, tales como β -caroteno, β -criptoxantina y licopeno (Schweiggert *et al.*, 2014).

Raíz de zanahoria (*Daucus carota* L.) y frutos de tomate de pulpa roja (*Lycopersicon esculentum* L.)

Morfología del cromoplasto en el fruto de tomate rojo y en raíz de zanahoria

Como se muestra en la figura 4 C1, los cromoplastos de tomate y zanahoria se caracterizan por presentar elementos cristaloides, principalmente con forma de aguja, que pueden llegar a medir casi 50 μm . Por microscopía electrónica (figura 4, C2) ha sido posible observar que los cristales típicos están rodeados por membranas con estructuras ligeramente onduladas densas en electrones (Schweiggert *et al.*, 2011).

La mayoría de los estudios relacionados con la biodisponibilidad de carotenoides en vegetales no verdes se ha realizado en zanahoria común y tomate rojo. Así, el estado de deposición cristalina fue relacionado inicialmente con su baja biodisponibilidad en un modelo animal (Zhou, Gugger y Erdman, 1996). Posteriormente, Kopec *et al.* (2014) demostraron que α - y β -caroteno de la zanahoria cruda eran 4.8 y 6.6 veces más biodisponibles, respectivamente, cuando su consumo se acompañaba de aguacate. En ese mismo trabajo, se describió que la biodisponibilidad del β -caroteno aumentó 2.4 veces cuando el aguacate se suplementó con salsas de tomate con altos niveles de β -caroteno preparados con tratamiento térmico, las cuales también contenían carotenoides cristalinos. Como ya se mencionó, la adición de lípidos es necesaria para la disolución de carotenoides cristalinos, lo cual es un prerequisite para su incorporación en micelas mixtas y, por consiguiente, para su eficiente incorporación en los enterocitos (Erdman Jr, Bierer y Gugger, 1993).

Además, se ha observado que el procesamiento térmico de los alimentos puede aumentar la biodisponibilidad de carotenoides a partir de fuentes en las que se encuentran en estado cristalino. En el trabajo de Kopec *et al.* (2014), la absorción de β -caroteno después de consumir zanahorias sin acompañamiento con lípidos fue apenas marginal, mientras que la adición de salsa de tomates altos en β -caroteno, preparada con tratamiento térmico, aumentó sustancialmente la incorporación de este pigmento en su forma cristalina, aunque no se le hubieran agregado lípidos adicionales. Esta observación es consistente con el hecho de que el procesamiento mecánico y térmico puede ser beneficioso para la biodisponibilidad. En resumen, carotenoides de fuentes cristalinas, como zanahoria y tomate, no tienen una buena biodisponibilidad, a menos que se adicione lípidos o se procesen térmicamente.

CONCLUSIONES

En general, se ha observado que los carotenoides se depositan de diferente forma en los cloroplastos y en los distintos tipos de cromoplastos. Los vegetales verdes muestran perfiles de carotenoides muy similares y en ellos están asociados con proteínas. En los cromoplastos se han descrito diversos estados físicos de deposición de los carotenoides, como las formas disueltas en lípidos, características de frutos de pejíbabe, las posibles formas líquido-cristalinas de frutos de papaya, y las formas sólido-cristalinas de zanahoria y tomate. A menos que se lleven a cabo tratamientos apropiados a los alimentos vegetales verdes, la biodisponibilidad de carotenoides es muy pobre. De la misma manera, se acepta que los carotenoides sólido-cristalinos de alimentos vegetales crudos son poco biodisponibles, mientras que hay cada

vez más evidencias de que los carotenoides disueltos en lípidos de cromoplastos globulares son muy biodisponibles por naturaleza. Algo similar se ha observado en el caso de carotenoides de cromoplastos tubulares. El estado físico de los carotenoides así como el tipo de cromoplasto podría permitir, hasta cierto grado, predecir su mayor o menor

biodisponibilidad. En este sentido, el estudio microscópico de las fuentes de carotenoides puede ser de gran importancia en investigación. Por ejemplo, puede ser de mucha utilidad para evaluar el efecto que el procesamiento tiene en la biodisponibilidad de estos compuestos.

REFERENCIAS

- Aman, R., Schieber, A., y Carle, R. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9512-9518.
- Austin, J.R., Frost, E., Vidi, P.A., Kessler, F. y Staehelin, L.A. 2006. *The Plant Cell* 18: 1693-1703.
- Ben-Amotz, A. y Levy, Y. 1996. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63: 729-734.
- Ben-Shaul, Y. y Shimon, K. 1965. *Botanical Gazette* 126: 79-85.
- Borel, P., Grolier, P., Armand, M., Partier, A., Lafont, H., Lairon, D., Azais-Braesco, V. 1996. *Journal of Lipid Research* 37: 250-261.
- Bréhélin, C., Kessler, F. y Van Wijk, K. 2007. *Trends in Plant Science* 12: 260-266.
- Britton, G. 2008. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids*, pp. 189-212. Basilea: Birkhäuser.
- Britton, G. y Khachik, F. 2009. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids Volume 5: Nutrition y Health*, pp. 45-66. Basilea: Birkhäuser.
- Brown, E.D., Micozzi, M.S., Craft, N.E., Bieri, J.G., Beecher, G., Edwards, B.K., Rose, A., Taylor, P.R., Smith, J.C. 1989. *The American Journal of Clinical Nutrition* 49: 1258-1265.
- Brown, M.J., Ferruzzi, M.G., Nguyen, M.L., Cooper, D.A., Eldridge, A.L., Schwartz, S.J., White, W.S. 2004. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80: 396-403.
- Castenmiller, J.J.M., West, C.E., Linssen, J.P.H., Van Het Hof, K.H., Voragen, A.G.J. 1999. *The Journal of Nutrition* 129: 349-355.
- Cazzonelli, C.I. y Pogson, B. J. 2010. *Trends in Plant Science* 15: 266-274. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.02.003.
- Clement, C.R., Weber, J.C., Van Leeuwen, J., Astorga Domian, C., Cole, D.M., Arévalo Lopez, L.A., Argüello, H. 2004. *Agroforestry Systems* 61-62: 195-206.
- Cooperstone, J.L., Ralston, R.A., Riedl, K.M., Haufe, T.C., Schweiggert, R.M., King, S.A., Timmers, C.D., Francis, D., Lesinski, G.B., Clinton, S.K., Schwartz, S.J. 2015. *Molecular Nutrition & Food Research* 59: 658-669.
- De Pee, S., West, C.E., Permaesih, D., Martuti, Muhilal, S., Hautvast, J.G. 1998. *The American Journal of Clinical Nutrition* 68: 1058-1067.
- Deming, D., Boileau, T., Heintz, K., Atkinson, C., Erdman, J. 2002. En E. Cárdenas y L. Packer (eds.). *Handbook of Antioxidants*. Nueva York: Marcel Dekker Inc.
- Deruère, J., Römer, S., D'harlingue, A., Backhaus, R.A., Kuntz, M. y Camara, B. 1994. *The Plant Cell* 6: 119-133.

REFERENCIAS

- Egea, I., Barsan, C., Bian, W., Purgatto, E., Latche, A., Chervin, C., Bouzayen, M., Pech, J.C. 2010. *Plant y Cell Physiology* 51: 1601-11.
- Erdman Jr, J.W., Bierer, T.L. y Gugger, E.T. 1993. *Annals of the New York Academy of Sciences* 691: 76-85.
- Evert, R.F. 2006. En R.F. Evert (ed.). *Esau's Plant Anatomy*, pp. 15-43. Hoboken: John Wiley and Sons.
- Fu, X., Kong, W., Peng, G., Zhou, J., Azam, M., Xu, C., Grierson, D., Chen, K. 2012. *Journal of Experimental Botany* 63: 341-354.
- Garti, N., Shevachman, M. y Shani, A. 2004. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 81: 873-877.
- Harris, W.M. y Spurr, A.R. 1969. *American Journal of Botany* 56: 380-389.
- Hempel, J., Amrehn, E., Quesada, S., Esquivel, P., Jiménez, V.M., Heller, A., Carle, R., Schweiggert, R.M. 2014. *Planta* 240: 1037-1050.
- Hudák, J., Gálová, E. y Zemanová, L. 2005. En M. Pessaraki (ed.). *Handbook of Photosynthesis*. Boca Raton: CRC Press.
- Jeffery, J., Holzenburg, A. y King, S. 2012. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 2594-602.
- Jiménez, V.M., Mora-Newcomer, E. y Gutiérrez-Soto, M.V. 2014. En R. Ming y P.H. Moore (eds.). *Genetics and Genomics of Papaya*, pp. 17-33. Nueva York: Springer.
- Khan, N.C., West, C.E., De Pee, S., Bosch, D., Phuong, H.D., Hulshof, P.J.M., Khoi, H.H., Verhoef, H., Hautvast, J.G.A.J. 2007. *The American Journal of Clinical Nutrition* 85: 1112-1120.
- Knoth, R. 1981. *Protoplasma* 106: 249-259.
- Knoth, R., Hansmann, P. y Sitte, P. 1986. *Planta* 168: 167-174.
- Kopec, R.E., Cooperstone, J.L., Schweiggert, R.M., Young, G.S., Harrison, E.H., Francis, D.M., Clinton, S.K., Schwartz, S.J. 2014. *The Journal of Nutrition* 144: 1158-1166.
- Liedvogel, B., Sitte, P., y Falk, H. 1976. *Cytobiologie* 12: 155-174.
- Mora-Urpí, J., Weber, J. y Clement, C. 1997. *Peach Palm Bactris gasipaes Kunth. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops*. 20. Roma: International Plant Genetic Resources Institute.
- Ötles, S., y Çagınd, Ö. 2008. En C. Socaciu (ed.). *Food Colorants: Chemical y Functional Properties*, pp. 51-70. Boca Raton: CRC Press.
- Pasenkiewicz-Gierula, M., Baczyński, K., Murzyn, K., Markiewicz, M. 2012. *Acta Biochimica Polonica* 59: 115-118.

REFERENCIAS

- Purcell, A.E., Carra, J.H. y DeGruy, I.V. 1963. *Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society* 17: 123-127.
- Roca, M., Hornero-Méndez, D., Gandul-Rojas, B. Mínguez-Mosquera, M.I. 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8782-8787.
- Rock, C.L., Lovalvo, J.L., Emenhiser, C., Ruffin, M.T., Flatt, S.W., Schwartz, S.J. 1998. *The Journal of Nutrition* 128: 913-916.
- Rodríguez-Amaya, D.B. y Tavares, C.A. 1992. *Food Chemistry* 45: 297-302.
- Rodríguez-Amaya, D.B. y Kimura, M. 2004. *Harvest plus Handbook for Carotenoid Analysis, Harvestplus Technical Monographs*. Washington, D.C.: International Food Policy Research Institute/International Center for Tropical Agriculture.
- Rojas-Garbanzo, C., Pérez, A.M., Bustos-Carmona, J. y Vaillant, F. 2011. *Food Research International* 44: 2377-2384.
- Rosso, S.W. 1967. *Journal of Ultrastructure Research* 20: 179-189.
- Rosso, S.W. 1968. *Journal of Ultrastructure Research* 25: 307-322.
- Schweiggert, R.M., Steingass, C.B., Heller, A., Esquivel, P., Carle, R. 2011. *Planta* 234: 1031-1044.
- Schweiggert, R.M., Steingass, C.B., Mora, E., Esquivel, P., Carle, R. 2011a. *Food Research International* 44: 1373-1380.
- Schweiggert, R.M., Mezger, D., Schimpf, F., Steingass, C.B., Carle, R. 2012. *Food Chemistry* 135: 2736-2742.
- Schweiggert, R.M., Kopec, R.E., Villalobos-Gutierrez, M.G., Högel, J., Quesada, S., Esquivel, P., Schwartz, S.J., Carle, R. 2014. *British Journal of Nutrition* 111: 490-498.
- Simpson, D.J., Rayman, F.M.M., Buckle, K.A. y Lee, T.H. 1974. *Australian Journal of Plant Physiology* 1: 135-147.
- Sitte, P. 1980. En F.G.C. Czygan (ed.). *Pigments in Plants*, pp. 117-148. Stuttgart y Nueva York: G. Fischer Verl.
- Sitte, P. 1981. En O. Kiermayer (ed.). *Cytomorphogenesis in Plants*, pp. 401-421. Viena: Springer.
- Straus, W. 1950. *Science* 112: 745-748.
- Sujak, A., Gabrielska, J., Grudziński, W., Borc, R., Mazurek, P., Gruszecki, W.I. 1999. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 371: 301-307.
- Surles, R.L., Weng, N., Simon, P.W. y Tanumihardjo, S.A. 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3417-3421.
- Tassi, E. M. M., y J. Amaya-Farfán. 2008. *Ecology of Food and Nutrition* 47: 77-94.

REFERENCIAS

- Unlu, N.Z., Bohn, T., Clinton, S.K. y Schwartz, S.J. 2005. *The Journal of Nutrition* 135: 431-436.
- USDA. 2012. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25. Nutrient Data Laboratory Home Page.
- Van Het Hof, K.H., Tijburg, L.B.M., Pietrzik, K., Weststrate, J.A. 1999. *British Journal of Nutrition* 82: 203-212.
- Vásquez-Caicedo, A.L., Heller, A., Neidhart, S, y Carle, R. 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5769-5776.
- Widomska, J. y Subczynski, W.K. 2008. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778: 10-19.
- Wieslaw, G. 2010. En J. Landrum (ed.). *Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties*, pp. 19-30. Boca Raton: CRC Press.
- Wrischer, M., y Ljubescic, N. 1984. *Acta Botanica Croatica* 43: 19-24.
- Zhou, J.R., Gugger, E.T. y Erdman, J.W. 1996. *Journal of the American College of Nutrition* 15: 84-91.