

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

**Master Universitario Oficial en Técnicas Avanzadas para la
Investigación y la Producción en Fruticultura**



**“CONTENIDO EN ANTOCIANOS Y
COMPUESTOS FENÓLICOS EN
DIFERENTES FRUTOS FRESCOS Y
DESHIDRATADOS”**

TRABAJO FIN DE MASTER

AUTOR:

María Emma García Pastor

DIRECTOR/ES:

María Serrano Mula

Daniel Valero Garrido

Junio 2016



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Se autoriza a la alumna **D^a. María Emma García Pastor** a realizar el Trabajo Fin de Master titulado: “Contenido en Antocianos y Compuestos Fenólicos en diferentes frutos frescos y deshidratados”, bajo la dirección de D^a. María Serrano Mula y D. Daniel Valero Garrido, debiendo cumplir las directrices marcadas para la redacción del mismo, que están a su disposición en la Normativa para la realización de Trabajos Fin de Máster que se halla en la página Web.

Orihuela, a 7 de mayo de 2016

El Director del Máster Oficial en Técnicas Avanzadas para la Investigación
y la Producción en Fruticultura



Fdo.: Juan José Martínez Nicolás

TRIBUNAL	
FECHA:	
PRESIDENTE:	FIRMA:
SECRETARIO:	FIRMA
VOCAL:	FIRMA

Anexo I

MÁSTER OFICIAL EN TÉCNICAS AVANZADAS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PRODUCCIÓN EN FRUTICULTURA

INFORME Y VISTO BUENO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO 2015/2016



Director/es del trabajo	Área/s de Conocimiento
María Serrano Mula	Fisiología Vegetal
Daniel Valero Garrido	Tecnología de Alimentos

Declara/n que el Trabajo Fin de Máster

Título del Trabajo
Contenido en Antocianos y compuestos fenólicos en diferentes frutos frescos y deshidratados.
Alumno/a
María Emma García Pastor

cumple los requisitos necesarios para poder ser defendido ante el tribunal correspondiente y emite/n el siguiente:

Informe
La alumna ha mostrado una excelente disposición a la hora de realizar este Trabajo Fin de Máster, tanto en las determinaciones analíticas realizadas como en la redacción, interpretación y discusión de los resultados. Consideramos que su trabajo ha sido muy bueno, por lo que le otorgamos la máxima calificación.

  <p style="text-align: center;">Orihuela, a 20 de junio de 2016</p> <p style="text-align: center;">Firma/s director/es trabajo</p>

SR. D. JUAN JOSÉ MARTÍNEZ NICOLÁS, DIRECTOR DEL MÁSTER OFICIAL EN TÉCNICAS AVANZADAS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PRODUCCIÓN EN FRUTICULTURA

Anexo V

MÁSTER OFICIAL EN TÉCNICAS AVANZADAS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PRODUCCIÓN EN FRUTICULTURA

REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MASTER

Identificaciones:

Autor: María Emma García Pastor.

Título: Contenido en antocianos y compuestos fenólicos en diferentes frutos frescos y deshidratados.

Title: Content in anthocyanins and phenolic compounds in different fresh and dehydrated fruits.

Director/es del TFM: María Serrano Mula y Daniel Valero Garrido.

Año: 2016

Titulación: Máster oficial en técnicas avanzadas para la investigación y la producción en fruticultura.

Tipo de Trabajo: Experimental.

Palabras claves: Frutos rojos, compuestos bioactivos, propiedades funcionales, deshidratación, métodos de conservación.

Keywords: Berries, bioactive compounds, functional properties, dehydration, conservation methods.

Nº citas bibliográficas: 104

Nº de tablas: 8

Nº de figuras: 23

Resumen:

Estudios epidemiológicos han observado una asociación consistente entre el consumo de frutas y hortalizas y un menor riesgo de sufrir enfermedades crónicas como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Hay pruebas de que gran parte del potencial beneficioso para la salud de estos alimentos de origen vegetal puede provenir de su contenido en compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y no designados como nutrientes tradicionales. Los frutos rojos como fresas, granadas, frambuesas y grosellas y morados-azulados como uvas, arándanos y moras son frutos ricos en compuestos fenólicos, entre los que destacan las antocianinas que les otorgan su color característico. No obstante, estos frutos son estacionales y muy perecederos, por lo que sólo están disponibles en el mercado durante un tiempo muy corto.

Una de las tecnologías de conservación prolongada de frutos es la deshidratación parcial, en este trabajo se estudia la influencia de dicho método sobre el contenido en compuestos bioactivos, antocianos y fenoles, así como se realiza una identificación y cuantificación de los antocianos individuales en dichos frutos. Los resultados obtenidos muestran que frutos como la grosella son muy óptimos para la conservación mediante el método estudiado.

Abstract:

Epidemiological studies have found a consistent association between consumption of fruits and vegetables and reduced risk of chronic diseases such as cancer and cardiovascular disease. There is evidence that much of the potential health benefit of these plant foods may come from the content of bioactive compounds with antioxidant properties and not designated as traditional nutrients. Red fruits like strawberries, pomegranates, raspberries and currants and blue-purple grapes, blueberries and blackberries fruits are rich in phenolic compounds, among which are the anthocyanins that give them their characteristic color. However, these fruits are seasonal and highly perishable, so they are only available in the market for a very short time.

One of the technologies of prolonged preservation of fruits is the partial dehydration, in this work the influence of this method on the content of bioactive compounds, anthocyanins and phenols is studied, as well as an identification and quantification of individual anthocyanins is done in such fruits . The results show that fruits such as currants are optimal for preservation by the method studied.

Fuente: Google Translator

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. FENOLES Y ANTOCIANINAS: ESTRUCTURA QUÍMICA Y FUNCIONES EN LAS PLANTAS	8
1.2. ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS.....	9
1.3. INGESTA Y BIODISPONIBILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS	12
1.4. BENEFICIOS SOBRE LA SALUD DE ANTOCIANINAS Y FENOLES.....	13
1.5. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN MEDIANTE SECADO O DESHIDRATACIÓN	19
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	31
3.2. PROCESO DE DESHIDRATACIÓN CON ESTUFA DE AIRE CALIENTE	32
3.3. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANOS TOTALES POR ESPECTROFOTOMETRÍA.....	33
3.4. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR FOLIN-CIOCALTEU.....	36
3.5. IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANOS TOTALES POR HPLC-DAD-ESI/MSn Y CUANTIFICACIÓN POR RP-HPLC-DAD	38
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1. CURVAS DE DESHIDRATACIÓN DE LOS DIFERENTES FRUTOS.....	41
4.2. CONTENIDO DE ANTOCIANOS TOTALES EN FRUTOS FRESCOS Y DESHIDRATADOS	43
4.3. CONTENIDO DE FENOLES TOTALES EN FRUTOS FRESCOS Y DESHIDRATADOS.....	44
4.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANOS INDIVIDUALES	46
5. CONCLUSIONES	59
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61



INTRODUCCIÓN

1



Introducción**1. INTRODUCCIÓN****1.1. FENOLES Y ANTOCIANINAS: ESTRUCTURA QUÍMICA Y FUNCIONES EN LAS PLANTAS**

Los polifenoles son uno de los grupos más abundantes y ubicuos de metabolitos secundarios de las plantas, que se encuentran en una amplia serie de frutos y hortalizas (Perez-Jimenez et al., 2010). Los compuestos polifenólicos son producidos en la planta por vías biosintéticas y están implicados en una gran variedad de actividades fisiológicas y ecológicas, apoyando diversas funciones tales como la estructura, la pigmentación, la polinización, la alelopatía, la resistencia a patógenos y depredadores, así como el crecimiento y el desarrollo (Crozier et al., 2006; Jaganath and Crozier, 2009).

En las plantas los compuestos fenólicos poseen una amplia gama de actividades biológicas y relacionadas con la interacción de las plantas con su ambiente. Así actúan como disuasorios de herbívoros, atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas, en las funciones alelopáticas, etc.

Desde un punto de vista químico, los polifenoles constituyen una clase bastante heterogénea, caracterizada por la presencia común de al menos un anillo aromático en su estructura, vinculado con otro grupo químico fenólico, hidroxilo, carbonato u otro, mostrando una amplia variedad de estructuras moleculares. Abarcan tanto compuestos de bajo peso molecular y estructuras simples (por ejemplo, ácidos fenólicos) como de alto peso molecular y compuestos poliméricos complejos (por ejemplo, taninos), con consecuencias obvias en términos de solubilidad, permeabilidad de la membrana y bioactividades putativas.

Los polifenoles se clasifican generalmente en flavonoides y no flavonoides, dependiendo de su estructura química. El primer grupo está formado por una gran familia de compuestos, subdividido en varias subclases, seis de las cuales ofrecen una mayor relevancia en la dieta, es decir, flavonoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, antocianinas, y flavan-3-oles (Crozier et al., 2009), mientras que los no flavonoides incluyen condensados principalmente y taninos hidrolizables, estilbenos, ácidos fenólicos e hidroxicinamatos.

Dentro de dichos polifenoles, podemos definir las antocianinas como un grupo de pigmentos naturales responsables del color rojo-azul atractivo de las flores y de muchas frutas. Son glicósidos de polihidroxi- y polimetoxi- derivados de 2-fenil benzopirilio o sales de flavilium. Seis antocianidinas, la versión aglicona de las antocianinas, se encuentran comúnmente en las plantas: cianidina, pelargonidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina. Los azúcares más comúnmente unidos a dichas antocianidinas son: glucosa, galactosa, ramnosa y arabidosa (Figura N° 1).

Introducción

Algunos ácidos alifáticos o aromáticos también pueden unirse al residuo del azúcar (Bridle and Timberlake, 1997; Castañeda-Ovando et al., 2009).

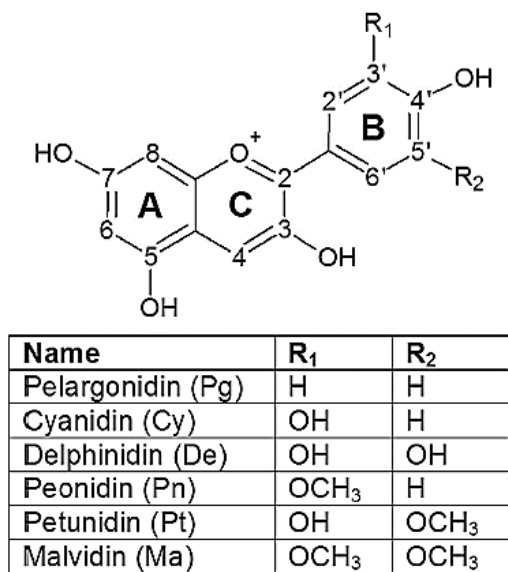


Figura N° 1. Estructuras de las antocianinas comunes. Fuente: Jim Fang, 2015.

Las mayores concentraciones de antocianinas se encuentran en algunos frutos rojos tipo baya, como arándanos o moras (hasta 5000 mg kg⁻¹), en las uvas rojas (hasta 7500 mg kg⁻¹) y el vino tinto (hasta 350 mg L⁻¹). Las granadas, coles rojas, zanahorias púrpuras, patatas púrpuras y el maíz morado, también poseen un alto contenido de antocianinas (Figura 2) (Pascual-Teresa et al., 2010; Wu et al., 2006; Mena et al., 2011).

1.2. ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS

El contenido en antocianinas puede variar enormemente dentro de un cierto tipo de fruto dependiendo de la variedad, factores agronómicos y condiciones ambientales y, por otra parte, tanto por la degradación como por la formación de productos derivados que tienen una gran influencia en el contenido de antocianinas y en los perfiles de los alimentos y bebidas procesadas. De hecho, la estabilidad es un elemento muy importante (y difícil) cuando se considera el impacto de las antocianinas en la dieta sobre el organismo humano. Las antocianinas comunes muestran la inestabilidad hacia una variedad de parámetros químicos y físicos, incluyendo el oxígeno, las altas temperaturas, la luz, los valores de pH, las enzimas y las reacciones con compuestos en los alimentos o sistemas corporales, que pueden variar las propiedades de las antocianinas (Andersen and Jordheim, 2013).

Durante años, el principal foco sobre las antocianinas en los alimentos se ha fijado en la influencia que tienen sobre el color.

Introducción

En los tejidos vegetales intactos (es decir, frutas y vegetales no procesados), las antocianinas se mantienen relativamente estables. Sin embargo, la interrupción del tejido durante el procesamiento de los alimentos afecta a la capacidad de extracción y estabilidad de dichos compuestos. Se ha sugerido que la extracción de las antocianinas de las bayas en forma de zumo podría estar limitada por la interacción de estas con macromoléculas que componen las paredes celulares rotas, tales como; polisacáridos, taninos, y proteínas. Sin embargo, los factores que regulan dichas interacciones aún no están bien definidos y siguen siendo un área de investigación prometedora.

Por otra parte, el almacenamiento puede afectar también a la estabilidad de las antocianinas, dando lugar a cambios de color. En los sistemas de alimentos, además de ser sometidas a los equilibrios entre formas estructurales, las antocianinas pueden participar en reacciones químicas y enzimáticas que pueden degradar los productos a incoloros o transformarlos en nuevas estructuras. De hecho, la búsqueda de una mejora de los métodos de procesamiento y almacenamiento para controlar mejor las pérdidas de antocianinas o para hacer frente a las reacciones con el fin de obtener colores más estables y deseados, constituye un importante desafío para la industria alimentaria.

La estabilidad y las reacciones de las antocianinas se han estudiado particularmente en el vino tinto, en el que una gran variedad de productos derivados de las antocianinas, se han identificado en las dos últimas décadas como pigmentos condensados, piranoantocianos y flavanol-antocianina, ya sean vinculados directamente o que implican aldehídos, dímeros de antocianinas o pigmentos xanthylum (De Freitas and Mateus, 2010). Productos similares han sido encontrados en más frutas y verduras (Fossen et al., 2004; Gonzalez-Paramas et al., 2006), y en otros alimentos de origen vegetal (Tarascou et al., 2011; McDougall et al., 2005). Algunos de estos compuestos poseen propiedades cromáticas interesantes, mostrando una variedad de colores de naranjas a azules y son más resistentes a la decoloración del color por el ataque del agua o del dióxido de azufre, de modo que muestran una capacidad de color mayor a valores de pH neutros y débilmente ácidos que las antocianinas originales (De Freitas and Mateus, 2010).

Las antocianinas son autorizados como aditivos alimentarios, tanto en la Unión Europea (E-163) como en los Estados Unidos, donde la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration o FDA) los incluye como algo natural "*Colorantes exentos de certificación*" (Andersen and Jordheim, 2013). Sin embargo, las aplicaciones de las antocianinas como colorantes de alimentos están seriamente limitadas debido a sus problemas de estabilidad.

Introducción



Ingesta alimentaria estimada: 50-60 mg·día⁻¹.

Biodisponibilidad: Una cantidad limitada de antocianinas glicosiladas se absorbe directamente. El exceso se somete a reordenamientos por la microflora del colon.

Metabolitos y catabolitos del colon relevantes para humanos: Conjugados de antocianidinas metilo, glucurónido y sulfato; Ácidos protocatecuico, siríngico, vanílico, propiónico e hidroxihipúrico; catecol, pirogalol.

Efectos ateroprotectores: Las frutas ricas en antocianinas están relacionadas con una menor rigidez arterial y presión arterial, con la reducción de los niveles plasmáticos de lípidos.

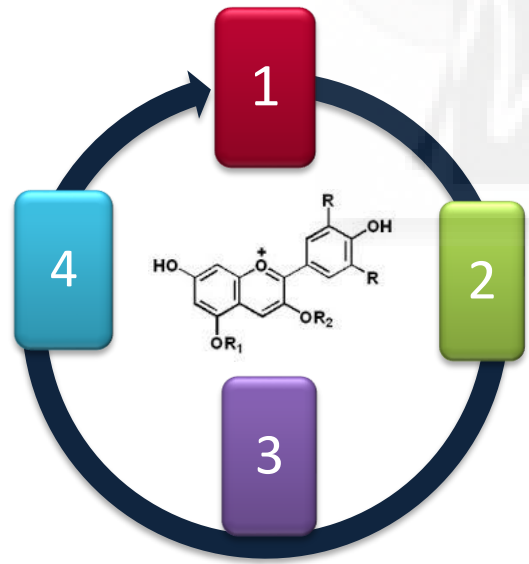


Figura 2. Fuentes dietéticas, biodisponibilidad, metabolismo y efectos ateroprotectores de las antocianinas. Fuente: Zanotti et al., 2015.

Introducción

1.3. INGESTA Y BIODISPONIBILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS

Debido al interés actual en las posibles asociaciones entre el consumo de antocianinas y la promoción de la salud, la estimación de la ingesta dietética de antocianinas también se ha convertido en un punto de interés, de manera que se puedan establecer relaciones adecuadas con la incidencia de enfermedades crónicas. Es, sin embargo, difícil de calcular adecuadamente el consumo de antocianinas (Andersen and Jordheim, 2013). Los datos precisos sobre la composición cualitativa y cuantitativa de las antocianinas en los alimentos y bebidas, no están siempre disponibles ni no son fáciles de obtener debido a la gran diversidad estructural de las antocianinas y a sus problemas de estabilidad.

Estimaciones realizadas por diferentes investigadores varían dentro de una amplia gama, oscilando de 3 a 150 mg día⁻¹, dependiendo de los hábitos del país y de la nutrición. En un cálculo aproximado, se ha estimado una ingesta promedio de antocianinas en un adulto en Europa y Estados Unidos de 10 mg·día⁻¹ (Andersen and Jordheim, 2013). Sin embargo, se necesitan más estudios destinados a aumentar nuestro conocimiento sobre la composición de antocianinas en los alimentos que más se consumen de diferentes países, teniendo en cuenta que no sólo el consumo total es importante, sino también los perfiles cualitativos los cuales tienen una influencia sobre los efectos en la salud.

Las frutas ricas en antocianinas se pueden dividir en tres grupos en función de los tipos de agliconas de sus antocianinas: grupo pelargonidina, grupo cianidina/peonidina y el grupo de múltiples antocianidinas (Figura N° 1). Algunas frutas contienen una antocianina predominante (Pojer et al., 2013) y son importantes en la investigación sobre la absorción y beneficios en la salud de las frutas ricas en dichos compuestos. Estos incluyen las fresas (pelargonidina-3-glucósido), cerezas dulces (cianidina-3-rutinósido), arándanos rojos (cianidina-3-galactósido), etc. Por ejemplo, en las fresas se estudió la absorción, metabolismo y excreción de pelargonidina-3-glucósido, antocianina predominante en dicha fruta (Azzini et al., 2010).

Las antocianinas parecen tener una biodisponibilidad baja, con recuperaciones típicas de < 1 % de la ingesta (Kay et al., 2005; 13. McGhie and Walton, 2007; Manach et al., 2005). Estudios de alimentación humana han demostrado que, tras el consumo de productos alimenticios ricos en dichos compuestos, las antocianinas, pero principalmente sus conjugados de fase II (metilo, glucurónido y sulfato), alcanzan rápidamente las concentraciones plasmáticas máximas no superando el rango nanomolar, típico de la absorción en el tracto gastrointestinal superior. Sin embargo, la gran mayoría de las antocianinas ingeridas alcanzan el intestino grueso, donde son metabolizadas por la microbiota intestinal (Figuras N° 2 y N° 3) (De Ferrars et al., 2014; González-Barrio et al., 2011; Czank et al., 2013).

Introducción

Una vez en el intestino grueso, las antocianinas se hidrolizan por la microbiota local a través de la actividad del enzima β -glucosidasa (Ávila et al., 2009). Las agliconas resultantes se descomponen por la escisión del anillo C3 y se metabolizan adicionalmente en una amplia gama de componentes fenólicos y aldehídicos. El ácido protocatéquico se ha señalado como el principal catabolito de cianidina-3-O-glucósido en los seres humanos (Vitaglione et al., 2007). Los ácidos galo, siríngico y vanílico se han identificado como los principales productos de la degradación de delfinidina-3-O-glucósido, malvidin-3-O-glucósido y peonidin-3-O-glucósido, respectivamente (González-Barrio et al., 2011; García-Muñoz et al., 2014).

1.4. BENEFICIOS SOBRE LA SALUD DE ANTOCIANINAS Y FENOLES.

En las últimas décadas, un número creciente de ensayos clínicos y estudios epidemiológicos han atraído la atención combinada de los nutricionistas y médicos sobre el papel potencial de los polifenoles en la prevención de varias enfermedades degenerativas. Por otra parte, varias investigaciones *in vitro* han tratado recientemente de investigar los mecanismos subyacentes de la acción de estos fitoquímicos en varios cultivos celulares diferentes (Del Rio et al., 2013).

La modulación positiva de la salud humana atribuida a los polifenoles ha surgido de forma constante durante los años a través de diferentes modelos *in vitro/ex vivo*, en experimentos *in vivo* y en ensayos clínicos (Del Rio et al., 2013). Se ha prestado atención considerable a la investigación del metabolismo y biodisponibilidad de los polifenoles en el organismo humano, como un paso esencial en la comprensión de su actividad biológica.

Tras la ingestión, los polifenoles son metabolizados después de la vía de desintoxicación típica y común en xenobióticos y drogas, a partir de la boca (Figura Nº 3). Aunque se conoce la capacidad de la saliva bucal y de la secreción gástrica modificando las estructuras polifenólicas nativas, se sabe que dicha capacidad es más bien débil (Walle et al., 2005; Yang et al., 1999; Lee et al., 2004; Hirota et al., 2011) y que el primer órgano fuertemente implicado en la modificación de polifenoles y digestión es el intestino delgado.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), apuntaladas por la aterosclerosis, representan la principal causa de muerte en las sociedades industrializadas (Lloyd-Jones et al., 2010). Los estudios epidemiológicos han identificado al menos dos clases de factores de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis; de comportamiento (tabaquismo, inactividad física, dieta poco saludable), y metabólico (hipertensión arterial, diabetes, niveles altos de lípidos, obesidad).

Introducción

Sin embargo, los niveles elevados de colesterol en suero se han identificado como la fuerza impulsora fundamental para el desarrollo de la aterosclerosis, en ausencia de otros factores de riesgo conocidos (Glass and Witztum, 2001).

En particular, el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) representa uno de los principales factores predictivos de enfermedades coronarias del corazón. Por el contrario, varios estudios epidemiológicos han apoyado fuertemente la correlación inversa entre los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y el riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular (Santos-Gallego et al., 2011).

Varias observaciones epidemiológicas han relacionado la ingesta de compuestos (poli)fenólicos con efectos ateroprotectores en los seres humanos. En particular, se ha observado una mejora del metabolismo de lípidos que causa una reducción de los factores de riesgo cardiovascular tras consumir dietas enriquecidas con nueces, café, cacao, uvas y bayas. En esta parte de la revisión, también se han añadido granada y aceite de oliva, aunque las actividades cardioprotectoras de estos alimentos se han asociado principalmente con efectos antioxidantes y antiinflamatorios. Sin embargo, Zanotti et al. (2015) sugieren que estos compuestos pueden modular positivamente el metabolismo de los lípidos. Una síntesis visual de los conocimientos actuales se proporciona en la Figura N° 4.

Varios productos dietéticos se originan a partir de las uvas, como el zumo de uva, extractos a base de uva de semillas de uva y orujo de uva y, por supuesto, el vino.

Está bien establecido que el vino tinto, en particular, produce efectos cardioprotectores. Sin embargo, el vino fue excluido de la presente discusión, debido a los efectos potenciales de confusión del alcohol. Muchos estudios han demostrado que todos los productos de la uva no alcohólicos pueden producir efectos ateroprotectores (Dohadwala and Vita, 2009.). Uvas, especialmente las variedades tintas, contienen cantidades significativas de antocianinas, monómeros flavan-3-ol, proantocianidinas, ácidos fenólicos (es decir, ácido gálico), hidroxycinamatos, así como niveles de trazas de resveratrol y flavonoles. La ingestión de productos de la uva se ha asociado con una disminución en la cantidad de LDL (-17 %), triglicéridos (-15 %) y apoB, además de un posible aumento en la cantidad de HDL (+12 %) y apoA1, tanto en sujetos sanos como en pacientes con alto riesgo cardiovascular, como mujeres posmenopáusicas, pacientes de hemodiálisis y diabéticos (Figura N° 4) (Castilla et al., 2006; Zern et al., 2005; Vislocky and Fernandez, 2010).

Durante mucho tiempo se ha reconocido que una dieta enriquecida en bayas tiene efectos ateroprotectores. Grandes estudios observacionales revelaron que esto se atribuye principalmente al contenido de antocianinas de las bayas, cuyo consumo se asocia con un efecto protector contra el infarto de miocardio

Introducción

(Cassidy et al., 2013), principalmente debido a su impacto en la rigidez arterial y presión arterial (Jennings et al., 2012). Los estudios que evalúan los efectos ateroprotectores de las bayas se han realizado utilizando extractos de diferentes tipos de bayas (Figura N^o 2). En un estudio que utiliza ratas alimentadas con arándanos, se demostró el impacto de derivados de ácido fenólicos (Xie et al., 2011). La ingesta dietética promedio estimada de antocianinas es de aproximadamente 60 mg·día⁻¹ (Figura N^o 2), pero se conoce una gran variabilidad acorde a los hábitos dietéticos específicos, siendo la ingesta diaria de más de 1 g factible (Clifford, 2000). Una revisión de la literatura indica que las bayas con mayor contenido de cianidina, tales como frambuesas negras, bayas de aronias y arándanos Europeos, son más propensas a producir un efecto antiinflamatorio.

Esta observación está vinculada a la hipótesis de que uno o más metabolitos estables del ácido fenólico contribuyen a los efectos antiinflamatorios de las frutas ricas en antocianinas. Se necesitan más estudios antes de que podamos concluir que las frutas ricas en glucósidos de cianidina, peonidina o pelargonidina tienen mejores efectos antiinflamatorios. Además, los polifenoles de las frutas, distintos de antocianinas, podrían contribuir a dichos efectos antiinflamatorios (Jim Fang, 2015). En resumen, este sistema de clasificación puede facilitar la comprensión de procesos metabólicos y de absorción de las antocianinas, así como de los efectos en la salud de diferentes frutas.

Por otro lado, los beneficios cardiovasculares de las granadas están asociados principalmente a sus actividades antioxidantes y antiinflamatorias. Sin embargo, algunos estudios también han revelado un efecto hipolipemiante en sujetos hipercolesterolémicos (Aviram and Rosenblat, 2012). En los animales alimentados con zumo de granada o extractos de diferentes partes de la fruta, se observó una reducción en la aterosclerosis (Figura N^o 4). Esto se asoció con una cantidad reducida de lípidos en suero y con una disminución en la absorción de lípidos a partir de macrófagos (Aviram et al., 2008), lo que fue confirmado en los macrófagos de los sujetos sanos que recibieron el zumo de granada (Rosenblat et al., 2006).

La dieta puede ocupar un papel clave tanto en la prevención primaria como secundaria de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

La evidencia epidemiológica sugiere que las dietas ricas en polifenoles pueden disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular mejorando los perfiles lipídicos. Por lo tanto, los alimentos enriquecidos con estos compuestos pueden ser considerados como factores positivos para una dieta equilibrada y para la promoción de la salud. Es importante tener en cuenta que los efectos beneficiosos de estos alimentos dependen en gran medida del producto final consumido, ya que el procesamiento y la cocción de la materia prima pueden alterar la composición fitoquímica real (Zanotti et al., 2015).

Introducción

Por otro lado, los efectos beneficiosos del consumo de antocianinas en el riesgo cardiovascular son apoyados por la evidencia epidemiológica y mecanicista. Con el fin de explorar los efectos de las bayas *Vaccinium* ricas en antocianinas sobre los lípidos séricos, se realizó un meta-análisis de ensayos controlados aleatorios (ECA). Dieciséis estudios con 1109 sujetos fueron incluidos en dicho meta-análisis. La heterogeneidad significativa confirmó efectos diferenciales entre las subclases *Vaccinium*. El grupo de los arándanos fue significativamente superior al placebo en la mejora de los lípidos. Además, los grupos de arándanos mostraban diferencias significativas en la reducción del LDL-C y en el aumento del HDL-C en comparación con otros tratamientos. Pero para muchos de los otros subgrupos de comparación, no habían pruebas suficientes para establecer conclusiones acerca de dicha eficacia (Zhu et al., 2015).

Sin embargo, se ha demostrado que las antocianinas ejercen beneficios sobre el perfil lipídico en muchos modelos de animales. Aunque actualmente se desconozca que estas moléculas tengan efectos beneficiosos similares en los seres humanos. Qin et al. (2009) también investigaron los efectos de los suplementos de antocianinas derivadas de bayas sobre el perfil de lípidos en suero en pacientes con dislipidemia, pudiendo concluir que la administración de dichos suplementos en los seres humanos mejoraba las concentraciones del colesterol LDL y HDL, así como aumentaba el eflujo de colesterol celular hacia el suero. Estos beneficios podrían deberse a una inhibición de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol en plasma.

También se ha podido observar como varios compuestos entre flavonoides, en particular los flavan-3-oles y antocianinas, mejoran la función endotelial en los estudios experimentales. Esta mejora es probable que sea mediada por una mayor disponibilidad de la molécula de señalización, óxido nítrico, la cual aumenta la relajación vascular del músculo liso arterial conduciendo a la vasodilatación (Wallace, 2011). El óxido nítrico es sintetizado por la enzima sintasa de óxido nítrico, y los flavan-3-oles y antocianinas han demostrado regular positivamente la expresión de dicha enzima y de su actividad. Además, se ha podido demostrar que los compuestos de antocianidinas inhiben la enzima NADPH oxidasa endotelial, la cual reduce la bioactividad del óxido nítrico en el endotelio (Choi et al., 2008).

Introducción

1

Los polifenoles interactúan con las proteínas salivales causando astringencia. Estos no se metabolizan en la cavidad oral.

2

La gran mayoría pueden resistir a condiciones ácidas en el estómago humano y pueden ser transportados unidos a polisacáridos.

7

Los catabolitos del colon son metabolizados adicionalmente a nivel hepático produciendo metabolitos glucuronizados, metilados y sulfatados. Algunos compuestos pueden someterse a la circulación enterohepática.

3

Los polifenoles pueden formar complejos con las proteínas y enzimas digestivas. Su absorción en el intestino delgado es limitada.

5

Los polifenoles intactos y parcialmente hidrolizados se someten a una pesada biotransformación por parte de la microflora resistente del colon y se degradan a ácidos fenólicos, ácidos hipúricos, fenoles simples, urolitinas y valerolactonas, que se absorben de forma efectiva.

4

Residuos de polifenoles monoméricos, oligoméricos y poliméricos alcanzan el ciego sin sufrir una despolimerización extensa.

6

Los polifenoles unidos a proteínas y catabolitos no absorbidos se excretan.

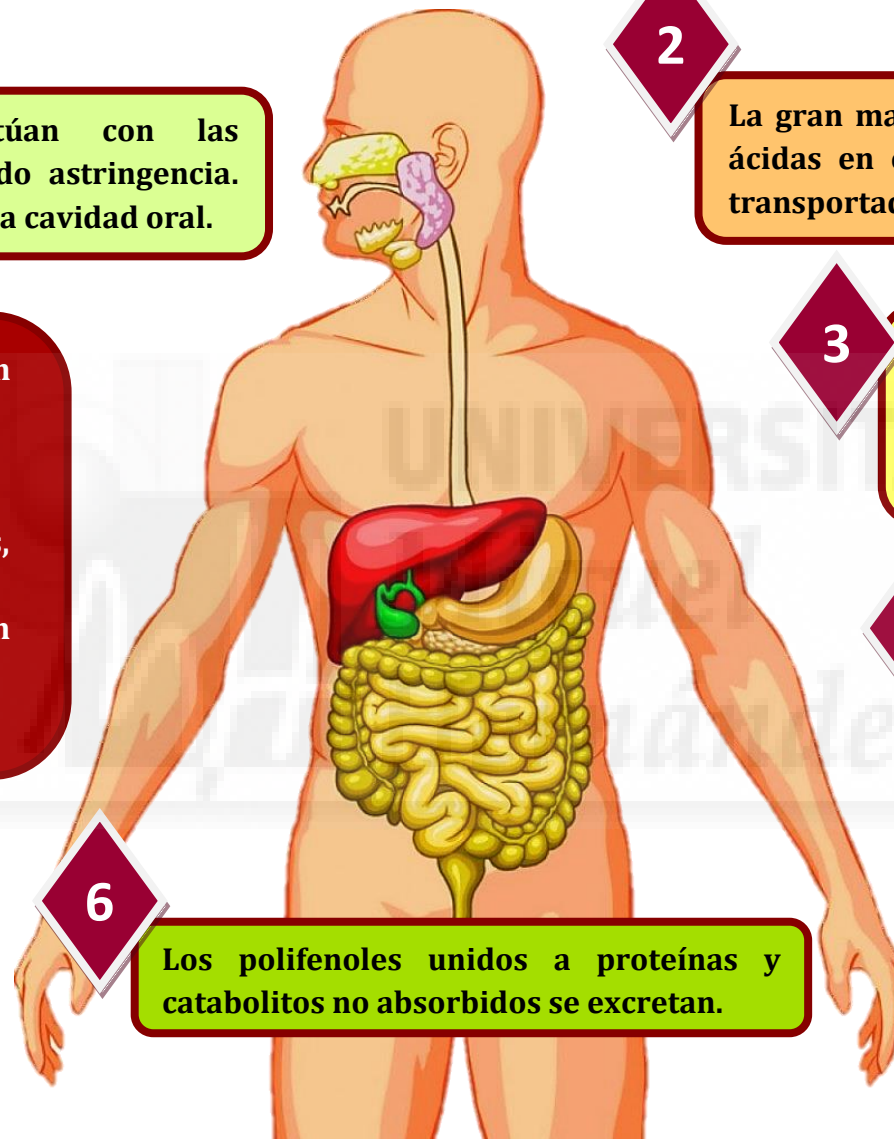


Figura Nº 3. Destino gastrointestinal de los polifenoles provenientes de la dieta tras su ingestión. Fuente: Zanotti et al., 2015.

Introducción

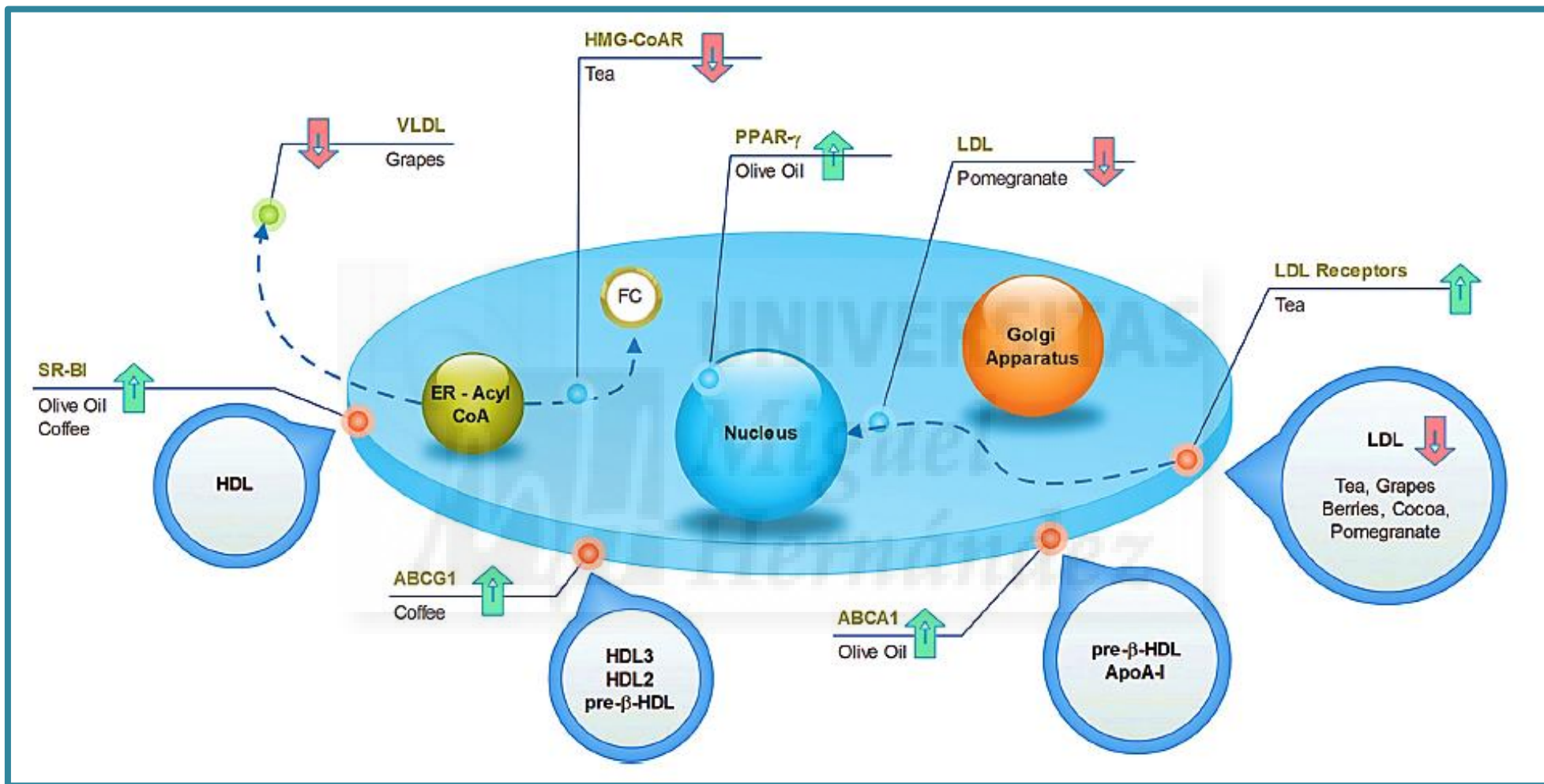


Figura Nº 4. Dianas celulares de los efectos anti-ateroscleróticos de los polifenoles que contienen los alimentos. Fuente: Zanotti et al., 2015.

Introducción

Por ejemplo, las fresas son ricas en una gran variedad de fitoquímicos que han demostrado ser bioactivos. Diferentes estudios de los compuestos individuales de estas han demostrado que poseen: actividad contra el cáncer, bloqueo de la iniciación de la carcinogénesis, así como supresión de la progresión y proliferación de los tumores. Debido al poder antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en las fresas, el consumo de dicho fruto puede tener también un efecto potencial a la hora de reducir el riesgo de enfermedades del corazón (Hannum, 2004).

En conclusión, la relevancia de los estudios *in vitro* y en animales debe ser confirmada en humanos en condiciones *in vivo*, debido a que muchos estudios prueban cantidades de compuestos fenólicos poco realistas. Por otra parte, se han ido evaluado más a menudo compuestos de origen en lugar de metabolitos, a pesar del hecho de que los compuestos originales típicamente tienen una baja biodisponibilidad y una eliminación rápida a través del metabolismo y la excreción (Kay, 2010).

1.5. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN MEDIANTE SECADO O DESHIDRATACIÓN.

El principal objetivo que se persigue durante el procesado de los alimentos es el de conseguir que alimentos perecederos se conviertan en alimentos más estables, capaces de ser almacenados durante largos periodos de tiempo. Son numerosas las tecnologías de las industrias agroalimentarias destinadas a prolongar la conservación de los alimentos tales como; alimentos enlatados, alimentos congelados y alimentos deshidratados. La deshidratación de frutas y hortalizas es especialmente adecuada en países con medios económicos reducidos e insuficientes para el procesado de alimentos, con el empleo de la congelación y de los procesos térmicos (Jayarman and Das Gupta, 2006).

El mercado de las frutas y vegetales deshidratados es importante en numerosos países en el mundo entero (Funebo y Ohison, 1998). Por ejemplo, alrededor de 7,6 billones de dólares fueron gastados en productos vegetales deshidratados en Japón durante el año 2000 (Agencia de estadísticas de Japón, 2001). En China, la producción de vegetales deshidratados supone 800 millones de dólares en exportaciones, mientras que en Estados Unidos y Europa supone un aporte económico de 125 y 260 millones de dólares, respectivamente (Liu et al., 2003).

La mayoría de las frutas y hortalizas contienen más de un 80 % de agua, este motivo hace que estos alimentos sean fácilmente perecederos. Una mala recolección, transporte y almacenamiento producen grandes pérdidas (30-40 %) entre las que se incluyen pérdidas económicas, físicas y nutritivas (Salunkhe and Desai, 1984).

Introducción

La necesidad de reducir las pérdidas que se producen durante la postrecolección hace necesario el procesado de los alimentos con el fin de aumentar su conservación.

La deshidratación se define como la operación unitaria que convierte los materiales líquidos, semisólidos y sólidos en otro producto con una humedad significativamente menor. En la mayoría de los casos, la deshidratación implica la aplicación de energía térmica, la cual provoca la evaporación del agua pasando ésta a fase de vapor. Cuando un sólido húmedo es sometido a deshidratación suceden dos procesos de manera simultánea: (i) transferencia de energía del ambiente para evaporar la humedad superficial y (ii) transferencia de la humedad interna a la superficie del sólido con la consiguiente evaporación debida al proceso (i).

La deshidratación es probablemente el método de conservación más antiguo empleado por los humanos. La extracción de la humedad previene el crecimiento y reproducción de los microorganismos causantes de podredumbres y minimiza muchas de las reacciones que se producen por el alto contenido en agua de los productos vegetales. Esta operación unitaria conlleva una reducción substancial del peso, volumen y de los costes de envasado, transporte y almacenamiento. Estas particularidades son especialmente importantes en países en vías de desarrollo, así como en la carrera militar y espacial (Jayaraman and Das Gupta, 2006).

Sin embargo, un fuerte incremento en el coste de la energía ha hecho aumentar el interés por los métodos de deshidratación en todo el mundo en los últimos 15 años. Los avances que se han producido en las técnicas y en los métodos de deshidratación han puesto a disposición en el mercado numerosos productos deshidratados, especialmente ingredientes que se pueden re-constituir instantáneamente, tales como frutas, verduras y hierbas aromáticas con propiedades impensables varios años atrás. Los cambios que se han producido en el estilo de vida de la población actual, hacen necesario el empleo de este tipo de ingredientes que combinan una gran capacidad de almacenamiento con las propiedades beneficiosas propias de los productos vegetales.

La deshidratación implica la aplicación de altas temperaturas para vaporizar y extraer la humedad de los tejidos de los vegetales. Así, la deshidratación es una combinación simultánea de calor y transferencia de masa para la que se ha de aplicar energía. Numerosos deshidratadores y diferentes técnicas de deshidratación han sido descritos como los más apropiados para cada situación en particular dependiendo del tipo de producto vegetal (Somogyi and Luh, 1986). A continuación, se describe el método de deshidratación empleado en el presente estudio, así como se citan algunos métodos alternativos.

Introducción

- **Deshidratación con aire caliente:**

Actualmente la mayoría de productos vegetales deshidratados se producen mediante la técnica de deshidratación con aire caliente. Dicho método es el más simple y económico de entre todos los métodos de deshidratación empleados.

En este método, el aire caliente entra en contacto con el material vegetal para ser deshidratado y facilitar la transferencia de masa y energía, en este proceso tiene lugar fundamentalmente el fenómeno de la convección. En este sentido, dos aspectos importantes en la transferencia de masa tienen lugar y son la transferencia de agua de la superficie del material y la extracción del vapor de agua de la superficie (Salunkhe and Desai, 1984).

Para conseguir productos deshidratados de elevada calidad a un coste razonable tiene que ocurrir una deshidratación fundamentalmente rápida. Cuatro factores afectan al tiempo total de deshidratación: (i) las propiedades físicas de los alimentos como el tamaño y la geometría, (ii) las propiedades físicas del aire caliente como la temperatura, humedad y velocidad, (iii) las características técnicas del equipo de deshidratación y (iv) la relación entre la geometría de las partículas y el aire (Holdsworth, 1971). Entre las diferentes alternativas al método de secado o deshidratación utilizado, se encuentran: la deshidratación por microondas y la liofilización, entre otras.

Vega-Mercado et al. (2001) consideraron el uso de las microondas como la tecnología de deshidratación de cuarta generación. En general, la deshidratación con MO (DMO) reúne los 4 requerimientos principales para la deshidratación de alimentos: velocidad de operación, eficiencia energética, costes de la operación y calidad del producto deshidratado (Gunasekaran, 1999). Sin embargo, hay una serie de limitaciones y desventajas que tienen lugar en la DMO como son la no uniformidad del campo magnético generado, así como un sobrecalentamiento que pueda producir quemaduras y la aparición de “off-flavors” o aromas o sabores no deseados.

En el caso de la liofilización, es actualmente un proceso comercialmente establecido que está formado por un proceso que tiene lugar en dos etapas: la primera consiste en la congelación del agua que forma parte de los productos vegetales seguida de un calentamiento en el producto produciendo así la sublimación del agua a fase de vapor. Las ventajas de la liofilización son numerosas: La contracción es mínima, el movimiento de sólidos solubles en el material sólido es mínimo, la estructura porosa que se crea en el material favorece la rehidratación y la retención de los compuestos volátiles es elevada. Con motivo de estas ventajas, se puede afirmar que la liofilización es el método de deshidratación con mayores prestaciones y mejores resultados en numerosos productos vegetales. Sin embargo, su mayor limitación es la aplicación comercial y

Introducción

es que son necesarios grandes capitales por el coste de las instalaciones y el procesado.

Por lo general, todos los parámetros de calidad relacionados con las frutas y hortalizas se ven afectados por la deshidratación. Sin embargo, el comportamiento de los diferentes parámetros está relacionado con el método de deshidratación y las condiciones empleadas. A continuación, se van a describir algunos de los parámetros de calidad que se ven afectados por la deshidratación.

- **Cambios de color debidos al proceso de deshidratación:**

Uno de los principales obstáculos con el que han chocado los ingenieros y tecnólogos de alimentos en la deshidratación y almacenamiento prolongado de productos vegetales es la decoloración que se produce debida al pardeamiento. El pardeamiento de los alimentos puede ser de dos tipos, pardeamiento enzimático y no enzimático. En el primero, la enzima polifenol oxidasa (PPO) cataliza la oxidación de los mono- y orto- difenoles para formar quinonas que se ciclan, experimentando oxidaciones futuras, y se condensan para formar pigmentos pardeados (melaninas).

En la deshidratación de frutas y hortalizas, el escaldado destruye los enzimas causantes previniendo posibles pardeamientos. El pardeamiento no enzimático o también conocido como reacciones de Maillard describe una serie de reacciones entre los grupos amino y los grupos carbonilo activo, provocando eventualmente la formación de pigmentos poliméricos insolubles y marrones, colectivamente conocidos como pigmentos de melanoidinas. Estas reacciones son, por lo general, no deseables ya que aparte de provocar colores indeseados, además produce cambios en el flavor y pérdidas nutricionales.

Se han descrito numerosos tratamientos para paliar estas mermas de color, como pueden ser la adición de sulfitos en un tratamiento previo de deshidratación, así como tratamientos con cisteína, cloruro cálcico. Sin embargo, existen algunas limitaciones legales en el empleo de dichas sustancias, aunque no son objeto de dicho trabajo.

- **Cambios en la capacidad antioxidante:**

Existen evidencias de que el contenido en compuestos fenólicos es el gran responsable de la capacidad antioxidante de los vegetales (Bozin et al., 2008; Nuutila et al., 2003; Miller et al., 2000); sin embargo, son escasas las publicaciones existentes acerca de la influencia de la deshidratación sobre los compuestos fenólicos y consecuentemente sobre la capacidad antioxidante del vegetal tras su procesado. El pardeamiento no enzimático que tiene lugar en las reacciones de Maillard ha sido asociado generalmente con una gran capacidad antioxidante debido a la formación de las melanoidinas (Yen y Hsieh, 1995; Yen y Tsai, 1993).

Introducción

Dicha capacidad antioxidante es debida a las importantes propiedades antioxidantes de los productos resultantes en las reacciones de Maillard (Manzocco et al., 2000). Aunque el pardeamiento no enzimático no sea un fenómeno considerado como positivo de forma general durante el procesado de frutas y verduras como puede ser la deshidratación y el almacenamiento, es probable que los cambios de color que se producen durante las deseables o indeseables reacciones de Maillard puedan contribuir a la actividad antioxidante del producto final (Manzocco et al., 2000).

En estudios previos sobre diferentes técnicas y condiciones de deshidratación llevados a cabo con fresas (Wojdyło et al., 2009) y granadas (Calín-Sánchez et al., 2012a), se estimó la capacidad antioxidante y los polifenoles totales obteniendo los resultados más elevados para el caso de la fruta sin tratar. Los frutos tratados mostraron importantes valores de capacidad antioxidante y polifenoles totales a pesar del tratamiento térmico, este hecho se atribuyó a dos motivos: (i) los polifenoles en un estado intermedio de oxidación tienen una gran capacidad antioxidante (Manzocco et al., 2000; Cheigh et al., 1995) y (ii) los tratamientos con temperaturas elevadas pueden inducir a la formación de compuestos con gran capacidad antioxidante, como ocurre con los productos que se forman en las reacciones de Maillard (Yilmaz y Toledo, 2005; Morales y Jiménez-Pérez, 2001).

Objetivos



OBJETIVOS

2







Objetivos

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue determinar la influencia de la deshidratación, una de las tecnologías de conservación prolongada de frutos, sobre el contenido de antocianinas y de fenoles totales en diferentes frutos rojos y, por tanto, poder conocer en qué manera afectaría a sus propiedades antioxidantes y beneficiosas para la salud.

Para la consecución de este objetivo se empleó un método de deshidratación parcial con aire caliente en estufa sobre 9 tipos de frutos diferentes: arándano, frambuesa, fresa, granada Mollar, granada Wonderful, grosella, grosella negra, mora, uva Sweet Enchantment.

Para la comprobación de la influencia de dicho método se evaluaron diferentes parámetros relacionados con la cinética de deshidratación y con su contenido en compuestos bioactivos con propiedades funcionales, tanto en frutos frescos como deshidratados:

-  Curvas de deshidratación de los diferentes frutos estudiados.
-  Contenido en antocianos totales en frutos frescos y deshidratados.
-  Contenido en polifenoles totales en frutos frescos y deshidratados.
-  Identificación y cuantificación de antocianos individuales.



MATERIALES Y MÉTODOS

3



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal.

En el presente trabajo para poder estudiar la influencia del proceso de deshidratación en el contenido de compuestos bioactivos, se utilizan diferentes frutos rojos: arándano, frambuesa, fresa, granada Mollar, granada Wonderful, grosella roja, grosella negra, mora y uva Sweet Enchantment (Figura N° 5). Dichos frutos fueron adquiridos en diferentes supermercados, y el formato de venta era en cajas de plástico conservadas bajo refrigeración (2 °C). Algunas muestras de dichos frutos se sometían a un proceso de deshidratación parcial, es decir, a un proceso de secado en estufa hasta conservar, aproximadamente, un 25 % del peso con respecto al peso inicial del fruto. Por lo que, se evaluaron muestras de material vegetal tanto frescas como deshidratadas.



Figura N° 5. Material vegetal, en fresco, empleado en el trabajo experimental. 1) Arándano, 2) Frambuesa, 3) Fresa, 4) Granada Mollar, 5) Granada Wonderful, 6) Grosella, 7) Grosella Negra, 8) Mora y 9) Uva Sweet Enchantment. Fuente: Elaboración propia.

Materiales y Métodos

Los frutos utilizados para las distintas determinaciones de antocianos totales por espectrofotometría, así como para la medida del contenido fenólico por Folin, eran frutos provenientes de la misma caja de plástico en un único momento de compra. Por lo que se asume, que son frutos recolectados en la misma finca y en el mismo momento de recolección, no distinguiendo entre variedades puesto que las bandejas no lo especificaban (a diferencia de la uva y las granadas). En cambio, los frutos destinados a la identificación y cuantificación individual por espectrometría de masas (MS) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) eran frutos comprados en un momento diferente a los utilizados en el análisis anterior.

El estudio se realiza sobre este tipo de frutos porque es bien conocido el potencial efecto beneficioso que ejercen sobre la salud humana debido al elevado contenido en compuestos funcionales que presentan y que se estudian en el presente trabajo experimental.

3.2. Proceso de deshidratación con estufa de aire caliente.

Para el proceso de deshidratación se utilizó una estufa con circulación de aire caliente (Figura N° 6). Se emplearon un número determinado de frutos a deshidratar, con un peso específico. Tanto el peso como el número de los distintos frutos se tuvieron en cuenta a la hora de realizar los cálculos en la cinética de deshidratación. La colocación de los distintos frutos en la estufa se realizaba en una sola capa o bandeja por tipo de fruto con el fin de que la distribución del aire por tipo de fruto fuese homogénea. Se realizaron mínimo 4 repeticiones por fruto y la temperatura empleada era de 60 °C con una velocidad de aire de 1,4 m/s. Las muestras fueron deshidratadas parcialmente, es decir, hasta alcanzar un 25 % del peso del fruto con respecto al peso inicial del mismo. Para ello, se fueron pesando las muestras a distintos tiempos teniendo en cuenta la tara del papel de aluminio sobre el que se encontraban en el interior de la estufa.



Figura N° 6. Estufa de secado con aire caliente utilizada en la deshidratación de los frutos rojos. Fuente: Elaboración propia.

Materiales y Métodos

Una vez deshidratadas, dichas muestras fueron rotuladas (M1, M2, M3, M4, etc.). Las muestras deshidratadas pasaban a la fase de extracción de los compuestos a estudiar. Con el fin de obtener unas curvas de deshidratación completas, hubieron muestras que se deshidrataron totalmente hasta una humedad cercana al 0 %. El objetivo, era ver la estabilización final de la curva de deshidratación de ese fruto con el fin de completar la gráfica en la que se representa la cinética de deshidratación con respecto al % de peso de los distintos frutos estudiados.

3.3. Determinación de antocianos totales por espectrofotometría.

Para cuantificar los antocianos totales por espectrofotometría, el análisis se dividió en dos fases. Una primera fase de extracción de los compuestos y otra segunda fase de determinación de los mismos. La fase de extracción de las muestras a analizar fue la misma tanto para antocianos totales como para polifenoles, y se realizaba sobre mortero a mano pues así se consiguen extraer mejor los antocianos y compuestos fenólicos presentes en la piel de los frutos. El proceso de extracción se detalla a continuación:

1. Se tomó una cantidad de fruto a la cual se le adicionó un volumen de extractante en una proporción de 7 veces el volumen del fruto. El extractante era Metanol/Agua en una proporción 80:20 + Fluoruro de sodio (FNa) diluido en un 1 % de ácido clorhídrico (HCl).

El FNa actúa como agente antipardeante tras la rotura de las células del vegetal y la consecuente liberación de las enzimas de la vacuola durante el paso siguiente y el ácido permite la estabilización de los antocianos en el medio.

2. El medio extractante se adicionaba poco a poco al mortero conforme se iba machacando el fruto junto a un poco de arena de playa estéril para conseguir un mejor rascado de la piel. Esto consigue extraer los compuestos, principalmente responsables de la coloración de dicha, para su posterior análisis o determinación. Una vez obtenido el extracto, se pasaba a un tubo de centrifuga con rosca.
3. Se calibraron los tubos de centrifuga con el medio extractante haciendo uso de una pipeta de pasteur, y se llevaron a centrifugar bajo unas condiciones fijadas de 20 minutos, 10.000 rpm y 4 °C, con el fin de asegurar una correcta separación de las fases (sólida/arena y líquida/extracto).
4. Una vez obtenido el extracto centrifugado, se medía en una probeta de vidrio el volumen de extracto obtenido para utilizarlo posteriormente en los cálculos del contenido total de antocianos. Posteriormente, se pasaba dicho volumen medido a un tubo de vidrio rotulado con un número de muestra determinado y tapado con rosca (Figura N° 7).

Materiales y Métodos

5. En aquellas muestras que tras ser centrifugadas presentaban en el tubo de centrífuga la arena de playa con un color oscuro, indicativo de que no se habían extraído todas las antocianinas, se volvía a hacer una segunda extracción con el fin de conseguir la máxima precisión en la cuantificación posterior (sin pérdidas funcionales en el proceso de extracción o con las mínimas posibles). Esta segunda extracción se consideraba como una muestra independiente y para ella se calculaba el contenido de antocianos totales presentados y dicho resultado se le sumaba a la muestra del fruto correspondiente.

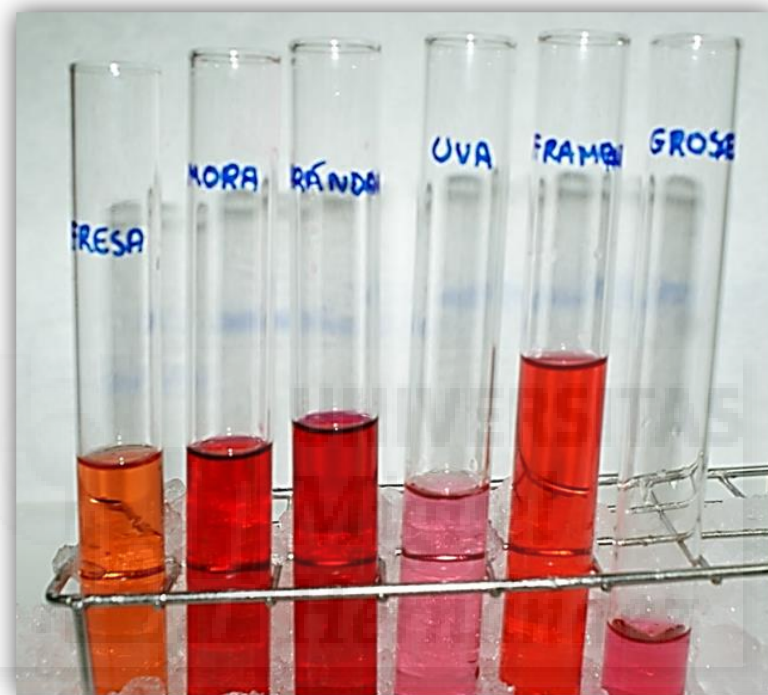


Figura Nº 7. Extractos obtenidos de algunas de las diferentes muestras estudiadas. Fuente: Elaboración propia.

Una vez acabado el proceso de extracción de las muestras y obtenidos los extractos, se determinaron los antocianos totales. La cuantificación de dichos compuestos se realizó por espectrofotometría, pero puesto que diferentes fuentes bibliográficas citan distintas longitudes de onda para la medición de dichos compuestos sin existir un consorcio en dicho tema y puesto que cada fruto presenta una antocianina predominante que lo caracteriza, en primer lugar, se realizó con el espectrofotómetro, modelo Uvikon XS Bio-Tek Instruments, un espectro de absorción máxima para determinar la longitud de onda (λ , en nm) de cada muestra. Dicho espectro es como la huella dactilar del compuesto estudiado y, con ello, nos aseguramos de medir en el rango de longitud de onda correcto. De forma que los espectros de absorción para los extractos de los frutos son los mostrados en la figura Nº 8.

Materiales y Métodos

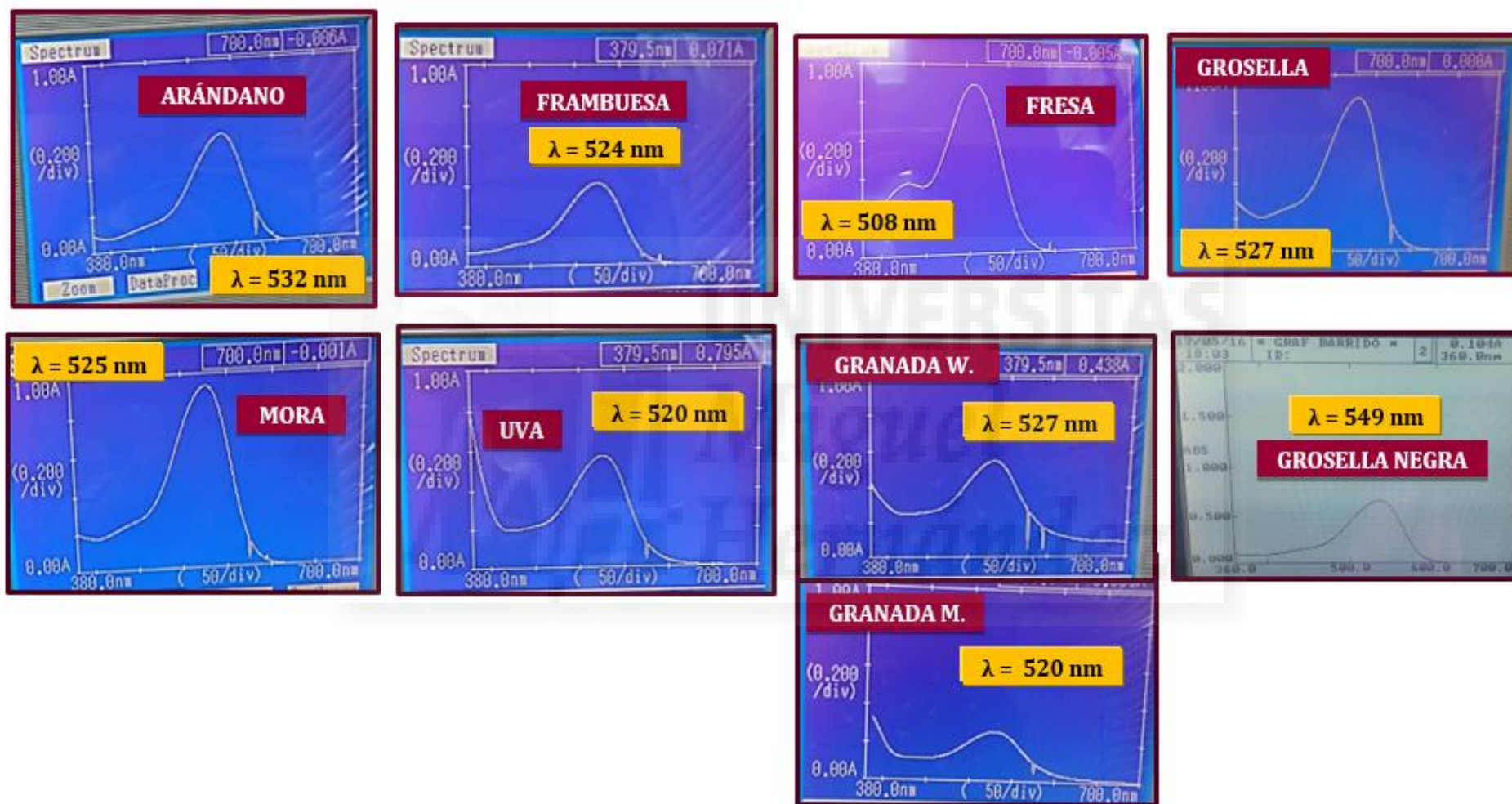


Figura Nº 8. Espectros de absorción máxima de las diferentes muestras de frutos rojos estudiados. Fuente: Elaboración propia.

Materiales y Métodos

Una vez conocido el espectro de absorción máxima de la antocianina de cada fruto, se realiza la medida a la longitud de onda determinada en el espectro. Para ello, se diluía cada muestra con el extractante, utilizado para hacer el blanco en el espectrofotómetro, con el fin de obtener una absorbancia comprendida entre 0 y 1, cumpliendo la Ley de Lambert-Beer.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de antocianinas en los distintos frutos se han obtenido a partir de la siguiente fórmula, teniendo en cuenta la absorbancia medida, el volumen de extracto en función de la muestra, el factor de dilución, el peso y el coeficiente de extinción molar (que en todos los casos es de 23.900), expresándolos como miligramos por cada 100 g de peso fresco y siendo la media ± SE.

$$\text{Concentración Antocianinas} = \frac{ABS \times (Vol.Extracto \times Factor \text{ Dilución}) \times 449 \times 1000}{Peso \text{ fruto} \times Coeficiente \text{ Extinción Molar}}$$

(mg · 100 g⁻¹)

3.4. Determinación de fenoles totales por el reactivo Folin-Ciocalteu.

La determinación de los compuestos fenólicos se realizó por el método analítico del reactivo Folin-Ciocalteu (Figura N° 9). En la extracción, de acuerdo con el protocolo de Tomás-Barberán et al. (2001), se usó metanol/agua (8:2) que contenía FNa 2 mM (para inactivar la actividad polifenoloxidasas y evitar la degradación fenólica), como se ha explicado anteriormente, y se cuantificó por duplicado utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, expresando los resultados (media ± ES) como miligramos de ácido gálico equivalente por 100 g de peso fresco.



Figura N° 9. Medida de los fenoles totales de algunas de las muestras de frutos estudiadas. Fuente: Elaboración propia.

Materiales y Métodos

El método consistía en añadir a cada tubo por duplicado 2,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1/10 (100 mL de Folin-fenol + 900 mL de H₂O ultrapura). A continuación, se añadían 200 µL de extracto. Se añadió Tampón Fosfato 50 Mm, pH 7,5 hasta completar un volumen de 500 µL y se agitaba. Al cabo de 5 minutos de reposo, la reacción se paraba con la adición de 2 mL de Na₂CO₃ y se volvía a agitar. Seguidamente, se introducían los tubos de ensayo durante 5 minutos en un baño de agua a 50 °C. Finalmente, se vertía cada una de las muestras en cubetas y se hacían las lecturas en el espectrofotómetro modelo Uvikon XS, Bio-Tek Instruments donde la absorbancia producida por la coloración azul se media a 760 nm.

En el caso de los compuestos fenólicos, se representa a continuación una recta de calibrado para los mismos o recta patrón (Figura N° 10), a partir de la cual se determina una ecuación de la recta ($y = bx + a$) con un coeficiente de correlación próximo a 1 y con una pendiente (b) y ordenada en el origen (a) que se utilizan para la ecuación con la que se cuantifican dichos compuestos.

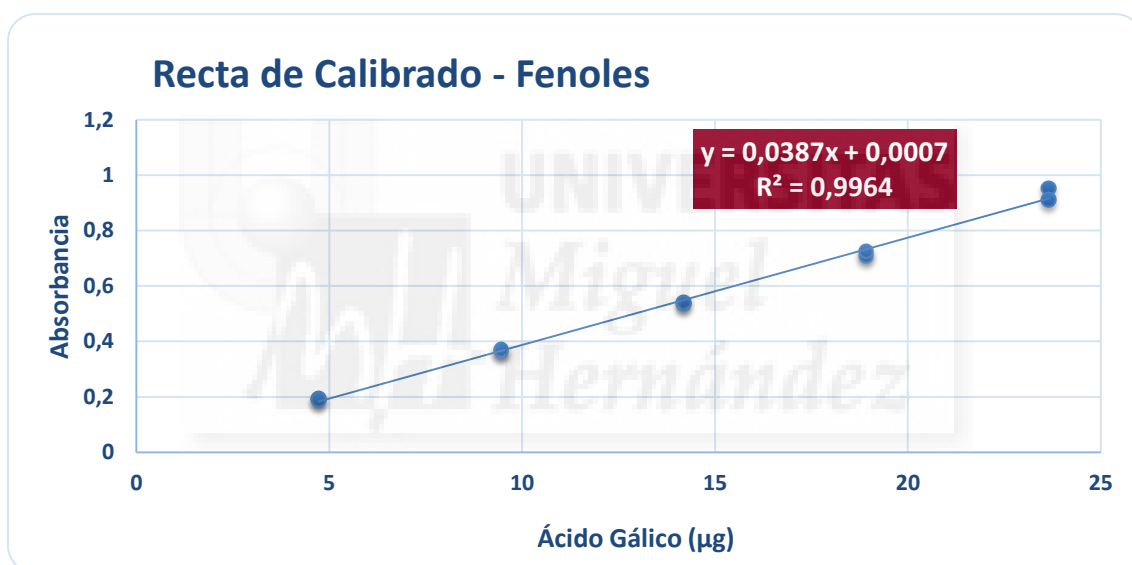


Figura N° 10. Recta de calibrado para el método de polifenoles totales. Fuente: Elaboración propia.

Para la cuantificación de dichos compuestos, tenemos en cuenta el valor de a y b de la recta de regresión, la absorbancia, el volumen de extracto, el volumen de muestra, el factor de dilución y el peso del fruto.

$$\text{Concentración Fenoles} = \frac{(ABS - 0,0007) \times Vol.Extracto \times 100 \times \text{Factor Dilución}}{0,0387 \times Vol.Muestra \times 1000 \times \text{Peso fruto}} \quad (\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1})$$

En los frutos deshidratados el contenido en antocianinas y fenoles se expresa en mg · 100 g⁻¹ de peso fresco, es decir, del peso que tenían antes del proceso de deshidratación, con el fin de poder conocer si se pierden estos compuestos bioactivos con la deshidratación y esos % de pérdidas.

Materiales y Métodos

3.5. Identificación de antocianos por HPLC-DAD-ESi/MSn y cuantificación por RP-HPLC-DAD.

Para el presente análisis, a diferencia del análisis referido a la totalidad de los compuestos en el que se realizaban 4 repeticiones por fruto fresco y deshidratado, únicamente se realizó la identificación y cuantificación de antocianinas individuales a una muestra de cada tipo de fruto diferente en fresco. Para la identificación, se utilizaron agua/ácido fórmico (99:1, v/v) y acetonitrilo como fases móviles A y B, respectivamente, con una velocidad de flujo de 0,8 mL/min.

El gradiente lineal se inició con 1 % de disolvente B, llegando a 15 % de disolvente B en 15 min, 30 % a los 30 min, 40 % a los 50 min, 95 % a los 45 min, mantenido a 50 min, y volviendo al 1 % hasta 60 min. El volumen de inyección fue de 8 µl de cada vial de fruto preparado (Figura N° 11). Los cromatogramas se registraron a 520 nm.

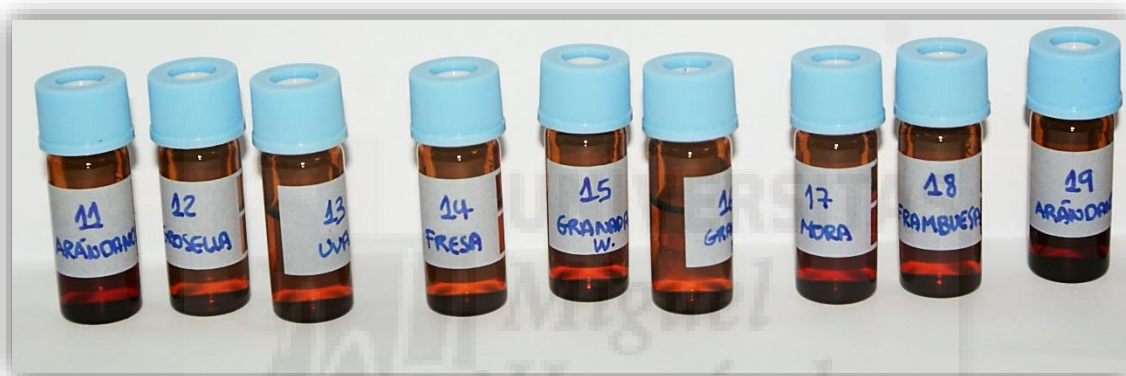


Figura N° 11. Viales preparados de las distintas muestras de frutos a identificar por HPLC-DAD-ESi/MSn y a cuantificar por RP-HPLC-DAD. Fuente: Elaboración propia.

Los análisis cromatográficos para la identificación se llevaron a cabo en una columna Luna C18 (tamaño de partícula 250 x 40 mm, 5 micras; Tenokroma, Barcelona, España) en un HPLC Infinity Agilent (Figura N° 12) serie 1200 equipado con un detector de red de fotodiodos (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) y un detector de masas en serie (Bruker Daltonics Ultra Trampa HCT-ESI Ion, Bremen, Alemania) con las mismas condiciones utilizadas anteriormente de acuerdo con Gironés-Vilaplana et al. (2013).

El equipo consistía en una bomba binaria (modelo G1376A), un muestreador automático con inyector automático y refrigerado (modelo G1377), un desgasificador (modelo G1379B) en línea, y un detector de matriz de fotodiodos (modelo G1315D). El sistema de HPLC fue controlado por el software ChemStation LC 3D Systems (Agilent, Rev. B.01.03 SRD, nov. 2006).

El detector de masas era el espectrómetro de trampa de iones Ultra Bruker HCT, equipado con una interfaz de ionización por electrospray, y controlado por software de control Esquire (vers. 6.1. N° 92.0, Bruker Daltoniks, GmbH, Alemania).

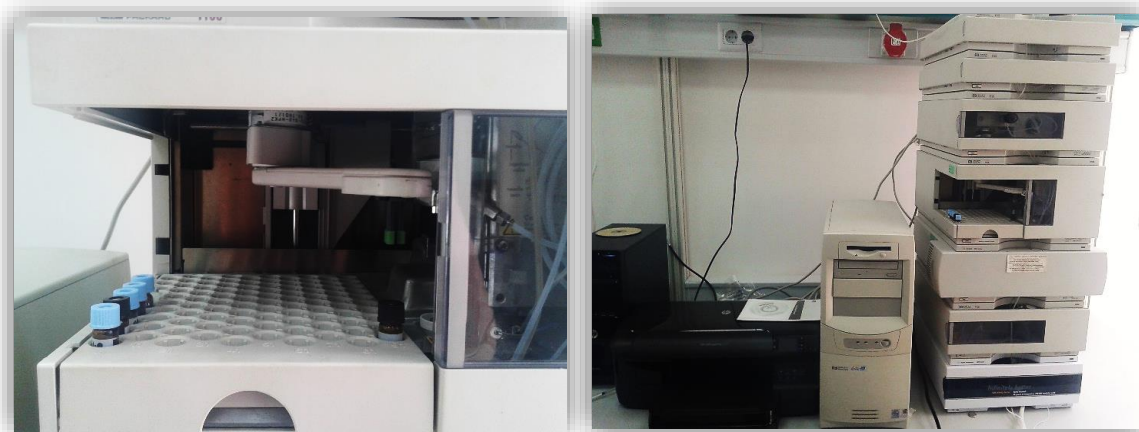


Figura Nº 12. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizado para la cuantificación de las antocianinas de los frutos. Fuente: Elaboración propia.

Las condiciones de ionización eran 350 °C y 4 kV, para la temperatura del capilar y la tensión, respectivamente. La presión del nebulizador y el caudal de nitrógeno fueron 65,0 psi y 11 L/min, respectivamente. La masa de barrido completo cubre la gama de m/z de 100 a 1200. Experimentos de fragmentación inducida por colisión se realizaron en la trampa de iones usando helio como gas de colisión, con ciclos de rampa de voltaje 0,3-2 V. Los datos de espectrometría de masas eran adquiridos en el modo de ionización positivo. El MSn se llevó a cabo en el modo automático con el ion del fragmento más abundante en la MS ($n-1$).

Los picos se identificaron utilizando patrones auténticos mediante la comparación de los tiempos de retención y el análisis espectral del pico. Los patrones de antocianinas (cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido y pelargonidina-3-rutinósido) fueron proporcionados por la Dra. García-Viguera, mientras que los ácidos hidroxicinámicos fueron adquiridos de Sigma (Sigma, Madrid, España).

Para la cuantificación, el sistema de HPLC-DAD se utilizó con las mismas condiciones que la identificación. Diferentes compuestos fenólicos se caracterizaron por comparación cromatográfica con patrones analíticos, así como cuantificados por la absorbancia de sus picos correspondientes. Los antocianos fueron, por tanto, cuantificados como cianidina 3-glucósido a 520 nm.

3.6. Análisis estadístico.

Se realizó un análisis estadístico, aplicando el test de Student para determinar si las diferencias en el contenido en antocianinas y fenoles entre las muestras de los frutos frescos y deshidratados eran significativas ($p < 0,05$).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CURVAS DE DESHIDRATACIÓN DE LOS DIFERENTES FRUTOS.

El secado es probablemente uno de los métodos más antiguos utilizados para conservar los alimentos por los humanos. Las frutas y verduras se secan para inhibir la actividad microbiana, enzimática y las pérdidas de la calidad. Como resultado de la actividad de agua reducida del material secado, los cambios físicos y químicos se minimizan durante el almacenamiento y se incrementa la vida útil. También, los costes relativos al transporte y almacenamiento se reducen por disminución del peso y volumen del producto seco (Dadali, Demirhan, et al., 2007; Dadali, Apar, et al., 2007; Doymaz y Ismail, 2011). El secado es uno de los procesos más importantes de separación y se utiliza a menudo como una etapa de producción final antes de la venta o del envasado de productos.

La transferencia de calor y masa se producen simultáneamente durante el proceso de secado. El conocimiento del mecanismo de transferencia de calor y masa, tal como la difusividad de la humedad, la energía de activación y el consumo de energía, está relacionado con los parámetros de secado, como la temperatura, la velocidad y la humedad relativa del aire de secado que requieren de diseños ideales del secador y de calidad por parte del producto seco (Chayjan y Kaveh, 2014; Unal y Sacilik, 2011).

En los frutos objeto de estudio, tras la deshidratación completa en estufa de aire caliente a 60 °C, se han representado las curvas de deshidratación de todos ellos (Figura N° 13). En ella, se representa el % de peso del fruto con respecto al peso inicial del mismo a lo largo del tiempo de secado (en horas).

Se señala con una línea roja el 25 % de peso con respecto al inicial, siendo este el punto en el que los frutos rojos conseguían una deshidratación parcial y se paraba el proceso de secado para congelar las muestras destinadas al análisis de componentes bioactivos. En cambio, se realizó la deshidratación total de algunas muestras, no analizadas, para poder estudiar la cinética de deshidratación completa en dichos frutos y así conseguir unas curvas de deshidratación completas.

Tras la representación (Figura N° 13), se ha podido observar que las curvas de secado de las muestras con una mayor relación superficie/volumen (arilos de granadas y fresas cortadas en trozos; ¼ de fresa aproximadamente) presentaban una deshidratación muy rápida debido, en parte, a que las pérdidas de agua de los frutos y vegetales están ligadas a unos factores que las afectan y, entre ellos, se encuentra la relación superficie/volumen del producto (Luchsinger, 2010).

Resultados y Discusión

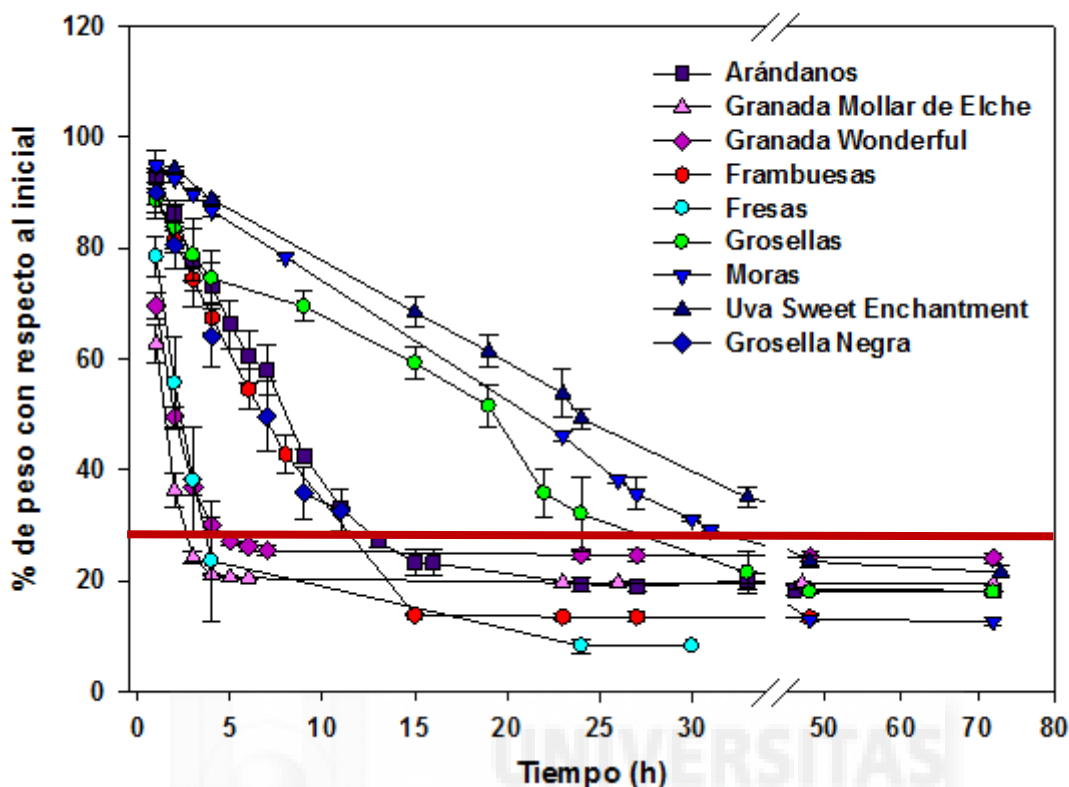


Figura N° 13. Curvas de deshidratación para los diferentes frutos estudiados; arándanos, frambuesas, fresas, granadas, grosellas, moras y uvas. Los datos son la media \pm ES.

Los frutos que preceden en tamaño a los anteriores, son las grosellas negras, los arándanos y las frambuesas. Como bien se observa en la figura N° 1, las siguientes curvas de deshidratación con una velocidad de deshidratación media se corresponden con dichos frutos, los cuales presentan una relación superficie/volumen menor a los arillos de granadas y trozos de fresas. En cambio, los frutos de mayor tamaño sometidos a deshidratación, han sido las uvas, las moras y las grosellas. Dichos frutos, presentan de forma clara un descenso de peso en su proceso de deshidratación durante el tiempo de secado mucho menor a los frutos anteriores debido a que se caracterizan por una mayor relación superficie/volumen.

Cuando los frutos se llevaron a deshidratación completa, el tiempo final del proceso de secado fue variable en función del fruto o curva estudiada. El mayor tiempo de deshidratación completa relativo a unas 70 horas en la estufa fue para las uvas y moras y el menor para los arillos de granada (Figura N° 13).

Este incremento en el tiempo de secado se puede explicar que es debido a una disminución en la relación superficie/volumen. Previamente, se han reportado resultados similares para las rodajas de cereza y melocotón dulce (Doymaz y

Resultados y Discusión

Ismail, 2011; Zhu y Shen, 2014). La velocidad de secado disminuye continuamente con el tiempo de secado. Existe literatura que presenta resultados acerca de este parámetro para diversos productos (Singh y Pandey, 2012; Zhu y Shen, 2014).

4.2. CONTENIDO EN ANTOCIANOS TOTALES EN FRUTOS FRESCOS Y DESHIDRATADOS.

Los frutos rojos poseen un elevado contenido en antocianinas totales. En el presente trabajo, se ha estudiado el contenido de dichos compuestos bioactivos en diferentes frutos rojos tanto en fresco como tras un proceso de deshidratación (Figura N° 14). Recordando que en los frutos deshidratados el contenido en antocianinas y fenoles se expresa en mg 100 g⁻¹ de peso fresco, es decir, del peso que tenían antes del proceso de deshidratación, con el fin de poder conocer si se pierden estos compuestos bioactivos con la deshidratación y esos % de pérdidas.

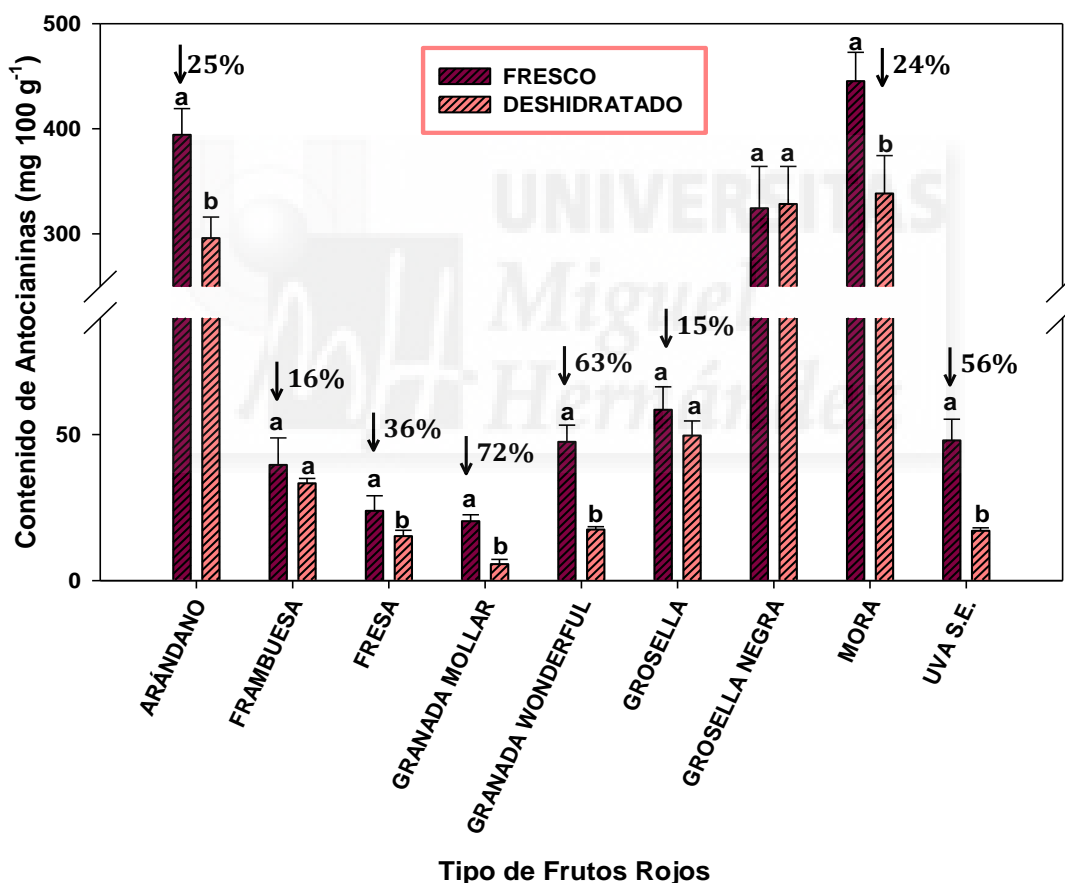


Figura N° 14. Contenido en antocianos totales para los diferentes frutos estudiados: arándanos, frambuesas, fresas, granadas, grosellas, moras y uvas, en fresco y deshidratados. También se refleja el % de pérdidas de antocianinas en los frutos deshidratadas con respecto a su contenido en fresco. Los datos son la media ± ES y las letras indican diferencias significativas (P < 0,05) entre frutos frescos y deshidratados.

Resultados y Discusión

Se observa como algunos frutos como la mora, el arándano y la grosella negra poseen un contenido muy elevado en antocianinas totales, tanto en fresco como deshidratados, con unas concentraciones en un rango de 300 a 400 mg 100 g⁻¹ similares a los encontrados por otros investigadores (Fan-Chiang & Wrolstad, 2005; Neveu et al., 2010; Connor et al., 2002; Wang et al., 2008).

Otros frutos con un contenido alto en dichos compuestos bioactivos son la uva S.E., la granada Wonderful y la grosella roja (concentraciones en torno a 50 mg 100 g⁻¹ de peso fresco). Estos contenidos también han sido reflejados en otras publicaciones (Cantos et al., 2002; Martí et al., 2001; Mirdehghan et al., 2007c). Por último, encontramos la frambuesa, fresa y granada Mollar de Elche con concentraciones de antocianinas totales inferiores a 50 mg 100 g⁻¹ de peso fresco, al igual que otros investigadores (Lopes-da-Silva et al., 2002; Martí et al., 2001; Mirdehghan et al., 2007c).

Tras el proceso de secado, hemos podido observar que frutos como la grosella, tanto roja (\approx contenido) como negra (15 % de pérdidas), no presentan pérdidas significativas tras la deshidratación. En cambio, en el resto de frutos estudiados se observan dichas diferencias en cuanto al contenido inicial en fresco. Las mayores pérdidas alcanzadas tras el secado se han observado en la granada, Mollar (72 % de pérdidas) y Wonderful (63 % de pérdidas) y en Uva S.E. (56 % de pérdidas). Los frutos restantes, arándano, frambuesa y mora, presentaban unos % de pérdidas menores respecto a los anteriores. Estas pérdidas tras la deshidratación se encontraban en torno a un 15-20 % respecto al peso inicial.

Por lo que se puede concluir, que existe una gran variabilidad o margen de pérdidas en función del tipo de fruto, siendo algunos de ellos, como la grosella negra, el arándano, la frambuesa y la mora, muy óptimos para la conservación post-cosecha mediante el método de secado ya que mantienen su contenido en antocianinas y, por tanto, las propiedades funcionales que ejercen en el organismo humano.

4.3. CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES EN FRUTOS FRESCOS Y DESHIDRATADOS.

En cuanto al contenido en polifenoles totales, de igual forma viene expresado en los frutos deshidratados en mg 100 g⁻¹ de peso fresco, es decir, del peso que tenían antes del proceso de deshidratación, con el fin de poder conocer si se pierden estos compuestos bioactivos con la deshidratación y esos % de pérdidas al igual que en los antocianos totales. Los frutos frescos con mayor contenido en fenoles totales son la mora y los arándanos (\approx 250-300 mg 100 g⁻¹), mientras que la menor concentración se encontró en la grosella negra y en la granada Mollar de Elche (Figura N^o 15). se observa también como la grosella negra mantiene el

Resultados y Discusión

contenido de fenoles totales tras la deshidratación al igual que ocurría con los antocianos.

En dicha figura, si la comparamos con la figura N° 14, podemos ver que las pérdidas en cuanto al contenido de compuestos fenólicos son superiores a las que se observan en el contenido en antocianos en la gran mayoría de frutos. Todos, a excepción, de la grosella negra presentan diferencias significativas tras el secado. Siendo la grosella negra, al igual que en el caso anterior, el único fruto que conserva el contenido fenólico tras el proceso de deshidratación.

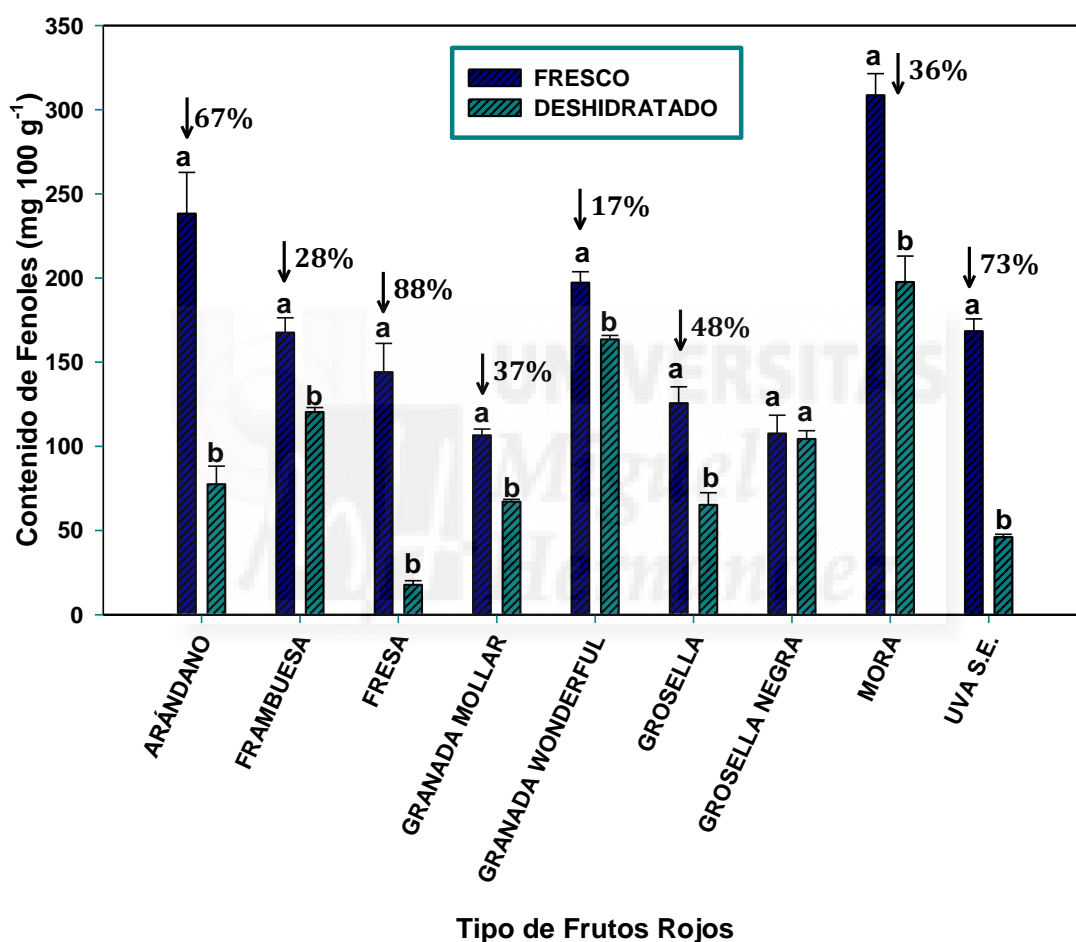


Figura N° 15. Contenido en fenoles totales para los diferentes frutos estudiados: arándanos, frambuesas, fresas, granadas, grosellas, moras y uvas, en fresco y deshidratados. También se refleja el % de pérdidas de polifenoles en los frutos deshidratados con respecto a su contenido en fresco. Los datos son la media ± ES y las letras indican diferencias significativas (P < 0,05) entre frutos frescos y deshidratados.

Los frutos que mayores pérdidas en compuestos bioactivos presentan son la fresa, la uva S.E. y el arándano con un 88, 73 y 67 % de pérdidas con respecto al fruto fresco, respectivamente.

Resultados y Discusión

Por otro lado, frutos como la frambuesa, la granada Mollar de Elche, la grosella roja y la mora presentan unas pérdidas medias de compuestos fenólicos del 28, 37, 48 y 36 %, respectivamente, con respecto al fruto fresco.

La granada Wonderful presenta un porcentaje de pérdidas bajo, en torno a un 17 % (Figura N° 15). Por lo que se podría concluir, que el proceso de deshidratación afecta significativamente al contenido fenólico de los frutos en la gran mayoría de ellos y que dicha influencia es variable en función del tipo de fruto estudiado. Así, por ejemplo, se puede observar que la granada (independientemente de la variedad) es un fruto que presenta unas pérdidas elevadas en el contenido de antocianos y mínimas en cuanto al contenido fenólico total.

4.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANOS INDIVIDUALES.

En general, las antocianinas aumentan de concentración durante la maduración en variedades de frutas de color rosa, rojo y púrpura, tanto climatéricas como no climatéricas, a pesar de las grandes variaciones existentes en el contenido de antocianinas totales presente en la cosecha comercial entre las especies frutales y cultivos, así como en cuanto a la antocianina predominante (Díaz-Mula et al., 2008; Valero y Serrano, 2010).

En los arándanos, a 520 nm, se ha observado en el presente estudio que presentan 7 antocianinas principales identificadas por espectrometría de masas (MS). Los picos identificados por orden de elución han sido: 1) peonidina-3-glucósido, 2) cianidina-3-glucósido, 3) petunidina-3-glucósido, 4) cianidina-3-pentósido, 5) malvidina-3-glucósido, 6) malvidina-3-pentósido, 7) quercetina-3-rutinósido (Figura N° 16). La cuantificación de las antocianinas por HPLC mostró que la antocianina predominante en este fruto es la malvidina-3-glucósido. Una vez cuantificados dichos picos por HPLC, se concluye que en el arándano el contenido de antocianos totales es de 84 mg 100 g⁻¹ de peso fresco, siendo la concentración de la antocianina mayoritaria de 29 mg 100 g⁻¹ de peso fresco (Tabla N° 1). Según otros investigadores, se corrobora que en el arándano la antocianina mayoritaria es la malvidina-3-glucósido y el rango de concentración de antocianos totales que establecen para dicho fruto es de 100 a 300 mg 100 g⁻¹ de peso fresco (Connor et al., 2002; Wang et al., 2008).

Ogawa et al. (2008) realizaron la identificación y cuantificación de las antocianinas presentes en dos especies distintas de arándanos: arándano europeo (*Vaccinium myrtillus*) y arándano americano (*Vaccinium corymbosum*), que a diferencia del arándano estudiado son variedades rojas. Observan que la antocianina mayoritaria es diferente en función de la especie, ya que en el arándano europeo puede ser la cianidina-3-glucósido o la cianidina-3-galactósido con unas concentraciones de 405 y 370 mg 100 g⁻¹, respectivamente.

Resultados y Discusión

En cambio, en el arándano americano es la peonidina-3-glucósido con una concentración de 365 mg 100 g⁻¹. Respecto a la frambuesa y fresa, son frutos rojos que contienen una concentración relativamente baja de antocianinas totales, que van de 20 a 60 mg 100 g⁻¹, dependiendo del cultivar, y la principal antocianina suele ser la pelargonidina-3-glucósido (Lopes da Silva et al., 2007).

En los resultados obtenidos, hemos podido comprobar que en el caso de la frambuesa se identifican dos picos muy definidos por orden de elución en el espectrómetro de masas: 1) cianidina-3,5-diglucósido y 2) cianidina-3-glucósido (Figura N^o 17), siendo la antocianina mayoritaria la cianidina-3,5-diglucósido, la cual presenta una concentración de 65 mg 100 g⁻¹ que sumados a la segunda antocianina identificada hacen un total de 73 mg de antocianos totales 100 g⁻¹ de peso fresco (Tabla N^o 2). Por lo tanto, en el caso de la frambuesa, la antocianina mayoritaria identificada es diferente a la consultada en la bibliografía, pero el contenido final de antocianos totales cuantificado por HPLC si se encuentra próximo al rango definido.

En cambio, en el caso de la fresa tanto los resultados obtenidos en la identificación como los obtenidos en la cuantificación de dicho fruto, corroboran lo establecido en las fuentes bibliográficas consultadas. Ya que, tras la identificación, se observan dos picos muy definidos que por orden de elución se corresponden con: 1) pelargonidina-3-glucósido y 2) pelargonidina combinada con el ácido sinápico (Figura N^o 18). La antocianina mayoritaria, pelargonidina-3-glucósido, se encuentra en la fresa en una concentración de 63 mg 100 g⁻¹ y el contenido de antocianos final cuantificado en dicho fruto es de 76 mg 100 g⁻¹ (Tabla N^o 3). Neveu et al. (2010), al igual que Lopes da Silva et al. (2007), estableció como antocianina predominante en la fresa la pelargonidina-3-glucósido y definió una concentración final de antocianos de 47 mg 100 g⁻¹ por peso fresco.

La mayor variación entre cultivares se ha encontrado en cereza dulce, con variaciones entre 2 y 300 mg 100 g⁻¹, variando de cultivares claros a cultivares más oscuros (Gao y Mazza, 1995; Mozetic et al., 2002; Chaovanalikit y Wrolstad, 2004; Serrano et al., 2009). Dicha variación, aunque no tan significativa, ocurre también entre variedades de granada. Por ello, se ha querido introducir en el presente estudio la identificación y cuantificación de antocianinas en dos cultivares: granada Mollar de Elche y granada Wonderful, dada la clara diferencia que presentan en el color de los arilos, el cual es un parámetro de calidad determinante para el consumidor a la hora de realizar la compra.

La granada Mollar de Elche es un fruto no climatérico con una problemática durante su cultivo y es la no adquisición de una coloración roja intensa deseada en el momento de la recolección, debido a la ausencia de bajas temperaturas en las zonas de producción del levante español (provincia de Alicante) que serían necesarias para estimular la síntesis de antocianinas, tanto en la piel como en los

Resultados y Discusión

arilos de la granada, lo que conlleva a que las empresas exportadoras tengan bastantes problemas para comercializar la granada a pesar de la gran aceptación por parte de los consumidores.

Diferentes investigadores (Martí et al., 2001; Mirdehghan et al., 2007c) han observado que el contenido de antocianos totales en la granada, sin diferenciar cultivar, varía de 80 a 160 mg 100 g⁻¹ por peso fresco del fruto, no identificando dichos autores la antocianina mayoritaria. En el presente trabajo, se ha visto que el perfil de identificación de las antocianinas en las dos variedades de granada estudiadas es muy similar pero la cuantificación por HPLC es diferente, ya que el contenido en antocianos totales e individuales varía en función de la variedad y eso el consumidor a simple vista lo visualiza en la coloración comercial del fruto.

En la granada Mollar de Elche, los picos identificados por orden de elución han sido, al igual que en la granada Wonderful, cinco y únicamente se ha podido identificar la antocianina predominante, siendo esta la cianidina-3-glucósido presente en una concentración de 11 mg 100 g⁻¹. El resto las antocianinas se han cuantificado, pero no se han podido identificar con ningún patrón en el espectrómetro de masas (MS) (Figura N^o 19). El contenido total establecido para dicha variedad de granada es de 22 mg 100 g⁻¹ de peso fresco (Tabla N^o 4), siendo un contenido relativamente bajo en comparación con el otro cultivar y con el rango establecido por los investigadores citados anteriormente.

Respecto a la granada Wonderful, el perfil de antocianinas individuales es el mismo que el de la granada Mollar (Figura N^o 20) pero el contenido es diferente siendo la concentración de la antocianina mayoritaria, cianidina-3-glucósido, de 35 mg 100 g⁻¹, es decir, tres veces superior al de la otra variedad. Este incremento en la antocianina predominante conlleva un incremento también en el resto de compuestos no identificados, resultando en un contenido final de antocianos totales de 87 mg 100 g⁻¹ de peso fresco en dicha variedad (Tabla N^o 5).

Por otro lado, las variedades de grosellas también presentan variaciones en el contenido de antocianos totales y antocianinas individuales debido a las diferentes coloraciones; variedades rojas y negras. Neveu et al. (2010) estudiaron diferentes variedades de grosellas negras (*Ribes negra*) y observaron que había una gran heterogeneidad en cuanto a la antocianina predominante y al contenido final. Observaron que las mayoritarias podían ser las siguientes: delphinidina-3-rutinósido, cianidina-3-rutinósido, delphinidina-3-glucósido o cianidina-3-glucósido (con concentraciones de 305, 161, 87 y 25 mg de antocianos totales 100 g⁻¹ de peso fresco, respectivamente).

En el presente estudio, se comparan dichos resultados con los obtenidos para una variedad de grosella roja. En este fruto, se observan tres picos en el cromatograma de identificación, siendo el segundo de ellos la antocianina predominante en la grosella roja objeto de estudio.

Resultados y Discusión

Dicha antocianina se corresponde la cianidina-3-glucósido-5-pentósido (Figura N° 21), a diferencia de las referencias bibliográficas consultadas.

La cuantificación del contenido de antocianos total en la grosella roja es de 49 mg 100 g⁻¹ de peso fresco, siendo la concentración de la antocianina predominante de unos 30 mg 100 g⁻¹, es decir, correspondiéndose con el 60 % del contenido total de dichos compuestos bioactivos (Tabla N° 6).

Fan-Chiang & Wrolstad (2005) cuantificaron el contenido total de antocianos en moras, y observaron que existía una gran amplitud por lo que establecieron un rango de 70 a 200 mg 100 g⁻¹ de peso fresco. Por otro lado, Neveu et al. (2010) identificaron como antocianinas predominantes en las moras la cianidina-3-glucósido y la cianidina-3-rutinósido con unas concentraciones muy variables de 139 y 9 mg 100 g⁻¹, respectivamente.

En las moras estudiadas del presente trabajo experimental, se pudieron cuantificar cuatro picos por orden de elución y de estos, se identificaron únicamente tres de ellos: 1) cianidina-3-glucósido, 2) cianidina-3-rutinósido y 3) cianidina-3-cumaroil-glucósido (Figura N° 22), no identificándose la antocianina correspondiente al cuarto y último pico presente en el cromatograma. La antocianina predominante de la mora, cianidina 3-glucósido, se ha encontrado en una concentración de 407 mg 100 g⁻¹ de peso fresco (Tabla N° 7). La concentración total de antocianos en la mora es de 454 mg 100 g⁻¹ siendo, sin duda, el fruto que mayor contenido en antocianos totales y, por tanto, en compuestos bioactivos presenta de todos los estudiados en el presente trabajo.

Por último, resaltar que se han encontrado grandes variaciones también entre los cultivares de uva de mesa (6 a 200 mg 100 g⁻¹), e incluso en cuanto a la principal antocianina (cianidina 3-glucósido, peonidina 3-glucósido o malvidina 3-glucósido), la cual era diferente dependiendo del cultivar (Carreño et al., 1997; Orak, 2007). En uvas tintas (*Vitis vinifera*), Neveu et al. (2010) observaron que la antocianina predominante era sin duda la malvidina-3-glucósido en una concentración de unos 39 mg 100 g⁻¹ por peso fresco. Sin embargo, otros investigadores, sin diferenciar cultivar, establecen un rango de 6 a 200 mg 100 g⁻¹ en zumo con piel y pulpa juntos, siendo las mayoritarias las siguientes: peonidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido o malvidina-3-glucósido (Carreño et al., 1997; Fernández-López et al., 1998; Cantos et al., 2002; González-Neves et al., 2004; Orak, 2007).

La variedad de uva estudiada es la variedad Sweet Enchantment, una variedad de uva de mesa. En el cromatograma se pudieron observar y cuantificar 7 picos, de los cuales solo se identificaron los cuatro últimos por orden de elución. La antocianina mayoritaria fue la malvidina-3-glucósido, presentando una concentración de 37 mg 100 g⁻¹ por peso de uva fresca.

Resultados y Discusión

El contenido de antocianos total que presentaba esta variedad ascendía a 97 mg 100 g⁻¹, encontrándose dentro del rango de concentración establecido por distintos investigadores (Figura N° 23 y Tabla N° 8). Sin embargo, estos niveles de antocianinas podrían considerarse como ilustrativos, ya que las condiciones ambientales y las prácticas culturales tienen un gran efecto en el contenido de antocianinas para una fruta en particular. Por ejemplo, se determinó el contenido total de antocianinas de Cabernet Sauvignon dos años consecutivos, 2001 y 2002, y se encontraba en 108 y 194 mg 100 g⁻¹, respectivamente (González-Neves et al., 2004).

Por concluyente, cabe resaltar que las diferencias debidas al contenido total de antocianinas entre los frutos frescos determinados por espectrofotometría y los identificados y cuantificados por espectrometría y cromatografía líquida, son debidas a diferentes factores (Valero y Serrano, 2010): momento de recolección, variedad de fruto, finca de cultivo, estado de madurez, prácticas culturales, etc. Ya que los frutos, como bien se especificó en el apartado de metodología, destinados al análisis por espectrofotometría fueron comprados en un supermercado y en una fecha dada y los destinados a HPLC procedían de otro supermercado y en otra fecha. Por lo que, son frutos que pueden variar en cuanto al contenido de antocianos, aunque a simple vista resulten prácticamente similares, pues el contenido y el estado de madurez varían de unos a otros siendo los distintos factores influyentes los determinantes en dicha variación de compuestos bioactivos.

Resultados y Discusión

ARÁNDANO:

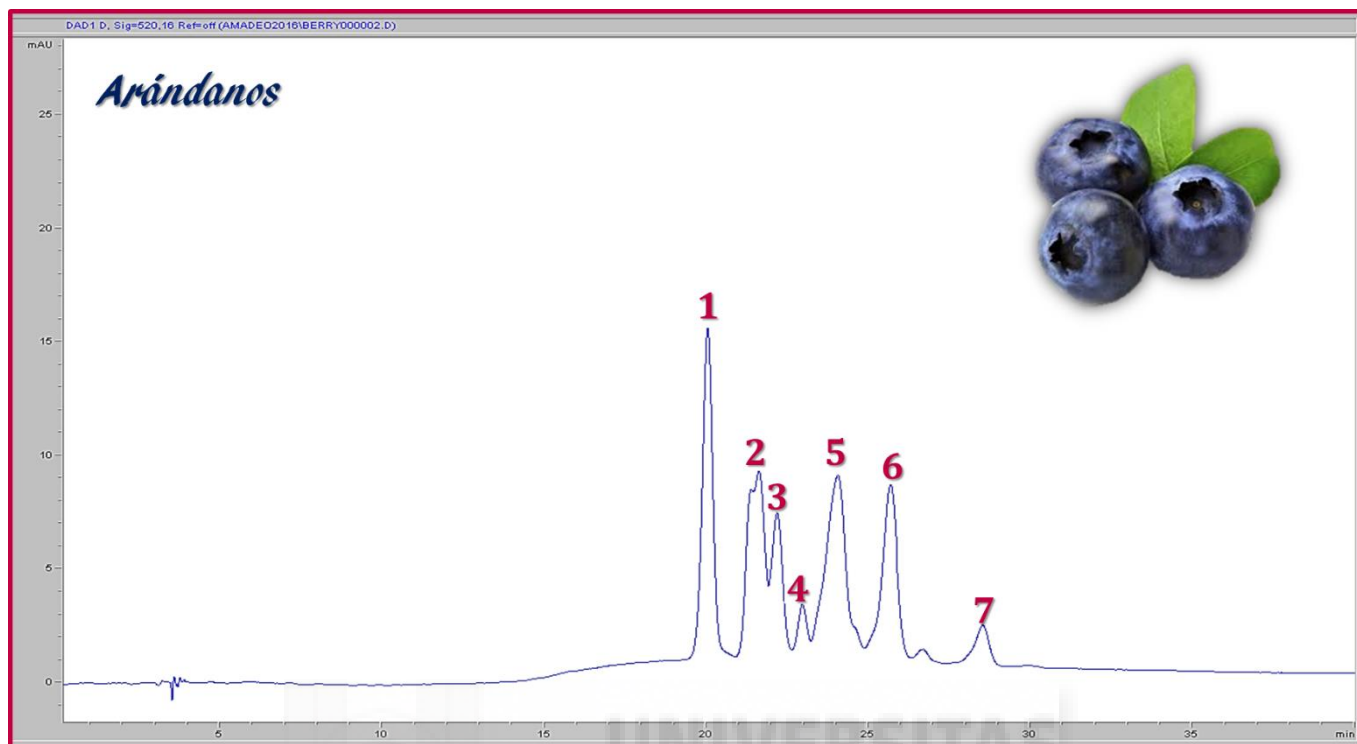


Figura Nº 16. Cromatograma de identificación de las antocianinas predominantes en el arándano fresco mediante espectrometría de masas (MS). Picos identificados por orden de elución: 1) Peonidina-3-glucósido, 2) Cianidina-3-glucósido, 3) Petunidina-3-glucósido, 4) Cianidina-3-pentósido, 5) Malvidina-3-glucósido, 6) Malvidina-3-pentósido, 7) Quercetina-3-rutinósido.

Tabla Nº 1. Cuantificación de las antocianinas predominantes en arándano fresco por HPLC.

Fuente	Antocianina	Concentración (mg 100 g ⁻¹ PF)
Arándanos azules (blueberries) (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	Peonidina-3-glucósido	5
	Cianidina-3-glucósido	10
	Petunidina-3-glucósido	11
	Cianidina-3-pentósido	3
	Malvidina-3-glucósido	29
	Malvidina-3-pentósido	26
	Quercetina-3-rutinósido	0,1
	TOTAL	84

Resultados y Discusión

FRAMBUESA:

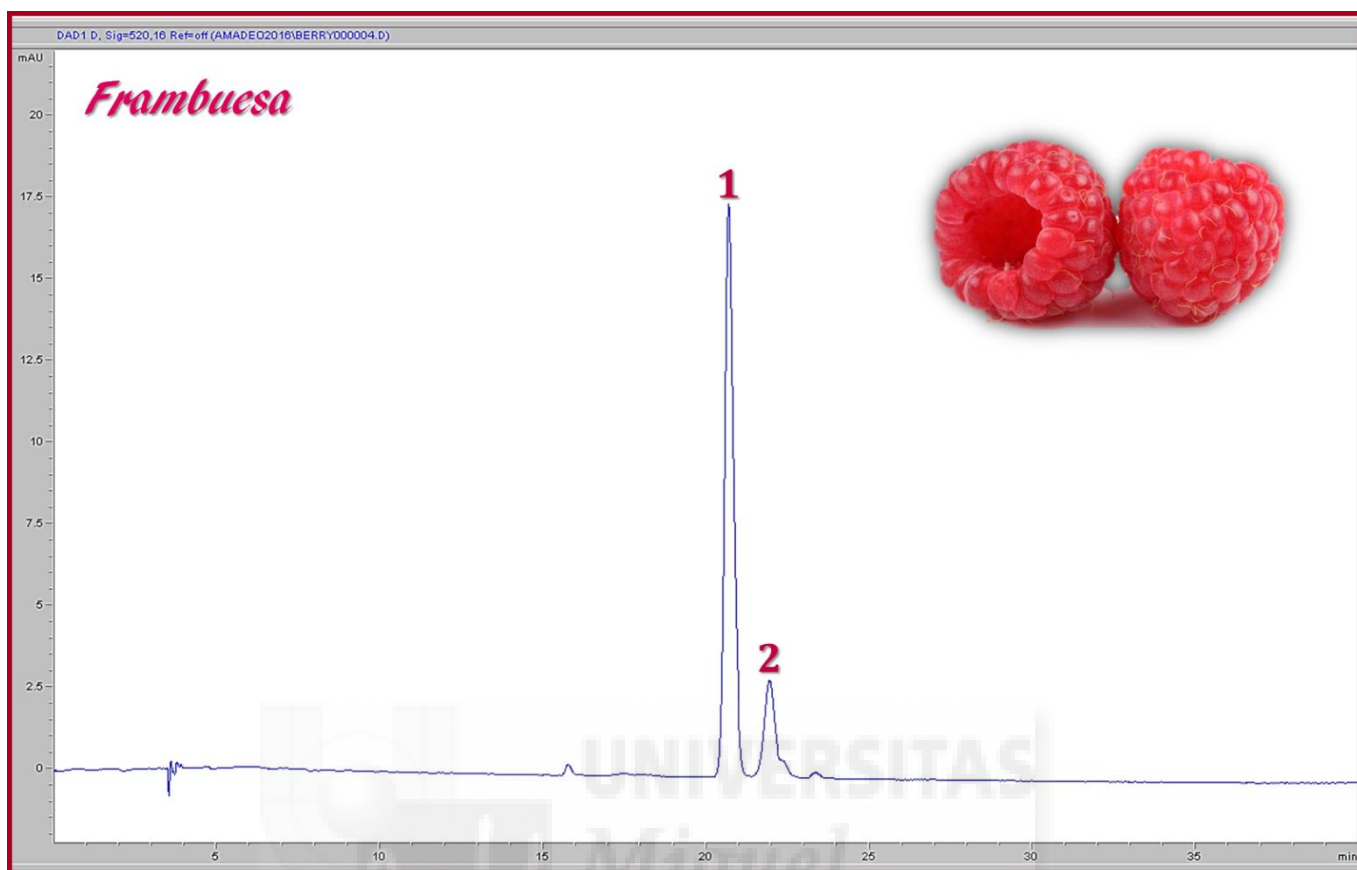


Figura Nº 17. Cromatograma de identificación de las antocianinas predominantes en la frambuesa fresca mediante espectrometría de masas (MS). Picos identificados por orden de elución: 1) Cianidina-3,5-diglucósido, 2) Cianidina-3-glucósido.

Tabla Nº 2. Cuantificación de las antocianinas predominantes en frambuesa fresca por HPLC.

Fuente	Antocianina	Concentración (mg 100 g ⁻¹ PF)
Frambuesas rojas (raspberries) (<i>Rubus idaeus</i>)	Cianidina-3,5-diglucósido	65
	Cianidina-3-glucósido	8
	TOTAL	73

Resultados y Discusión

FRESA:

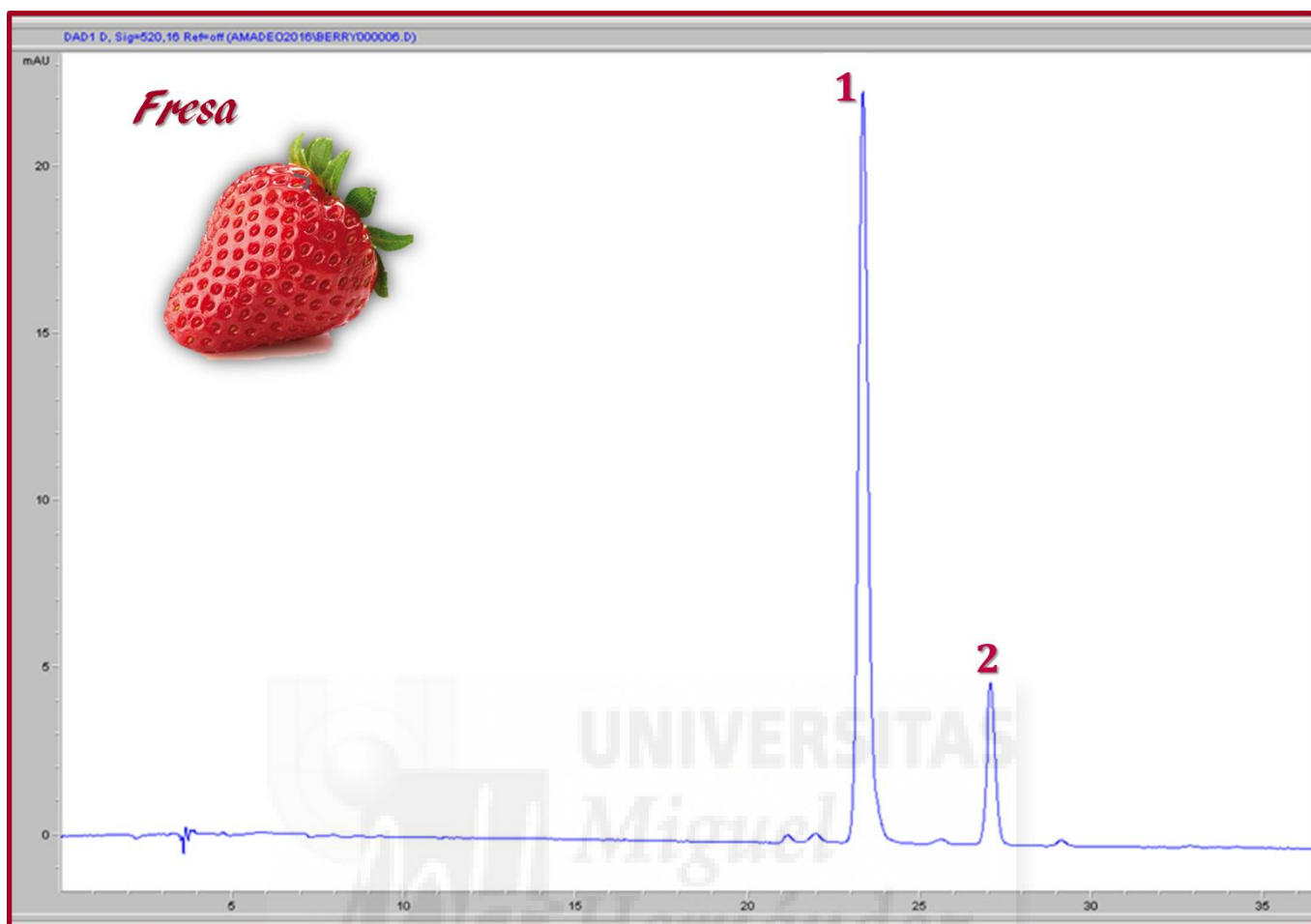


Figura N° 18. Cromatograma de identificación de las antocianinas predominantes en la fresa fresca mediante espectrometría de masas (MS). Picos identificados por orden de elución: 1) Pelargonidina-3-glucósido, 2) Pelargonidina + Ácido sinápico.

Tabla N° 3. Cuantificación de las antocianinas predominantes en fresa fresca por HPLC.

Fuente	Antocianina	Concentración (mg 100 g ⁻¹ PF)
Fresa (strawberries) (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Pelargonidina-3-glucósido	63
	Pelargonidina + Ácido sinápico	13
TOTAL		76

Resultados y Discusión

GRANADA MOLLAR DE ELCHE:

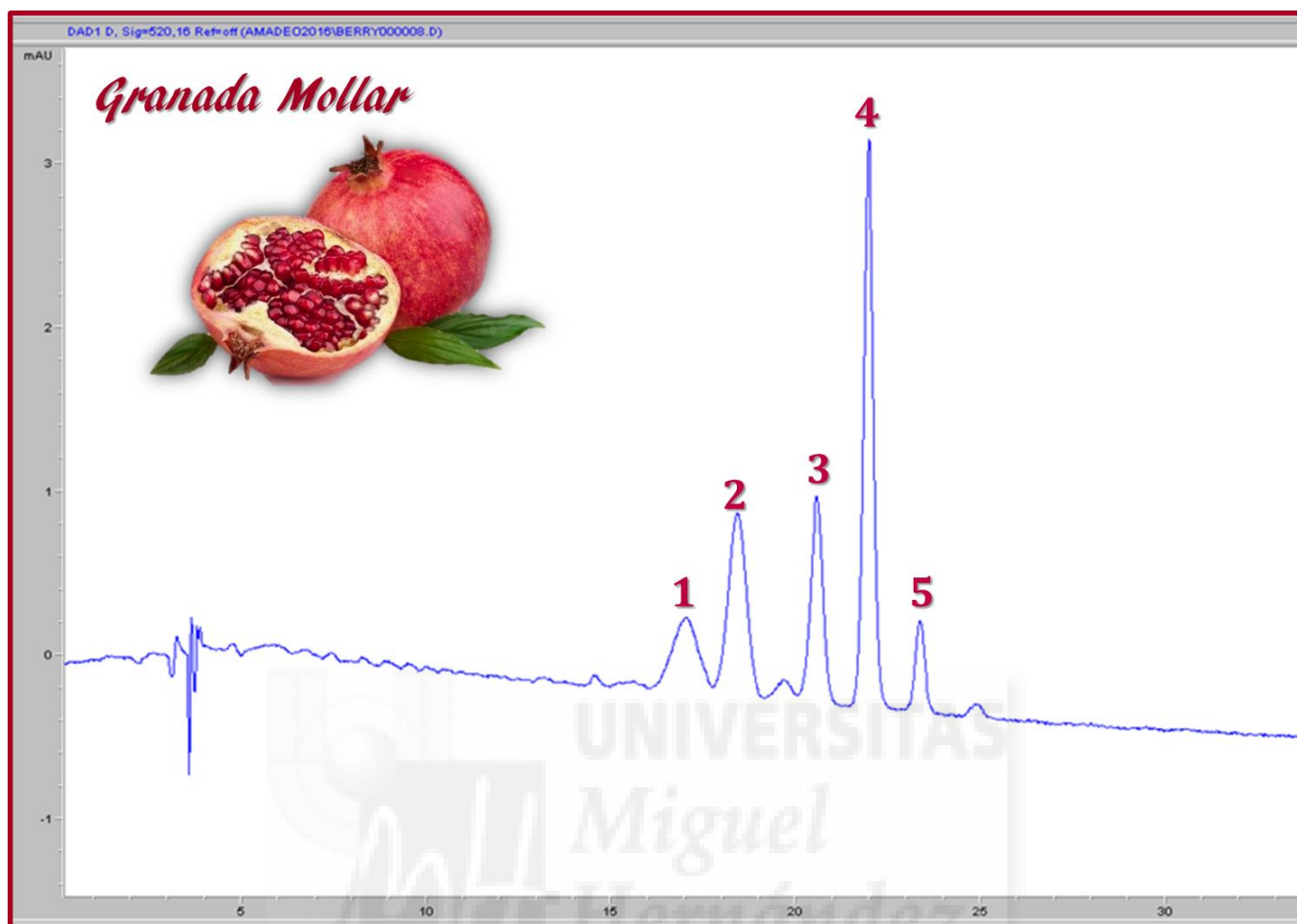


Figura Nº 19. Cromatograma de identificación de las antocianinas predominantes en la granada Mollar de Elche mediante espectrometría de masas (MS). Picos identificados por orden de elución: Compuestos no identificados y 4) Cianidina-3-glucósido.

Tabla Nº 4. Cuantificación de las antocianinas predominantes en granada Mollar por HPLC.

Fuente	Antocianina	Concentración (mg 100 g ⁻¹ PF)
Granada Mollar de Elche (pomegranates) (<i>Punica granatum</i>)	-	1
	-	4
	-	5
	Cianidina-3-glucósido	11
	-	1
	TOTAL	22

Resultados y Discusión

GRANADA WONDERFUL:



Figura Nº 20. Cromatograma de identificación de las antocianinas predominantes en la granada Wonderful mediante espectrometría de masas (MS). Picos identificados por orden de elución: Compuestos no identificados y 4) Cianidina-3-glucósido.

Tabla Nº 5. Cuantificación de las antocianinas predominantes en granada Wonderful por HPLC.

Fuente	Antocianina	Concentración (mg 100 g ⁻¹ PF)
Granada Wonderful (pomegranates) (<i>Punica granatum</i>)	-	5
	-	14
	-	31
	Cianidina-3-glucósido	35
	-	2
	TOTAL	87

Resultados y Discusión

GROSELLA:

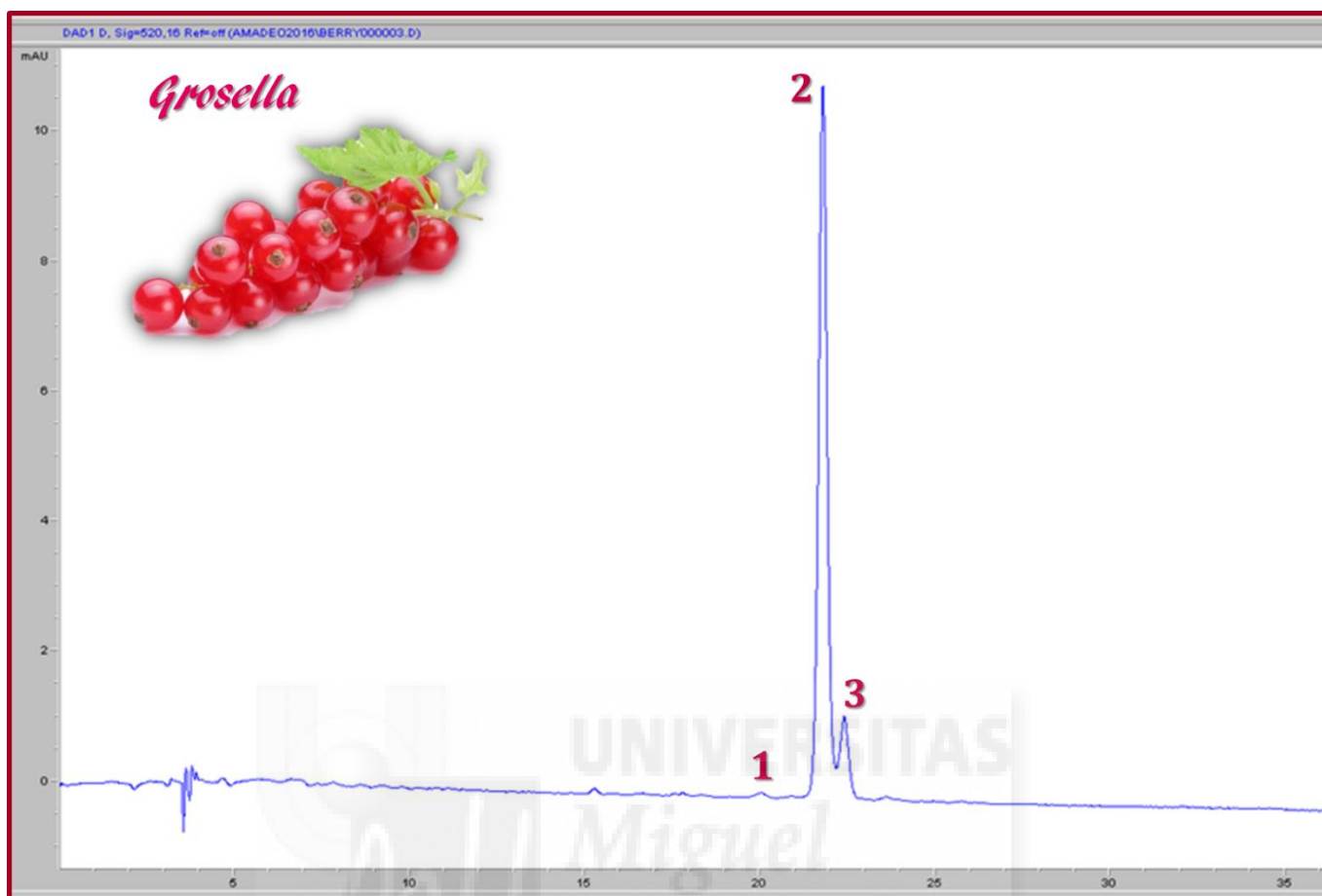


Figura N° 21. Cromatograma de identificación de las antocianinas predominantes en la grosella mediante espectrometría de masas (MS). Picos identificados por orden de elución: 1) Derivado Cafeoilquínico, 2) Cianidina-3-glucósido-5-pentósido, 3) Compuesto no identificado.

Tabla N° 6. Cuantificación de las antocianinas predominantes en grosella por HPLC.

Fuente	Antocianina	Concentración (mg 100 g ⁻¹ PF)
Grosella (red currant) (<i>Ribes rubrum</i>)	Derivado Cafeoilquínico	15
	Cianidina-3-glucósido-5-pentósido	30
	-	3
TOTAL		49

Resultados y Discusión

MORA:

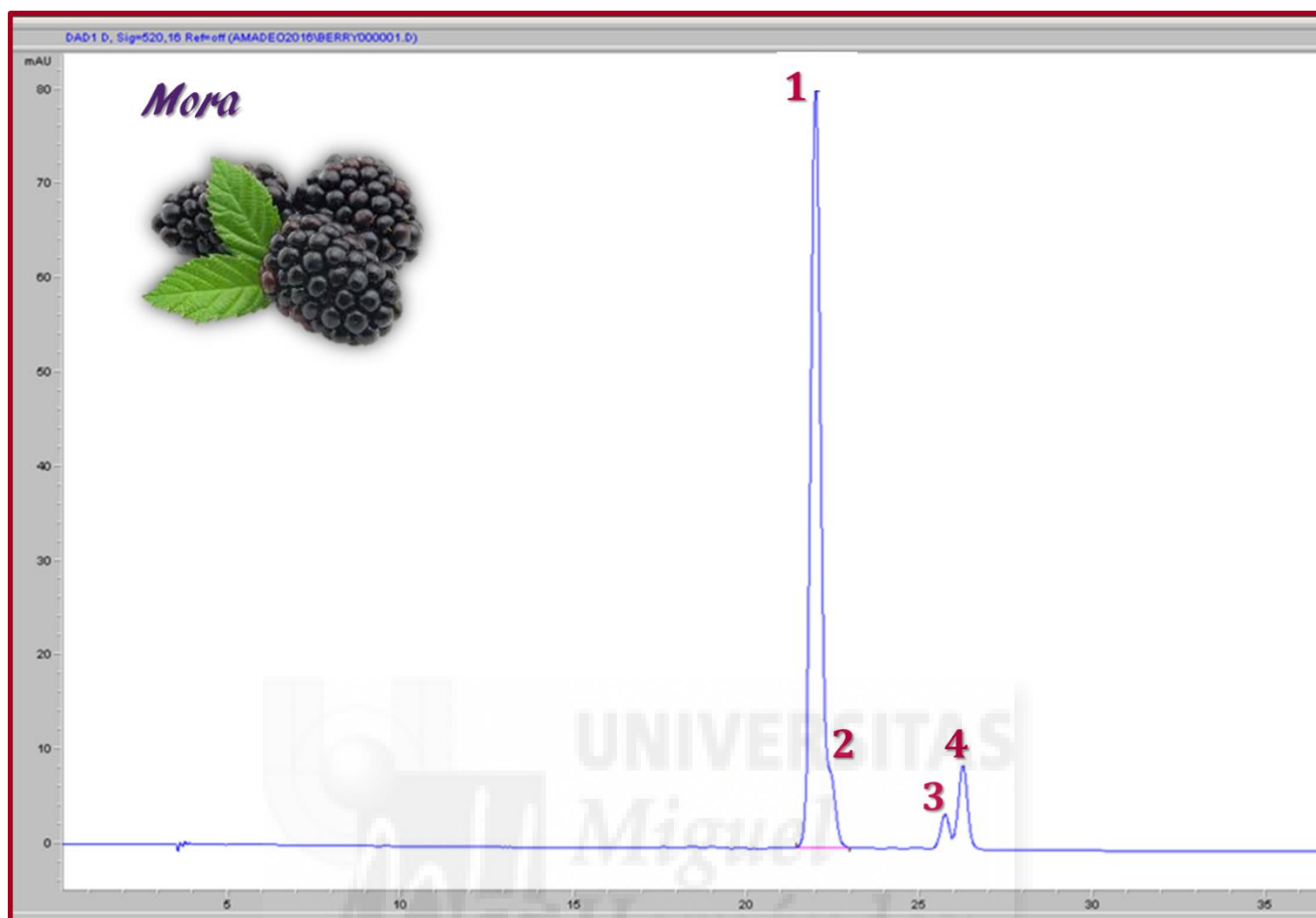


Figura Nº 22. Cromatograma de identificación de las antocianinas predominantes en la mora mediante espectrometría de masas (MS). Picos identificados por orden de elución: 1) Cianidina-3-glucósido, 2) Cianidina-3-rutinósido, 3) Cianidina-3-cumaroil-glucósido, 4) Compuesto no identificado.

Tabla Nº 7. Cuantificación de las antocianinas predominantes en mora por HPLC.

Fuente	Antocianina	Concentración (mg 100 g ⁻¹ PF)
Mora (black mulberry or blackberry) (<i>Morus nigra</i>)	Cianidina-3-glucósido	407
	Cianidina-3-rutinósido	10
	Cianidina-3-cumaroilglucósido	15
	-	22
TOTAL		454

Resultados y Discusión

UVA SWEET ENCHANTMENT:

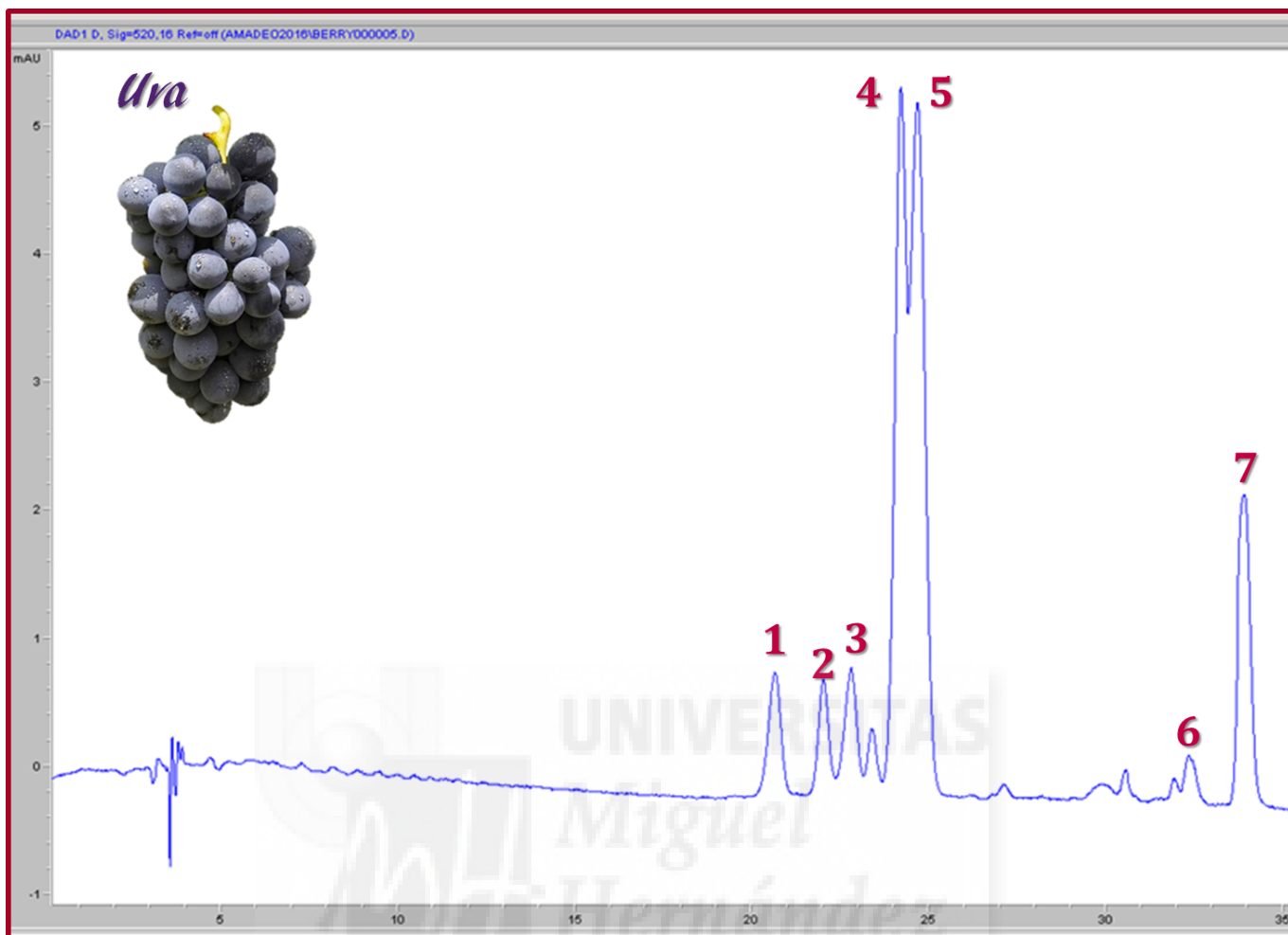


Figura Nº 23. Cromatograma de identificación de las antocianinas predominantes en uva mediante espectrometría de masas (MS). Picos identificados por orden de elución: Compuestos no identificados, 4) Peonidina-3-glucósido, 5) Malvidina-3-glucósido, 6) Quercetina-3-glucósido, 7) Malvidina-3-rutinósido.

Tabla Nº 8. Cuantificación de las antocianinas predominantes en mora por HPLC.

Fuente	Antocianina	Concentración (mg 100 g ⁻¹ PF)
Uvas (tablegrapes) (<i>Vitis vinifera</i>)	-	5
	-	4
	-	5
	Peonidina-3-glucósido	29
	Malvidina-3-glucósido	37
	Quercetina-3-glucósido	8
	Malvidina-3-rutinósido	9
	TOTAL	97






CONCLUSIONES

5



5. CONCLUSIONES

Tras los resultados obtenidos, las conclusiones son las siguientes:

-  Se observa como algunos frutos como la mora, el arándano y la grosella negra poseen un contenido muy elevado en antocianinas totales, tanto en fresco como deshidratados, con unas concentraciones en un rango de 300 a 400 mg 100 g⁻¹, similares a las encontradas por otros investigadores. De igual forma, los frutos que presentaban el mayor contenido en fenoles totales fueron la mora y el arándano, con concentraciones en torno a 250 y 300 mg 100 g⁻¹ de peso fresco.
-  Existe una gran variabilidad o margen de pérdidas en función del tipo de fruto, siendo algunos de ellos, como la grosella negra, el arándano, la frambuesa y la mora, muy óptimos para la conservación post-cosecha mediante el método de secado ya que mantienen su contenido en antocianinas y, por tanto, las propiedades funcionales que ejercen en el organismo humano.
-  Las antocianinas se identificaron por espectrometría de masas y se cuantificaron por HPLC en los extractos obtenidos de los frutos frescos, obteniéndose que la antocianina predominante en los arándanos fue la malvidina-3-glucósido, en la frambuesa la cianidina-3,5-diglucósido, en la fresa la pelargonidina-3-glucósido, en la granada Mollar de Elche y Wonderful la cianidina-3-glucósido, en la grosella roja la cianidina-3-glucósido-5-pentósido, en la mora la cianidina-3-glucósido y, por último, en la uva S.E. fue la malvidina-3-glucósido.



REFERENCIAS

6

BIBLIOGRÁFICAS



6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen Ø. M. and Jordheim M. 2013. Basic anthocyanin chemistry and dietary sources. In Anthocyanins in Health and Disease; Wallace T. C., Giusti M. Editorial CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 13–90.

Ávila M., Hidalgo M., Sánchez-Moreno C., Pelaez C., Requena T. and Pascual-Teresa S. d. 2009. Food Research International, Vol. 42, pp. 1453–1461.

Aviram M. and Rosenblat M. 2012. Evidence-based Complementary Alternative Medicine, 382763.

Aviram M., Volkova N., Coleman R., Dreher M., Reddy M. K., Ferreira D. and Rosenblat M. 2008. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 56, pp. 1148–1157.

Azzini E., Vitaglione P., Intorre F., Napolitano A., Durazzo A., Foddai MS. et al. 2010. Bioavailability of strawberry antioxidants in human subjects. British Journal of Nutrition, Vol. 104, pp. 1165–73.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A., Igetic R. 2008. Phenolics as antioxidants in garlic (*A. sativum L., Alliaceae*). Food Chemistry, Vol. 111, pp. 925–929.

Bridle P. and Timberlake C. F. 1997. Food Chemistry, Vol. 58, pp. 103–109.

Calín-Sánchez A. 2014. Application of new drying technologies to aromatic herbs and vegetables: effects on physico-chemical, sensory and functional properties. Tesis Doctoral, Universidad Miguel Hernández de Elche.

Calín-Sánchez A., Figiel A., Hernández F., Melgarejo P., Lech K., Carbonell-Barrachina A. 2012a. Chemical Composition, Antioxidant Capacity, and Sensorial Quality of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Arils and Rind as Affected by Drying Method. Food and Bioprocess Technology. Artículo en prensa.

Cantos E., Espín J.C. and Tomás-Barberán F.A. 2002. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 50, pp. 5691–5696.

Carreño J., Almela L., Martínez A., and Fernández-López J.A. 1997. Chemotaxonomical classification of red table grapes based on anthocyanin profile and external colour. Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie, Vol. 30, pp. 256–265.

Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernández M. d. L., Páez-Hernández M. E., Rodríguez J. A. and Galán-Vidal C. A. 2009. Food Chemistry, Vol. 113, pp. 859–871.

Referencias bibliográficas

Castilla P., Echarri R., Davalos A., Cerrato F., Ortega H., Teruel J. L., Lucas M. F., Gomez-Coronado D., Ortuno J. and Lasuncion M. A. 2006. The American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 84, pp. 252–262.

Chaovanalikit A. and Wrolstad R.E. 2004. Total anthocyanin and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. Journal of Food Science, Vol. 69, FCT67-FCT72.

Chayjan R. A. & Kaveh M. 2014. Physical parameters and kinetic modeling of fix and fluid bed drying of terebinth seeds. Journal of Food Processing and Preservation, Vol. 38, pp. 1307–1320.

Cheigh H.S., Um S.H., Lee C.Y. 1995. Antioxidant Characteristics of Melanin-Related Products from Enzymatic Browning Reaction of Catechin in a Model System; ACS Symposium Series 600; American Chemical Society: Whashington, DC, 200-208.

Choi JS., Choi YJ., Shin SY. et al. 2008. Dietary flavonoids differentially reduce oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells: role of MAPK- and JAK/STAT-signaling. Journal of Nutrition, Vol. 138, pp. 983–990.

Clifford M.N. 2000. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 80, pp. 1063–1072.

Connor A.M., Luby J.J., Hancock J.F., Berkheimer S. and Hanson E.J. 2002. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 50, pp. 893-898.

Crozier A., Jaganath I. B. and Clifford M. N. 2009. Natural Product Reports, Vol. 26, pp. 1001–1043.

Crozier A., Yokota T., Jaganath I. B., Marks S., Saltmarsh M. and Clifford M.N. 2006. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet, pp. 208–302.

Czank C., Cassidy A., Zhang Q., Morrison D. J., Preston T., Kroon P. A., Botting N. P. and Kay C. D. 2013. American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 97, pp. 995-1003.

Dadali G., Apar D. K. & Özbek B. 2007b. Microwave drying kinetics of okra. Drying Technology, Vol. 25, pp. 917–924.

Dadali G., Demirhan E. & Özbek B. 2007a. Color change kinetics of spinach undergoing microwave drying. Drying Technology, Vol. 25, pp. 1713–1723.

De Ferrars R. M., Czank C., Zhang Q., Botting N. P., Kroon P. A., Cassidy A. and Kay C. D. 2014. British Journal of Pharmacology, Vol. 171, pp. 3268–3282.

De Freitas V. A. P. and Mateus N. 2010. Updating wine pigments. In Recent Advances in Polyphenol Research; Santos-Buelga C., Escribano-Bailon M. T., Lattanzio V. Editorial Wiley-Blackwell: Chichester, UK, Vol. 2, pp. 59–80.

Del Rio D., Rodriguez-Mateos A., Spencer J. P. E., Tognolini M., Borges G. and Crozier A. 2013. Antioxidants & Redox Signaling, Vol. 18, pp. 1818–1892.

Referencias bibliográficas

Díaz-Mula H.M., Zapata P.J., Guillén F., Castillo S., Martínez-Romero D., Valero D and Serrano M. 2008. Changes in physicochemical and nutritive parameters and Bioactive compounds during development and on-tree ripening of eight plum cultivars: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 88, pp. 2499-2507.

Dohadwala M. M. and Vita J. A. 2009. *Journal of Nutrition*, Vol. 139, pp. 1788S-1793S.

Doymaz I. & Ismail O. 2011. Drying characteristics of sweet cherry. *Food and Bioproducts Processing*, Vol. 89, pp. 31-38.

Fan-Chiang H.J. and Wrolstad R.E. 2005. Anthocyanin pigment composition of blackberries. *Journal of Food Science*, Vol. 70, C198-C202.

Fernández-López J.A., Almela L., Muñoz J.A., Hidalgo V. and Carreño J. 1998. Dependence between colour and individual anthocyanin content in ripening grapes. *Food Research International*, Vol. 31, pp. 667-672.

Fossen T., Rayyan S. and Andersen Ø. M. 2004. Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. *Phytochemistry*, Vol. 65, pp. 1421-1428.

Funebo T., Ohison T. 1998. Microwave assisted air Dehydration of apple and potato. *Journal of Food Engineering*, Vol. 38, pp. 353-367.

Gao L. and Mazza G. 1995. Characterization, quantification, and distribution of anthocyanins and colorless phenolic in Sweet cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 43, pp. 343-346.

García-Muñoz C., Hernández L., Pérez A. and Vaillant F. 2014. *Food Research International*, Vol. 55, pp. 161-169.

Gironés-Vilaplana A., Mena, P. Moreno, D. A. and García-Viguera C. 2013. Evaluation of sensorial, phytochemical and biological properties of new isotonic beverages enriched with lemon and berries during shelf life. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 94, pp. 1090-1100.

Glass C. K. and Witztum J. L. 2001. *Cell*, Vol. 104, pp. 503-516.

González-Barrio R., Edwards C. A. and Crozier A. 2011. *Drug Metabolism and Disposition*, Vol. 39, pp. 1680-1688.

González-Barrio R., Truchado P., Ito H., Espín J. C. and Tomás-Barberán F. A. 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 59, pp. 1152-1162.

González-Neves G., Charamelo D., Balado J., Barreiro L., Bochicchio R., Gatto G., Gil G., Tessore A., Carbonneau A. and Moutounet M. 2004. Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 513, pp. 191-196.

Referencias bibliográficas

González-Paramas A. M., Lopes F., Martin P., Macz G., Gonzalez-Manzano S., Alcalde C., Perez J., Escribano-Bailon M. T., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C. 2006. Flavanol-anthocyanin condensed pigments in plant extracts. *Food Chemistry*, Vol. 94, pp. 428–436.

Gunasekaran S. 1999. Pulsed microwave-vacuum drying of food materials. *Drying Technology*, Vol. 17, pp. 395-412.

Hannum S. M. 2004. Potential Impact of Strawberries on Human Health: A Review of the Science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 44, pp. 1–17.

Hirota S., Nishioka T., Shimoda T., Miura K., Ansai T. and Takahama U. 2011. *Food Science and Technology Research*, Vol. 7, pp. 239–245.

Holdsworth S.D. 1971. Dehydration of foodstuffs-a review. *Journal of Food Technology*, Vol. 6, pp. 331-343.

Jaganath I. B. and Crozier A. 2009. Phenolic Compounds of Plant Origin and Health: The Biochemistry behind their Nutritional and Pharmacological Value, pp. 11–48.

Jayaraman K.S. and Das Gupta D.K. 2006. *Drying of Fruits and Vegetables en Handbook of Industrial Drying*, Editorial Taylor & Francis Group (Londres, Reino Unido).

Jennings A., Welch A.A, Fairweather-Tait S.J., Kay C., Minihane A. M., Chowienczyk P., Jiang B., Cecelja M., Spector T., Macgregor A. and Cassidy A. 2012. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 96, pp. 781–788.

Jim Fang Ph.D. 2015. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. *Nutrition*, Vol. 31, pp. 1301-1306.

Kay C. D. 2010. The future of flavonoid research. *British Journal of Nutrition*, Vol. 104 (Suppl. 3), pp. S91–S95.

Kay C. D., Mazza G. and Holub B. J. 2005. *Journal of Nutrition*, Vol. 135, pp. 2582–2588.

Lee M. J., Lambert J. D., Prabhu S., Meng X., Lu H., Maliakal P., Ho C. T. and Yang C. S. 2004. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, Vol. 13, pp. 132–137.

Liu L. 2003. Entry into supermarket of agricultural products after entering WTO. *Agricultural Products Processing*, Vol. 6, pp. 4-5.

Lloyd-Jones D., Adams R.J., Brown T. M., Carnethon M., Dai S., De Simone G., Ferguson T. B., Ford E., Furie K., Gillespie C., Go A., Greenlund K, Haase N., Hailpern S., Ho P. M., Howard V., Kissela B., Kittner S., Lackland D., Lisabeth L., Marelli A., McDermott M. M., Meigs J., Mozaffarian D., Mussolino M., Nichol G., Roger V. L., Rosamond W., Sacco R., Sorlie P., Stafford R., Thom T., Wasserthiel-Smoller S., Wong N. D., Wylie-Rosett J. 2010. C. American Heart Association Statistics and S. Stroke Statistics, *Circulation*, Vol. 121, pp. 948–954.

Referencias bibliográficas

Lopes-da-Silva F., Escribano-Bailón M.T. and Santos-Buelga C. 2007. Stability of pelargonidin-3-glucoside in model solutions in the presence and absence of flavanols. *American Journal of Food Technology*, Vol. 2, pp. 602-617.

Luchsinger L. L. 2010. Deshidratación y condensación. Ingeniero Agrónomo, Ph. D. Especialista postcosecha de frutas y cadena de frío. Consultor Internacional.

Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A. and Rémésy C. 2005. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 81, pp. 230S-242S.

Manzocco L., Calligaris S., Mastrocola D., Nicoli M.C., Lerici C.R. 2000. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 11, pp. 340-346.

Martí N., Pérez-Vicente A. and García-Viguera C. 2001. Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 82, pp. 217-221.

McDougall G. J., Gordon S., Brennan R., Stewart D. 2005. Anthocyanin-flavanol condensation products from black currant (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, pp. 7878-7885.

McGhie T. K. and Walton M. C. 2007. *Molecular Nutrition & Food Research*, Vol. 51, pp. 702-713.

Mena P., García-Viguera C., Navarro-Rico J., Moreno D. A., Bartual J., Saura D. and Martí N. 2011. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 91, pp. 1893-1906.

Miller H.E., Rigelhof F., Marquart L., Prakash A., Kanter M. 2000. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 19, pp. 1-8.

Mirdehghan S.H., Rahemi M., Serrano M., Guillén F., Martínez-Romero D. and Valero D. 2007c. The application of polyamines by pressure or immersion as a tool to maintain functional properties in stored pomegranates arils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 55, pp. 755-760.

Morales F.J., Jiménez-Pérez S. 2001. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, Vol. 72, pp. 119-125.

Mozeti B., Trebse P and Hribar J. 2002. Determination and quantisation of anthocyanins and hydroxycinnamic acids in different cultivars of Sweet cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica Region (Slovenia). *Food Technology and Biotechnology*, Vol. 40, pp. 207-212.

Neveu V., Perez-Jiménez J., Vos F., Crespy V., du Chaffaut L., Mennen L., Knox C., Eisner R., Cruz J., Wishart D., Scalbert A. 2010. Phenol-Explorer: an online

Referencias bibliográficas

comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database. Available from: <http://www.phenol-explorer.eu/> Accessed 2016 Juny 12.

Nuutila A.M., Puupponen-Pimia R., Aarni M., Oksman-Caldentey K.M. 2003. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, Vol. 81, pp. 485-493.

Oficina de Estadísticas de Japón. 2001. Anuario de Estadística agraria. <http://www.stat.go.jp>. Visitada en Mayo 2016.

Ogawa K., Sakakibara H., Iwata R., Ishii T., Sato T., Goda T., Shimoi K., Kumazawa S. 2008. Anthocyanin composition and antioxidant activity of the crowberry (*Empetrum nigrum*) and other berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 56, pp. 4457-62.

Orak H.H. 2007. Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlation. *Scientia Horticulturae*, Vol. 111, pp. 235-241.

Pascual-Teresa S., Moreno D. A. and García-Viguera C. 2010. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 11, pp. 1679-1703.

Perez-Jimenez J., Neveu V., Vos F. and Scalbert A. 2010. *European Journal Clinical Nutrition*, Vol. 64 (Suppl 3), pp. 112-120.

Pojer E., Mattivi F., Johnson D. and Stockley C. S. 2013. The case for anthocyanin consumption to promote human health: a review. *Food Science and Food Safety*, Vol. 12, pp. 483-508.

Qin Y., Xia M., Ma J., Hao Y., Liu J., Mou H., Cao L. and Ling W. 2009. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 90, pp. 485-92.

Rosenblat M., Hayek T. and Aviram M. 2006. *Atherosclerosis*, Vol. 187, pp. 363-371.

Salunkhe D.K. and Desai B.B. 1984. *Postharvest Biotechnology of Fruits*, Editorial CRIC Press (Cleveland, Estados Unidos).

Santos-Gallego C. G., Giannarelli C. and Badimon J. J. 2011. *Current Atherosclerosis Reports*, Vol. 13, pp. 266-276.

Serrano M., Díaz-Mula H.M., Zapata P.J., Castillo S., Guillén F., Martínez-Romero D., Valverde J.M. and Valero D. 2009. Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of Sweet cherry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, pp. 2741-2745.

Referencias bibliográficas

Singh N. J. & Pandey K. R. 2012. Convective air drying characteristics of sweet potato cube (*Ipomoea batatas L.*). Food and Bioproducts Processing, Vol. 90, pp. 317–322.

Somogyi L.P. and Luh B.S. 1986. Dehydration of fruits in Commercial Fruit Processing, Editorial AVI Publishing (Westport, Estados Unidos).

Tarascou I., Mazauric J. P., Meudec E., Souquet J. M., Cunningham D., Nojeim S., Cheynier V.; Fulcrand H. 2011. Characterisation of genuine and derived cranberry proanthocyanidins by LC-ESIMS. Food Chemistry, Vol. 128, pp. 802–810.

Tomás-Barberán F.A., Gil M.I., Cremin P., Waterhouse A.L., Hess-Pierce B., Kader A.A. 2001. HPLD-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches and plums. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 49, pp. 4748–4760.

Unal H. G. & Sacilik K. 2011. Drying characteristics of hawthorn fruits in a convective hot-air dryer. Journal of Food Processing and Preservation, Vol. 35, pp. 272–279.

Valero D. and Serrano M. 2010. Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality. CRC Press, Taylor & Francis Group.

Vega-Mercado H., Góngora-Nieto M.M., Bárboza-Cánovas. 2001. Advances in Dehydration of Foods. Journal of Food Engineering, Vol. 49, pp. 271-289.

Vislocky L. M. and Fernandez M. L. 2010. Nutrition Reviews, Vol. 68, pp. 656–670.

Cassidy A., Mukamal K. J., Liu L., Franz M., Eliassen A. H. and Rimm E. B. 2013. Circulation, Vol. 127, pp. 188–196.

Vitaglione P., Donnarumma G., Napolitano A., Galvano F., Gallo A., Scalfi L. and Fogliano V. 2007. Journal of Nutrition, Vol. 137, pp. 2043–2048.

Wallace TC. Anthocyanins in cardiovascular disease. 2011. Advances in Nutrition, Vol. 2, pp. 1–7. *This study reviews the latest findings on the effects of anthocyanins on cardiovascular diseases based on model experiments and the few existing epidemiologic and intervention studies in humans. Potential mechanisms are discussed.*

Walle T., Browning A. M., Steed L. L., Reed S. G. and Walle U. K. 2005. Journal of Nutrition, Vol. 135, pp. 48–52.

Wang S.Y., Chen C.T., Sciarappa W., Wang C.Y. and Camp M.J. 2008. Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 56, pp. 5788–5794.

Wang S.Y. and Lin H.S. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of black-berry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 48, pp. 140-146.

Referencias bibliográficas

- Wojdyło A., Figiel A., Oszmiański J. 2009. Effect of drying methods with the application of vacuum microwaves on the Bioactive compounds, color, and antioxidant activity of strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 57, pp. 1337-1343.
- Wu X., Beecher G. R., Holden J. M., Haytowitz D. B., Gebhardt S. E. and Prior R. L. 2006. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 54, pp. 4069–4075.
- Xie C., Kang J., Chen J. R., Nagarajan S., Badger T. M. and Wu X. 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 59, pp. 10381–10387.
- Yang C. S., Lee M. J. and Chen L. 1999. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, Vol. 8, pp. 83–89.
- Yen G.C., Hsieh P.P. 1995. Antioxidative activity and scavenging effects on active oxygen of xylose-lysine Maillard reaction products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 67, pp. 415-420.
- Yen G.C., Tsai L.C. 1993. Antimutagenicity of partially fractionated Maillard reaction product. *Food Chemistry*, Vol. 47, pp. 11-15.
- Yimalz Y., Toledo R. 2005. Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. *Food Chemistry*, Vol. 93, pp. 273-278.
- Zanotti I., Dall'Asta M., Mena P., Mele L., Bruni R., Ray S. and Del Rio D. 2015. Atheroprotective effects of (poly)phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. *Food and Function*, Vol. 6, pp. 13.
- Zern T. L., Wood R. J., Greene C., West K. L., Liu Y., Aggarwal D., Shachter N. S. and Fernandez M. L. 2005. *Journal of Nutrition*, Vol. 135, pp. 1911–1917.
- Zhu Y., Miao Y., Meng Z. and Zhong Y. 2015. Effects of *Vaccinium* Berries on Serum Lipids: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 11 pages.
- Zhu A. & Shen X. 2014. The model and mass transfer characteristics of convection drying of peach slices. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, Vol. 72, pp. 347–351.