

Universitat de Lleida

Facultad de Medicina

Grado en Nutrición humana y dietética

Trabajo de Fin de Grado

Contenido fenólico y capacidad antioxidante de fresa mínimamente procesada sometida a tratamientos de conservación por pulsos de luz de alta intensidad.



Autora: Silvia Chordi Barrufet

Tutor: Robert C. Soliva Fortuny

Lleida, 2013

Índice

Resumen.....	2
1. Antecedentes.....	3
1.1. Importancia nutricional de las frutas.....	3
1.2. La fresa.....	5
1.3. Antioxidantes en la dieta.....	6
1.4. Estrés oxidativo.....	15
1.5. Procesado y conservación de los alimentos.....	16
1.6. Procesado mínimo de productos vegetales.....	19
1.7. Tratamientos no térmicos con luz pulsada.....	21
2. Hipótesis.....	23
3. Objetivos de la investigación.....	24
4. Metodología.....	25
5. Resultados.....	30
5.1 Capacidad antioxidante.....	30
5.2 Compuestos fenólicos totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.....	31
5.3 Compuestos fenólicos totales mediante el ensayo del reactivo FBBB.....	33
5.4 Antocianinas totales.....	34
6. Discusión de los resultados.....	36
7. Conclusiones.....	39
Bibliografía.....	40

RESUMEN

La utilización de tratamientos de luz pulsada es efectiva para la descontaminación de productos vegetales al tener poder antimicrobiano. El tratamiento con pulsos de luz en fresa mínimamente procesada provocó una ligera disminución del contenido de compuestos fenólicos totales, pero no afectó a la capacidad antioxidante ni al contenido de antocianinas totales. El tiempo de almacenamiento y la presencia de antioxidantes produjeron cambios en la composición de los compuestos bioactivos presentes en la fresa.

1. ANTECEDENTES

1.1 IMPORTANCIA NUTRICIONAL DE LAS FRUTAS

Las frutas contienen múltiples compuestos, así como una composición y una estructura muy variables. Están constituidas por tejidos vivos, provistos de una actividad metabólica y por ello su composición va cambiando a lo largo del tiempo. Tanto la velocidad como la magnitud de estos cambios dependen del papel fisiológico y el estado de madurez de la fruta. El valor nutritivo de la fruta viene determinado por su composición (Fourie, 1996).

Los componentes más importantes de las frutas pueden agruparse en agua, proteínas, hidratos de carbono, grasas, minerales y vitaminas. La mayor parte de estos compuestos son nutrientes esenciales, necesarios para el organismo humano. La cantidad de estos nutrientes que el organismo necesita depende de factores tales como la edad, el peso, el sexo, el estado de salud y la actividad física del individuo considerado.

Las frutas son un grupo de alimentos indispensable para el equilibrio de la dieta humana, especialmente por su aporte de fibra y vitaminas. Junto con las hortalizas, son la principal fuente de vitamina C.

Definición

El Código Alimentario Español otorga la denominación genérica de frutas al “fruto, infrutescencia, la semilla o las partes carnosas de órganos florales que hayan alcanzado un grado adecuado de madurez y sean propias para el consumo humano”. Asimismo, el Código clasifica las frutas atendiendo a dos criterios:

- *Por su naturaleza:*
 - Carnosas: aquellas cuya parte comestible posee en su composición al menos un 50% de agua.
 - Secas: aquellas cuya parte comestible posee en su composición menos de un 50% de agua (avellana, nuez...).
 - Oleaginosas: aquellas que son empleadas para la obtención de grasas y para el consumo humano (aceituna, cacahuete, coco, girasol, sésamo).

- *Por su estado:*
 - Frescas: destinadas al consumo humano inmediato sin sufrir tratamiento alguno que afecte a su estado natural.
 - Desecadas: el producto obtenido a partir de frutas frescas, cuya proporción de humedad se ha reducido por la acción natural del aire y del sol.
 - Deshidratadas: productos obtenidos a partir de frutas carnosas frescas cuya proporción de humedad ha sido reducida mediante procesos apropiados y autorizados. El grado de humedad residual será tal que impida toda alteración posterior.

Características generales

La composición química de las frutas depende del tipo de fruto y de su grado de maduración. El componente mayoritario de las frutas es el agua, que constituye entre el 75-90% del peso de la parte comestible. Le sigue en importancia cuantitativa los hidratos de carbono (5-18%), polisacáridos y ácidos orgánicos (0,5%-6%). La sacarosa es el oligosacárido dominante en las frutas, y los principales monosacáridos de las frutas son la glucosa y la fructosa, su concentración varía en función de la fruta y el estado de madurez. Los compuestos nitrogenados (0,1-1,5%) y los lípidos (0,1-0,5%) son escasos en la parte comestible de las frutas, aunque son importantes en las semillas de algunas de ellas. Los ácidos grasos más abundantes son el ácido palmítico, el ácido oleico y el ácido linoleico (Astiasarán, 2000).

Algunos componentes, como los colorantes, los aromas y los compuestos fenólicos, se encuentran en muy bajas concentraciones. Otros como las vitaminas, los minerales y la fibra, aportan importantes propiedades nutritivas. El potasio es el mineral más importante, seguido del fósforo, el calcio y el magnesio. Las pectinas desempeñan un papel fundamental en la consistencia.

Los valores de vitaminas varían según el tipo de fruta, pero en general, son más ricas en vitaminas las variedades con más color, las expuestas al sol y las frutas de verano. Las frutas destacan por su contenido en vitaminas C y vitamina A. En algunas también encontramos vitaminas del grupo B (B1, B2, B5 y B8).

Componentes no nutritivos

Los alimentos contienen, además de nutrientes, otras sustancias que en principio tienen bajo o nulo valor nutritivo, pero que son también importantes porque confieren propiedades sensoriales u organolépticas, que caracterizan al alimento. Estos componentes no nutritivos tienen sobre todo interés tecnológico y comercial.

Las propiedades organolépticas son el color, sabor y gusto, olor y aroma, textura y ruido. Las propiedades de sabor, gusto, olor y aroma son a veces difíciles de diferenciar, y hablamos habitualmente de flavor, que es el conjunto de sensaciones que se experimentan cuando el alimento está en la boca. El color de un alimento puede ser debido a pigmentos naturales, a pigmentos modificados y a productos de transformación de aminoácidos y glúcidos. Dentro de los pigmentos naturales encontramos los polifenoles (Kuklinski, 2003).

1.2 LA FRESA

La fresa es una fruta primaveral muy popular debido a su sabor peculiar y aroma único. Muchos estudios han demostrado que las fresas son una importante fuente de flavonoides, en concreto de antocianinas, pigmentos que proporcionan colores rojos, azules y púrpuras en las frutas. Además, son extremadamente ricas en vitamina C y ácidos fenólicos, principalmente ácido elágico (Odriozola, 2009).

Composición general

La fresa contiene 35Kcal/100g. La composición química de la fresa es de 89,6% de agua, 7% de hidratos de carbono, 0,7% de proteínas, 0,5% de lípidos y 2,2% de fibra (Moreiras et al. 1992).

El contenido de azúcares en la fresa (de la porción comestible) es de 2,6% de glucosa, 2,3% de fructosa y 1,3% de sacarosa. Respecto al contenido en minerales de la fresa, el potasio es el componente mayoritario, seguido del fósforo, calcio y magnesio (Tabla 1). La vitamina mayoritaria es la vitamina C (Tabla 2).

Tabla 1. Composición en minerales de la porción comestible de la fresa (Moreiras et al. 1992).

Ca (mg)	Fe (mg)	I (μ g)	Mg (mg)	Zn (mg)	Na (mg)	K (mg)	P (mg)	Se (μ g)
25	0,8	8	12	0,1	2	190	26	Tr

Tabla 2. Composición en vitaminas de la porción comestible de la fresa (Moreiras et al. 1992).

Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)	Equivalentes Niacina (mg)	Vitamina B6 (mg)	Ácido fólico (μ g)	Vitamina B12 (μ g)
0,02	0,04	0,6	0,06	20	0
Vitamina C (mg)	Equivalentes de retinol (μ g)	Retinol (μ g)	Carotenos (μ g)	Vitamina D (μ g)	Vitamina E (mg)
60	1	0	4	0	0,2

Las condiciones óptimas de conservación de la fresa son una temperatura de $-0,5^{\circ}\text{C}$ a 5°C . Si se almacenan bajo atmósfera controlada/modificada, éstas deben hallarse entre un 4-10% de O_2 y un 0-20% de CO_2 . La vida útil de las fresas almacenadas en aire es de hasta 5 días, en atmósfera controlada de hasta 10 días y en condiciones hipobáricas de hasta de 21 días (Moreiras et al. 1992).

1.3 ANTIOXIDANTES EN LA DIETA

Los antioxidantes en la dieta los podemos encontrar en forma de vitaminas, minerales y compuestos no nutritivos, como los polifenoles.

VITAMINAS

Las vitaminas se consideran micronutrientes porque el organismo los precisa en cantidades pequeñas, pero son nutrientes esenciales, es decir, son imprescindibles para el normal funcionamiento del organismo y deben ser aportados por la dieta, ya que el organismo no puede sintetizarlas, o bien lo hace en cantidades insuficientes. Las vitaminas actúan como

coenzimas y cofactores, e intervienen en numerosas reacciones metabólicas que se producen en el organismo; tienen principalmente una función reguladora y protectora. Las vitaminas que tienen función antioxidante son la vitamina C y la vitamina E (Kuklinski, 2003).

Vitamina C

La vitamina C se denomina ácido ascórbico. Su estructura carece del grupo carboxílico (COOH), pero a pesar de ello tiene marcadas propiedades ácidas, y de ahí proviene su denominación. Por oxidación se puede transformar reversiblemente en ácido deshidroascórbico, que todavía posee propiedades vitamínicas. A su vez, el ácido deshidroascórbico puede perder agua de forma irreversible y transformarse en ácido dicetogulónico, que carece de propiedades vitamínicas (Figura 1).

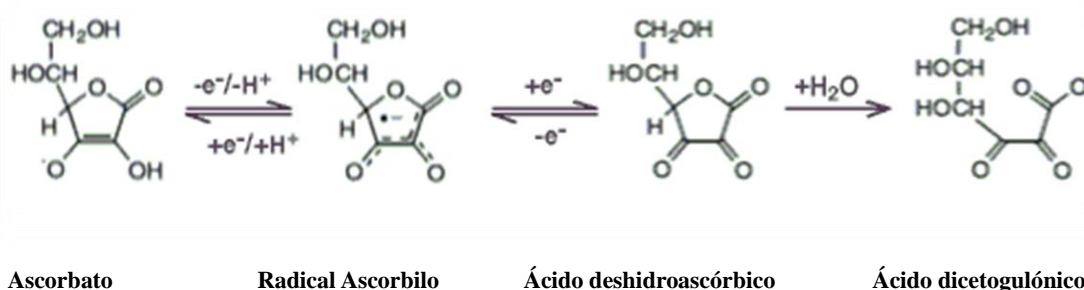


Figura 1. Oxidación del ácido ascórbico.

La vitamina C funciona fisiológicamente como un antioxidante soluble en agua, en virtud de su alto poder reductor. Es un cofactor para las enzimas involucradas en el biosíntesis de colágeno, carnitina, y neurotransmisores in vitro, y esto puede apagar una variedad de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno en ambientes acuosos (Krinsky, 2000).

La vitamina C es una vitamina soluble en agua que es esencial para todos los seres humanos y unos pocos mamíferos que carecen de la capacidad de sintetizar el compuesto a partir de glucosa, ya que carecen de la enzima oxidasa gulonolactona. Por lo tanto, el organismo humano no puede sintetizar el ácido ascórbico y debe ser aportado con la dieta.

Las funciones biológicas del ácido ascórbico se basan en su capacidad de proporcionar equivalentes reductores para una variedad de reacciones bioquímicas. Debido a su poder reductor, la vitamina puede reducir las especies de oxígeno reactivas más fisiológicamente relevantes (Buettner, 1993).

La vitamina C se conoce por ser un donante de electrones para ocho enzimas humanas. Tres participan en la hidroxilación del colágeno, dos en la biosíntesis de carnitina, y tres en la hormona y la biosíntesis de aminoácidos. Las tres enzimas que participan en la hormona y la biosíntesis de aminoácidos son la dopamina- β -hidroxilasa, necesaria para la biosíntesis de catecolaminas la norepinefrina y epinefrina; peptidil-glicina monooxigenasa, necesario para la amidación de hormonas peptídicas, y 4-hidroxi fenilpiruvato dioxigenasa, que participan en metabolismo de la tirosina (Levine et al., 1996). Interviene en la síntesis de colágeno y en los procesos de reparación tisular. Es importante en el metabolismo de los glúcidos, en la absorción intestinal del hierro, en la formación de cartílagos, huesos y dientes, y en el funcionamiento corticosuprarrenal.

La absorción intestinal de ácido ascórbico se produce a través de un proceso de transporte activo dependiente de sodio que es saturable y dependiente de la dosis (Tsao, 1997). A concentraciones bajas de ascorbato gastrointestinales, predomina el transporte activo, mientras que la difusión simple se produce a altas concentraciones. Alrededor de un 70-90% de las ingestas alimentarias habituales de ácido ascórbico (30-180 mg/día) se absorben, sin embargo, la absorción cae a alrededor de 50 por ciento o menos con dosis crecientes por encima de 1 g/día (Kallner et al, 1979).

La dosis diaria recomendada de vitamina C es de 90 mg/día para los hombres adultos y 75 mg/día para las mujeres adultas. El requisito para los fumadores aumenta a 35 mg/día, ya que el fumar aumenta el estrés oxidativo y el movimiento metabólico de la vitamina C (Krinsky, 2000).

La mayor fuente de vitamina C son las frutas y verduras, aunque la cantidad de vitamina C que contienen depende de la variedad, las condiciones del suelo, el clima, madurez, las condiciones de almacenamiento y procesado (Talanen, 1995). Las principales fuentes son

las frutas (cítricos, kiwi, fresas, grosellas, moras), las verduras (espinacas, perejil) y las patatas. También se encuentra en la leche y el hígado, pero en menor cantidad.

La carencia de vitamina C produce escorbuto y también gingivitis hemorrágica (inflamación de las encías con sangrado), con hemorragias que pueden ser mortales. No existen problemas por un exceso de su consumo, ya que dicho exceso se elimina por la orina.

Vitamina E

La vitamina E funciona principalmente como un antioxidante que rompe la cadena que impide la propagación de la peroxidación lipídica. Durante los procesos metabólicos se producen constantemente radicales libres tóxicos, y la vitamina E es capaz de captar estos compuestos y metabolizarlos, por lo que protege las membranas celulares. Estructuralmente son compuestos de naturaleza fenólica.

Esta vitamina existe de cuatro formas (tocoferoles): α , β , γ , δ (Figura 2). El α -tocoferol es la que posee mayor actividad vitamínica. Los tocoferoles se caracterizan por un sistema de anillo sustituido hidroxilado (anillo de cromanol) con una cadena lateral saturada (fitilo) de largo.

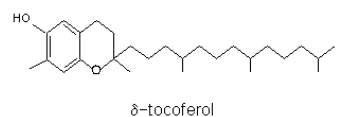
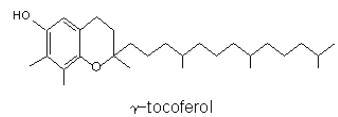
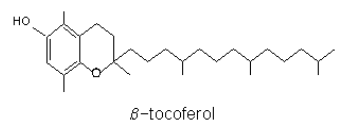
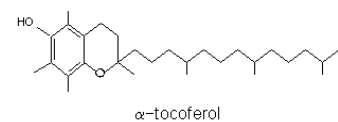


Figura 2. Estructura química de los cuatro tocoferoles de la vitamina E.

La vitamina E es un antioxidante que rompe la cadena que evita la propagación de reacciones de radicales libres (Packer, 1994). La vitamina es un eliminador de radicales peroxilo y protege especialmente ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) dentro de los fosfolípidos de membrana y en las lipoproteínas del plasma (Burton et al., 1983). Los radicales peroxilo (abreviado ROO^{\cdot}) reaccionan con vitamina E (abreviado Vit

E-OH) 1.000 veces más rápido que con los PUFA (abreviado RH) (Packer, 1994). El grupo hidroxilo fenólico de tocoferol reacciona con un radical peroxilo orgánico para formar el hidroperóxido orgánico correspondiente y el radical tocoferoxilo (Vit EO^{\cdot}) (Burton et al., 1985).

El radical tocoferoxilo puede luego someterse a varios destinos posibles, (1) puede ser reducido por otros antioxidantes para tocoferol, (2) puede reaccionar con otro radical tocoferoxilo para formar productos no reactivos tales como dímeros de tocoferol, (3) puede someterse a la posterior oxidación a quinona tocoferilo, y (4) puede actuar como un prooxidante y oxidar otros lípidos.

Cuando la vitamina E intercepta un radical, se forma un radical tocoferoxilo (Burton y Ingold, 1981). Este radical puede ser reducido por el ácido ascórbico u otros agentes reductores (Doba et al., 1985), oxidando así el último y la vitamina E regresa a su estado reducido.

El α -tocoferol se absorbe a nivel intestinal en presencia de sales biliares y lípidos. La cantidad absorbida puede ser variable dependiendo de la dieta. La mayoría de vitamina E de la dieta se encuentra en alimentos que contienen grasa. Está claro que la absorción de vitamina E requiere formación de micelas y la secreción de quilomicrones por el intestino (Muller et al., 1974), aunque no se ha informado de la cantidad óptima de grasa para mejorar la absorción de vitamina E.

La deficiencia de vitamina E es muy rara, visto sólo en personas que no pueden absorber la vitamina o con anomalías hereditarias que impiden el mantenimiento de las concentraciones sanguíneas normales. Su deficiencia no es habitual porque es una vitamina ampliamente distribuida en los alimentos (aceite de oliva, girasol, frutos secos, germen de trigo, verduras, yema de huevo). Los trastornos por deficiencia de esta vitamina aparecen a largo plazo y suelen ser problemas neurológicos y hemolíticos. La carencia es grave sobre todo en niños y prematuros, en los que se manifiesta como fragilidad capilar.

La dosis diaria recomendada para los hombres y mujeres es de 15 mg/día de α -tocoferol (Krinsky, 2000). Hay estudios que parecen demostrar una relación entre el consumo elevado de vitamina E y la baja incidencia del cáncer de colon y mama, y también de las enfermedades cardiovasculares.

MINERALES

Los minerales son nutrientes que el organismo humano precisa en cantidades relativamente pequeñas respecto a glúcidos, lípidos y proteínas; por ello, al igual que las vitaminas, se consideran micronutrientes. Son sustancias con una importante función reguladora, que no pueden ser sintetizados por el organismo y deben ser aportados por la dieta. Los minerales que tienen función antioxidante son el selenio y el cobre (Kuklinski, 2003).

Selenio

El selenio (Se) tiene propiedades antioxidantes en el organismo, ya que protege a los tejidos corporales de la oxidación. Es un elemento esencial para la formación de la glutatión peroxidasa, que interviene en el sistema glutatión del organismo, encargado de la eliminación de las sustancias oxidantes y radicales que genera el metabolismo (Kuklinski, 2003). Se ha comprobado que tener niveles adecuados de este mineral protege frente a infecciones y determinadas patologías. Las funciones biológicas de selenio incluyen la defensa contra el estrés oxidativo, la regulación de la acción de la hormona tiroidea, y la regulación del estado redox de la vitamina C y otras moléculas.

La absorción de selenio es eficiente y no está regulado. Son fuentes de selenio el pescado, carne, setas, coles, cebollas, levadura de cerveza, pan, cereales y ajos. La dosis diaria recomendada para los hombres y mujeres es de 55 µg/día. Las principales formas de selenio en la dieta son altamente biodisponibles (Krinsky, 2000).

Cobre

El cobre (Cu) en el organismo se halla frecuentemente asociado a hierro y zinc. Interviene en la formación de glóbulos rojos y contribuye al transporte y almacenamiento del hierro. Interviene en el funcionamiento del sistema cardiovascular, del sistema esquelético y del sistema nervioso. Es importante también en la formación de colágeno y la melanina (Kuklinski, 2003). En el organismo actúa también como antioxidante, antiinflamatorio y forma parte de numerosos enzimas. Su absorción se produce en el estómago y en el duodeno. Son fuentes de cobre el marisco, hígado, girasol, nueces, fruta, legumbres y cacao. La recomendación diaria aconsejada (RDA) para un adulto es de 2 mg.

COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos en los alimentos se originan a partir de una de las principales clases de metabolitos secundarios en las plantas (Van Sumere, 1989), estos son sintetizados por las plantas durante su desarrollo, como respuesta a diversas condiciones adversas como infecciones, heridas, radiaciones, etc. (Dixon y Paiva, 1995).

Químicamente, los compuestos fenólicos pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático que lleva uno o más sustituyentes hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales. Existen aproximadamente 8000 compuestos naturales conocidos hasta ahora, los cuales se caracterizan por tener como mínimo un anillo fenólico en su estructura molecular. Muchos de los compuestos fenólicos de alimentos son solubles en agua o en disolventes orgánicos. La mayoría de las plantas, si no todas, contienen polifenoles que las diferencian entre sí.

Los compuestos fenólicos son esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y también actúan como antipatógenos (Butler, 1992). Su contribución a la pigmentación de los alimentos de origen vegetal también es bien reconocida. Plantas lesionadas pueden secretar compuestos fenólicos para defenderlos contra los patógenos (Shahidi y Naczki, 1995).

Muchas de las propiedades de los productos vegetales se asocian con la presencia y el contenido de sus compuestos polifenólicos. La astringencia de los alimentos (Clifford, 1992) o los efectos beneficiosos relacionados con la salud de ciertos compuestos fenólicos (Mergens, 1992) son de importancia para los consumidores. Además, las antocianinas polifenólicas son responsables del naranja, rojo, azul, color violeta y púrpura de la mayoría de las especies de plantas y sus productos.

Muchos alimentos de origen vegetal contienen polifenol oxidasa que catalizan reacciones con fenoles en presencia de oxígeno molecular (McEvily et al., 1992). La oxidación inicial de fenoles a quinonas seguido por la formación de pigmentos coloreados resulta en el pardeamiento enzimático de los productos. En la mayoría de los casos, el pardeamiento enzimático no es deseable, por lo que su inhibición se consigue gracias a cambios en el pH,

temperatura o mediante la aplicación de procedimientos que inhiben las enzimas, sustratos o sus productos de reacción (Shahidi y Naczk, 1995).

La presencia de compuestos fenólicos en los alimentos puede tener un efecto importante en la estabilidad a la oxidación y la seguridad microbiana de los productos. Además, muchos compuestos fenólicos en alimentos poseen una actividad biológica importante en relación con sus efectos inhibitorios sobre metagénesis y la carcinogénesis. Muchos alimentos de origen vegetal como los cereales, las semillas oleaginosas, legumbres, así como hierbas, especias y el té contienen polifenoles con actividad antioxidante potente (Shahidi y Wanasundara, 1992). Por lo tanto, se ha suscitado un interés cada vez mayor en la extracción y el uso de antioxidantes a partir de fuentes naturales.

Los compuestos fenólicos se dividen en dos grandes grupos, flavonoides y no flavonoides.

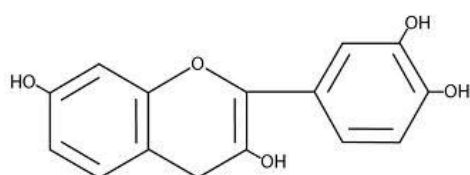


Figura 3. Estructura química de los flavonoides.

Con el término **flavonoide** se identifica de forma genérica a compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura química basada en un esqueleto C6-C3-C6 (Figura 3).

Los flavonoides generalmente se encuentran unidos a moléculas de azúcar. Suelen encontrarse también parcialmente polimerizados dando lugar a dímeros, trímeros, etc., hasta formar complejos como los taninos condensados. Estos compuestos se encuentran de manera natural en los vegetales. En general el sabor que aportan a los alimentos suele ser amargo llegando incluso a provocar sensaciones de astringencia dependiendo de lo condensados que sean los taninos. El sabor puede variar en función de las sustituciones presentadas en el esqueleto pudiéndose usar como edulcorantes cientos de veces más dulces que la glucosa (Odrizola, 2009). Los flavonoides comprenden varios miles de compuestos y se dividen en flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianos, isoflavonas y flavanoles.

Entre los *flavonoles* destacan compuestos como kaempferol, quercitina y miricetina. Las fresas se caracterizan por poseer altos contenidos en flavonoles; no obstante su

concentración depende de varios factores como la variedad, las condiciones de crecimiento del fruto, el origen geográfico o la época de cosecha entre otros (Odriozola, 2009).

Dentro del grupo de *antocianos*, se encuentran las antocianinas, formas glucosídicas de las antocianidinas. Estos compuestos son pigmentos naturales que se encuentran en frutas y dan tonalidades de rojizas a azuladas, según el pH del medio. Pelargonidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido y pelargonidina-3-rutinósido son las principales antocianinas presentes en las fresas, siendo responsables de su color rojo.

Casi 200 antocianinas diferentes se han identificado en plantas. De éstas, aproximadamente 70 han sido halladas en frutas. La composición y el contenido de antocianinas permiten la diferenciación entre distintas frutas y sus variedades (Macheix et al., 1989).

El contenido de antocianinas en las frutas también se ve afectado por la intensidad y la calidad de la luz. La formación de antocianinas también es estimulada por la presencia de fructosa, glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa (Vestheim, 1970). Por otro lado, el abonado de la planta con un exceso de nitrógeno reduce el nivel de antocianinas en los frutos (Macheix et al, 1989).

Dentro del grupo de compuestos fenólicos flavonoides, las flavonas, flavanonas, isoflavonas y flavanoles no suelen encontrarse en fresas. Las *flavonas* más importantes son apigenina y luteolina, halladas principalmente en apio, olivas y plantas aromáticas. Las *flavanonas* son responsables del amargor de los cítricos, siendo hesperetina y naringenina los principales compuestos. Las *isoflavonas* se encuentran principalmente en granos de soja y derivados y las más comunes son genisteína y daidzeína. Por último *flavanoles* como catequina y epicatequina se encuentran en vinos, chocolate y té (Odriozola, 2009).

Dentro del grupo de los **no flavonoides** se encuentran los ácidos fenólicos y los estilbenos. Los *ácidos fenólicos* son compuestos no flavonoides ampliamente estudiados y se caracterizan por tener un grupo carboxílico funcional (Macheix et al., 1990). Los ácidos fenólicos forman un grupo diverso que incluyen los derivados de ácido hidroxibenzoico (ácido *p*-hidroxibenzoico, elágico y gálico) y del ácido hidroxicinámico (ácido *p*-cumárico,

cafeico y ferúlico). Las fresas son una fuente importante de ácido elágico, y además poseen un alto contenido en ácidos *p*-cumárico y *p*-hidroxibenzoico. Del grupo de los *estilbenos*, el compuesto más estudiado es el resveratrol, fitoalexina con carácter antiinflamatorio, protector cardiovascular y que participa en la profilaxis del cáncer.

1.4 ESTRÉS OXIDATIVO

La mayoría de compuestos bioactivos, como la vitamina C o los compuestos fenólicos, poseen una marcada capacidad antioxidante que se pone de manifiesto en su capacidad de atrapar radicales de oxígeno, de nitrógeno y radicales orgánicos (Odriozola, 2009).

Un radical libre es una especie química definida que tiene en su estructura uno o más electrones desapareados, lo que lo convierte en un compuestos muy inestable, altamente reactivo con gran capacidad de formar otros radicales libres y dañar estructuras celulares (Kaur y Kapoor, 2001). Estos compuestos buscan aparear los electrones desapareados con el fin de estabilizarse por lo que, cuando la molécula que ha sido atacada ha perdido un electrón, se convierte en un radical libre, generándose así una reacción en cadena en la cual se forman más radicales libres o se forman otras sustancias tóxicas. Generalmente los radicales libres atacan las moléculas estables más cercanas.

Los radicales libres se generan de forma natural durante el metabolismo por medio de la reducción parcial de la molécula de oxígeno, formándose así especies reactivas como hidropéroxido (H_2O_2), superóxido ($O_2^{\cdot -}$), hidroperoxilo ($HO_2^{\cdot -}$) e hidroxilo ($OH^{\cdot -}$), entre otras. La producción puede incrementarse frente a diferentes estados de estrés fisiológico. Concentraciones elevadas de dichas especies pueden provocar daños en la mayoría de constituyentes celulares. Los radicales libres son capaces de dañar de forma reversible o irreversible todo tipo de compuestos bioquímicos. La acumulación de estas especies provoca la aparición de daños oxidativos en el ADN, así como en las proteínas y los lípidos de las membranas celulares (peroxidación de lípidos), acontecimientos íntimamente relacionados con los procesos de envejecimiento de tejidos y la aparición de enfermedades degenerativas (Ames, et al. 1993). Los radicales libres y otros compuestos de oxígeno altamente reactivos se cree que contribuyen a causar una amplia variedad de enfermedades,

especialmente enfermedades crónicas relacionadas con la edad, tales como cáncer, Alzheimer, Parkinson, cataratas y arteriosclerosis, entre otras (Odrizola, 2009).

1.5 PROCESADO Y CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS

En la mayoría de los casos, las operaciones culinarias domésticas o los tratamientos tecnológicos industriales aplicados a los productos alimentarios se traducen por efectos favorables sobre la calidad, trátase del valor alimentario o de la calidad higiénica. Algunos tratamientos, como la cocción, permiten destruir microorganismos peligrosos, inactivar ciertos compuestos tóxicos o incluso inhibir enzimas capaces de provocar reacciones desfavorables en particular sobre el color o el gusto. Al margen de los tratamientos térmicos, existen en la actualidad un gran número de tratamientos susceptibles de ser aplicados a nuestros alimentos. Las tecnologías aplicadas permiten obtener una variedad muy grande de alimentos de buena calidad higiénica, nutricional y organoléptica (Cuq, 1997).

Los procedimientos de conservación tienen como finalidad el control de la evolución de las diversas reacciones de deterioro susceptibles de alterar las cualidades higiénicas, organolépticas, funcionales y nutricionales de los alimentos. Los diversos agentes y los mecanismos de deterioro son diversos, comprendiendo agentes físicos (hielo, calor, humedad...), el ataque de insectos, de roedores o de otros animales, alteraciones microbianas, la acción de enzimas (lipólisis y pardeamiento enzimático) o reacciones químicas de diversa naturaleza (hidrólisis, oxidaciones, pardeamiento no enzimático) (Cuq, 1997).

Los procedimientos de conservación de los alimentos se basan en la utilización de uno o varios de los factores siguientes: temperaturas elevadas, temperaturas bajas, actividad del agua, pH, potencial de óxido-reducción, compuestos inhibidores específicos, fermentaciones y microbiota competitiva, radiaciones, compuestos barrera o envases, entre otras (Cuq, 1997).

Procesado de los alimentos

Los alimentos se modifican y alteran, tanto durante su preparación como posteriormente durante su acondicionamiento, transporte y almacenado. Algunos de estos cambios se producen de forma espontánea y otros son inducidos por tratamientos tecnológicos y culinarios (Kuklinski, 2003).

Hemos de diferenciar entre una modificación, que en principio es un cambio favorable para el alimento, y la alteración, que se considera desfavorable para el alimento. Estos cambios dependen de factores, tanto intrínsecos como extrínsecos.

Conservación de los alimentos

Los principales objetivos de los métodos de conservación de los alimentos son retrasar la alteración y alargar la vida de los alimentos transformándolos en menos perecederos; mantener las máximas cualidades sensoriales y nutritivas de los alimentos; obtener productos más adecuados para su posterior manipulación, transporte y almacenamiento; evitar problemas de salud pública como intoxicaciones, contaminaciones, etc. (Kuklinski, 2003).

Los métodos de conservación se pueden clasificar en métodos físicos, químicos y bioquímicos. Los métodos físicos comprenden el procesado/almacenamiento a bajas temperaturas (refrigeración y congelación) o el empleo de tratamientos térmicos (pasteurización, esterilización, UHT, etc.), deshidratación, irradiación, atmósferas modificadas, altas presiones y pulsos eléctricos. Los métodos químicos comprenden la salazón, el curado, el empleo de soluciones azucaradas, la acidificación, el ahumado y la adición de otras sustancias inhibidoras. Por último, entre los métodos de naturaleza bioquímica está la fermentación.

Efecto del procesado

El uso de técnicas inadecuadas en el procesado de las frutas puede provocar una disminución en su contenido de vitaminas y antioxidantes.

Las vitaminas son en general muy sensibles a los tratamientos tecnológicos y culinarios de los alimentos, por lo que son generalmente lábiles, aunque ello depende de las condiciones

y del tipo de vitamina. Generalmente, las vitaminas hidrosolubles son bastante sensibles, más que las vitaminas liposolubles. Las vitaminas hidrosolubles son sensibles a la temperatura, a cambios de pH, al oxígeno y a la luz. Al ser hidrosolubles, se pierde una parte de vitaminas durante el proceso de lavado de los alimentos (pérdidas por lixiviados) y una gran parte al someter los alimentos a cocción (Kuklinski, 2003).

De todas las vitaminas, la más inestable es la vitamina C, ya que se pierde en gran cantidad en los lixiviados (aguas de lavado, de cocción, etc.) y su principal vía degradativa es la oxidación, que puede llevarse a cabo por dos vías, enzimática y no enzimática. La vitamina E es estable frente a tratamientos térmicos, pero sensible al oxígeno y a la luz.

Los minerales son resistentes a tratamientos tecnológicos y culinarios. No les afecta la luz y el calor, pero se pueden perder en los lixiviados, en las aguas de cocción, retenidos en la fibra que no se absorbe, etc. Hay alimentos que contienen sustancias que actúan como antinutrientes e impiden la asimilación de los minerales porque forman con ellos complejos, como por ejemplo el ácido fítico presente en muchos vegetales, que es capaz de quelar los minerales e impedir su absorción.

Los compuestos fenólicos son sustancias muy inestables a tratamientos térmicos. Sufren fácilmente oxidación enzimática por acción de enzimas polifenoloxidasas (PFO), y dan colores pardos en un proceso denominado pardeamiento enzimático (Kuklinski, 2003). Los polifenoles también pueden formar quelatos con metales y dar lugar a coloraciones extrañas y cambiar el color en función del pH, por ejemplo durante la maduración de frutas.

La presencia de ácido ascórbico acelera la degradación de las antocianinas en la fresa (Garzón y Wrolstad, 2002). Incrementos de temperatura resultan en pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras (Timberlake, 1980). El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, básicamente 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio (AH⁺) de color rojo

intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemiacetal (B) y la forma chalcona (C), o de cadena abierta. Tanto el hemiacetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a siete se presentan las formas quinoidales de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Hutchings, 1999).

1.6 PROCESADO MÍNIMO DE PRODUCTOS VEGETALES

El cambio en los hábitos de consumo en la población ha tenido como resultado que los consumidores demanden alimentos naturales, de apariencia y valor nutricional semejantes a los productos frescos, sin aditivos sintéticos, microbiológicamente seguros y que, además, sean fáciles de preparar y de consumir. Por tanto, la industria, consciente de la importancia que tiene satisfacer estas exigencias para mantener y aumentar el número de sus clientes, intenta mejorar de forma continua sus procesos productivos y busca alternativas tecnológicas a los tratamientos tradicionales. Una respuesta a la demanda de este tipo de productos son las frutas y verduras mínimamente procesadas, que abren un nuevo mercado como producto preparado y listo para su consumo. El procesado mínimo consiste en la aplicación de una serie de tecnologías que, combinadas o no, mantengan las características de los alimentos lo más cercanas posibles a las del producto fresco y que aumenten su vida útil, en términos microbiológicos, sensoriales y nutricionales (Odriozola, 2009).

Productos de cuarta gama

Las frutas y hortalizas de cuarta gama son productos crudos y frescos, envasados en embalajes de uso doméstico o colectivo, preparados para el empleo, y que han sido sometidos a una o más preparaciones tales como pelado, corte u otras, preparaciones que afectan a su integridad inicial (Wiley, 1997). Son generalmente envasados en un embalaje de material plástico (polietileno, polipropileno, etc) que sirve de compartimiento a una atmósfera modificada, de forma natural o no, y conservados a la temperatura de refrigeración óptima del vegetal. La duración límite de conservación es próxima a una semana (Leynaud-Rouaud et al. 1997).

Estos productos de cuarta gama deben ser reglamentariamente conservados a temperaturas inferiores a 8°C. Para asegurar la mejor estabilidad microbiológica, está autorizada la desinfección con hipoclorito a la cantidad máxima de 120 ppm. La adición de ácido ascórbico y/o cítrico es en ocasiones tolerada para productos sensibles al pardeamiento enzimático. El embalaje en atmósfera modificada permite mejorar la duración de conservación de cuarta gama.

Para cada producto los contenidos en gas carbónico (CO₂) y oxígeno (O₂) se ajustan para inhibir o ralentizar algunas reacciones ligadas a los fenómenos respiratorios, de senescencia y reblandecimiento. El corte de las frutas acelera su respiración y, para reducir su intensidad, el contenido en oxígeno se disminuye por debajo del 8% y el del CO₂ se aumenta alrededor del 1%. Cuando una fruta es envasada, su respiración conduce a un aumento natural del contenido en CO₂ y a una disminución del oxígeno. La composición de la atmósfera en el embalaje resulta de la intensidad respiratoria de la fruta y de la velocidad de difusión de los gases a través del material de embalaje. La inyección de una mezcla gaseosa en el momento del envasado impone una composición inicial cuyas variaciones en función de la fruta, de la temperatura, del tiempo y de la naturaleza del film del envase son óptimas. El embalaje en atmósfera modificada con productos de cuarta gama va siempre acompañado de una humedad relativa muy elevada, lo que limita la deshidratación pero favorece la proliferación de microorganismos como bacterias, levaduras y mohos (Leynaud-Rouaud et al. 1997).

Los efectos de estas atmósferas modificadas sobre los productos de cuarta gama son idénticos a los observados en las frutas conservadas bajo atmósferas controladas siendo ésta última tecnología empleada principalmente para largos periodos de conservación de frutas enteras en almacenes industriales.

La facilidad de preparación ligada a las modificaciones recientes de nuestros hábitos alimentarios, caracterizados en particular por la disminución del tiempo de preparación de nuestras comidas, y la frescura aparente de los productos de cuarta gama han contribuido a su éxito. No obstante, dichos productos pueden entrañar riesgos potencialmente graves para la seguridad alimentaria a causa de la posible incidencia de microorganismos

patógenos de transmisión alimentaria que hayan podido contaminar la fruta en campo a causa de una incorrecta manipulación en pre-cosecha o durante su recolección, o bien posteriormente, durante su almacenamiento en post-cosecha y posterior procesado.

1.7 TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS CON LUZ PULSADA

La aparición de productos mínimamente procesados está asociada a cambios en los hábitos de consumo. Son productos que presentan un valor añadido y una alta calidad nutritiva y sensorial, que generalmente se consumen crudos y con un tratamiento muy liviano. Por este motivo, resulta imprescindible conocer el efecto de las distintas tecnologías de conservación en su calidad (Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2003).

Los mayores avances en este campo se han conseguido con el desarrollo de sistemas físicos, que afectan la viabilidad de los microorganismos, sin un incremento sustancial de la temperatura del alimento. Estos métodos no térmicos no afectan, o lo hacen mínimamente a las características nutritivas y sensoriales de los alimentos. Entre las tecnologías de esta naturaleza se encuentran las altas presiones, ultrasonidos, irradiación, así como los pulsos de campos eléctricos de alta intensidad, campos magnéticos oscilantes y los pulsos de luz (Herrero, et al. 2006).

Los pulsos de luz son una tecnología no térmica que implica el uso de pulsos lumínicos intensos de corta duración y un amplio espectro para garantizar la inactivación microbiana en superficies de alimentos, equipos y envases de alimentos. Se considera una alternativa a los tratamientos con luz ultravioleta para los alimentos sólidos y líquidos (Oms-Oliu, 2009).

Los pulsos de luz son producidos utilizando tecnologías que multiplican la potencia radiante varias veces. La potencia se magnifica por la acumulación de energía eléctrica en un condensador que almacena energía por tiempos relativamente largos (fracciones de segundo). Esta energía almacenada se utiliza para realizar el trabajo en tiempos mucho más cortos (millonésimas o milésimas de segundo). El resultado es una potencia elevada durante el ciclo de trabajo, con un gasto moderado en el consumo de energía (Dunn, 1996).

Los pulsos de luz utilizan rayos de luz de corta duración en el espectro amplio de luz blanca para matar un amplio número de microorganismos incluyendo esporas y hongos. Cada pulso de luz dura solamente unas millonésimas de segundo y tiene una energía de 0.8 Joules/cm². La intensidad de la luz emitida es de unas 200.000 veces la intensidad de la luz de la superficie terrestre (Dunn, 1996). Los pulsos de luz pueden proporcionar una ampliación de la vida útil de una gran variedad de alimentos.

La utilización de pulsos de luz es una alternativa para los tratamientos de alimentos que requieren una rápida desinfección. Otra ventaja de su aplicación es la ausencia de compuestos residuales y de productos químicos desinfectantes y conservantes. Los alimentos con superficies lisas, como las frutas frescas enteras, son adecuados para el tratamiento con pulsos de luz donde la contaminación de la superficie es una preocupación de contaminación microbiana. Sin embargo, en la actualidad, hay pocas empresas comerciales que utilicen sistemas de desinfección basados en los pulsos de luz. Esta tecnología puede ser utilizada en los pasos finales del procesado mínimo de los productos vegetales (Oms-Oliu, 2009).

Los pulsos de luz reducen significativamente los microorganismos en un tratamiento de tiempo muy corto, siendo el coste limitado de energía, la no generación de compuestos residuales y su gran flexibilidad algunas de sus principales ventajas. Este método es claramente eficaz para inactivar microorganismos pero su potencial en alimentos todavía se está investigando y es preciso evaluar sus efectos en las propiedades de los alimentos más allá de los aspectos relativos a su seguridad.

2. HIPÓTESIS

Las frutas de cuarta gama son productos mínimamente procesados obtenidos mediante una manipulación extremadamente liviana. La utilización de disoluciones con cloro para su higienización es habitual por parte de la industria. Dicho tratamiento tiene como objetivo garantizar la seguridad del consumidor. No obstante, en contacto con la materia orgánica el cloro libre tiene la capacidad de formar aductos aminados potencialmente tóxicos, por lo que la industria busca alternativas a este método de descontaminación.

Actualmente, los tratamientos con luz pulsada son una alternativa viable para descontaminar productos de origen vegetal, pero se sabe que la exposición a la luz de estos productos puede provocar alteraciones en su contenido antioxidante, por lo que es preciso evaluar el efecto de estos tratamientos sobre las propiedades antioxidantes de los productos de origen vegetal. En el caso de los productos mínimamente procesados a base de frutas, este aspecto es fundamental para conocer el potencial de la aplicación de esta tecnología de procesado. A nivel antimicrobiano, se conoce que los tratamientos con pulsos de luz intensa tienen un efecto marcadamente superficial, perdiendo su efecto en las capas internas del alimento tratado.

Por ello, este trabajo de fin de grado se propone verificar que los tratamientos con luz pulsada son una alternativa no térmica aplicable a la descontaminación de frutas de cuarta gama que no alteran su contenido en componentes fenólicos, así como su potencial antioxidante global.

3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Con la realización de este trabajo de fin de grado se pretende estudiar los compuestos bioactivos presentes en fresas tratadas mediante procesado no térmico (pulsos de luz). Los compuestos bioactivos que se van a estudiar son compuestos fenólicos, totales y antocianinas; también se determinará la capacidad antioxidante de los mismos. Con esta finalidad se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Optimizar la obtención de extractos metanólicos de fresa para el posterior análisis de compuestos antioxidantes.
- Optimizar y comparar métodos para la determinación de compuestos fenólicos en muestras de fresa.
- Evaluar el efecto de la aplicación de tratamientos antioxidantes y luz pulsada sobre la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de fresa mínimamente procesada.

4. METODOLOGÍA

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras seleccionadas se dividieron en dos grupos, uno sometido a un tratamiento con agentes antioxidantes y otro no tratado. El procedimiento seguido para la preparación de las muestras sometidas a un tratamiento con agentes antioxidantes fue cortar, lavar con agua e hipoclorito sódico, sumergir en solución de L-ácido ascórbico (10 g/L) y lactado cálcico pentahidratado (35.3 g/L), y finalmente secar. En las muestras no tratadas se llevo a cabo el mismo procedimiento y se omitió la inmersión de las muestras en la solución con agentes antioxidantes (L-ácido ascórbico y lactado cálcico pentahidratado).

A continuación, se colocaron partes alícuotas de 50 g de fresa cortada en bandejas de polipropileno, y se sometieron a diferentes tratamientos de pulsos de luz.

Los tratamientos aplicados fueron de 10, 20, 30 y 40 pulsos de luz de una intensidad de 0,8 J/cm². Finalmente, las bandejas se sellaron mediante una termoselladora y se almacenaron en refrigeración a 4°C durante un máximo de 14 días. Periódicamente se retiraron dos réplicas de cada tratamiento para su inmediata congelación, liofilización y posterior análisis.

El proceso de liofilización preserva de forma prácticamente total las características del alimento (Kuklinski, 2003). La liofilización o criodesecación es un tipo de secado, que pertenece a los tratamientos de deshidratación. Es el método que permite eliminar mayor cantidad de agua, ya que suelen quedar a_w del orden de 0,2-0,3. Consiste en someter el alimento a un proceso de congelación, después se realiza un proceso de sublimación de agua (el agua sólida pasa directamente a agua gas) y el vapor de agua obtenido se condensa.

El extracto de fresa utilizado para realizar estas determinaciones se obtuvo a partir de una homogenización de 15 g de fresa y 30 ml de metanol al 80%. Después, se centrifugó a 12500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, se filtró y se obtuvo el extracto de fresa.

DETERMINACIONES ANALÍTICAS

En primer lugar, antes de realizar las determinaciones analíticas, se realizó una optimización de los diferentes métodos. Durante dicha optimización se realizaron pruebas con diferentes parámetros, tales como la cantidad de muestra utilizada, el tiempo de centrifugación, la utilización de metanol para la obtención de extractos, la cantidad de metanol utilizada, el tiempo de incubación de las muestras y la longitud de onda utilizada para la lectura espectrofotométrica.

Cuando se concretaron los parámetros que se iban a utilizar en cada una de las determinaciones analíticas se llevaron a cabo las determinaciones en las muestras sometidas a los distintos tratamientos con pulsos de luz descritos anteriormente.

Capacidad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó por el método del secuestro del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) según lo descrito por Brand-Williams et al. (1995). Primero, se homogenizaron 15g de muestra con 30 ml de metanol al 80% y se centrifugaron a 12500 rpm durante 15 minutos a 4°C. A continuación, se filtró y se mezcló 0.010 ml del extracto obtenido con 3.9 ml de una solución metanólica de DPPH y 0.090 ml de agua. Después de 30 minutos en la oscuridad, se midió la absorbancia mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm. El porcentaje de inhibición con respecto a la absorbancia inicial obtenida por la solución metanólica de DPPH se expresó como μ moles equivalentes de Trolox por kg de muestra. Para ello, empleó una ecuación de regresión obtenida a partir de distintas disoluciones de Trolox y relacionándolas con el porcentaje de inhibición obtenido de radical DPPH.

Compuestos fenólicos totales

En alimentos y bebidas, el contenido fenólico total se determina actualmente con el método de Folin-Ciocalteu (Folin y Ciocalteu, 1927).

La determinación de compuestos fenólicos totales se llevó a cabo mediante dos métodos diferentes, en primer lugar, el método de Folin-Ciocalteu, y en segundo lugar, el ensayo del reactivo de Fast Blue BB.

Método de Folin-Ciocalteu (F-C)

El método de Folin-Ciocalteu (F-C) es un ensayo utilizado regularmente para predecir total de compuestos fenólicos en fresa, así como en una gran variedad de otras frutas y verduras (Prior et al., 2005). El método de F-C espectrofotométrico original creado fue desarrollado por Folin y Ciocalteu (1927) y más tarde fue modificado por Singleton y Rossi (1965). El método F-C modificado utiliza el heteropolianión molibdotungstosfosfórico, específico para la reducción los compuestos fenólicos. No obstante, el reactivo ha demostrado interferir con otros compuestos de naturaleza reductora. Según Prior et al. (2005), el ensayo adolece de interferir con una serie de sustancias, en particular, el ácido ascórbico, azúcares (fructosa y sacarosa), aminas aromáticas, dióxido de azufre, ácidos orgánicos, y Fe (II), por lo tanto, la corrección de estas sustancias que interfieren es esencial. La lista de sustancias interferentes no termina con lo anterior, sino que puede incluir por lo menos 50 compuestos orgánicos adicionales que se encuentran naturalmente en frutas y verduras o en el medio de extracción de polifenoles (Prior et al., 2005). Cuando se utiliza el método de Folin-Ciocalteu los pasos en el análisis deben seguir rigurosamente el ensayo modificado de Singleton y Rossi (1965), la corrección tiene que ser la adecuada debido a las sustancias que interfieren, y debe utilizarse ácido gálico como estándar de referencia.

Esta determinación de fenoles totales se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Singleton (1999). En primer lugar, se mezclaron 0.25 ml del extracto de fresa, 10 ml de agua y 0.25 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu; pasado un minuto se añadieron 8 ml de una solución de carbonato sódico al 7.5% y agua hasta un volumen de 25 ml. Después de una hora a temperatura ambiente en la oscuridad se realizó la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 760 nm. La concentración de fenoles totales de las muestras se obtuvo mediante comparación con una recta de calibrado preparada con disoluciones de concentración creciente de ácido gálico. Los valores obtenidos mediante la recta de calibrado se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico en 100 g de muestra.

Ensayo del reactivo Fast Blue BB (FBBB)

El ensayo del reactivo Fast Blue BB (Medina, 2011) es un nuevo método para la detección de compuestos fenólicos. Este método se basa en las interacciones directas de compuestos fenólicos con la sal de diazonio Fast Blue BB en el pH alcalino, formando complejos

azoicos, con la absorbancia medida a 420 nm después de 60 min. Este método es sencillo y barato y se puede utilizar para evaluar rápidamente los fenoles totales de alimentos y bebidas.

Esta determinación de fenoles totales se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Medina (2011). Primero, se mezclaron 1 ml del extracto de fresa y 19 ml de agua. A continuación, se tomaron 4 ml de la mezcla anterior y se añadieron 0.4 ml del reactivo FBBB [cloruro hemi (-zinc cloruro) de 4-benzoilamino-2.5-dimetoxibenzendiazonio] al 0.1%, se agitó durante 30 segundos y se añadieron 0.4 ml de NaOH. Después de noventa minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, se midió la absorbancia a 420 nm. Las concentraciones de fenoles totales de las muestras se obtuvieron mediante comparación con las rectas de calibrado con ácido gálico. Para ello, se construyó la curva de calibrado de seis niveles con $R^2 = 0.9988$. Los valores obtenidos mediante la recta de calibrado con ácido gálico se expresan en mg de ácido gálico en 100 g de muestra.

Antocianinas totales

El contenido en antocianinas totales de las fresas se determinó mediante el método espectrofotométrico propuesto por Meyers et al. (2003). Primero, se homogenizaron 15 g de muestra con 30 ml de metanol al 80% y se centrifugaron a 12500 rpm durante 15 minutos a 4°C. A continuación, se filtró y se colocaron 5 ml del extracto obtenido en dos matraces aforados de 50 ml, uno de ellos se enrasó con cloruro potasio 0.025M a pH 1 y el otro con acetato de sodio 0.4 M a pH 4.5. La absorbancia de cada una de las mezclas se determinó con un espectrofotómetro a 510 y 700 nm. El contenido en antocianinas se calculó a partir de la Ecuación 1,

$$TA = [[(A_{510} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5}] \times PM \times DF \times 1000] / \epsilon \times L \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

PM: peso molecular de la pelargonidina-3-glucósido (433.0 g/mol)

DF: factor de dilución

ϵ : coeficiente de extinción (22400 L/molxcm)

L: longitud de la cubeta en cm (1cm)

Los resultados obtenidos en la determinación de las antocianinas totales se expresan en mg antocianinas/Kg de muestra.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Después de realizar las determinaciones analíticas de la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos totales y antocianinas totales se llevó a cabo un análisis estadístico.

Para ello se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los datos obtenidos que se llevo a cabo mediante el programa Statgraphics Plus 5.1. A su vez se llevaron a cabo pruebas de rango múltiple para identificar diferencias significativas entre los valores obtenidos siguiendo el criterio de la mínima diferencia significativa (LSD).

5. RESULTADOS

5.1 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los valores de capacidad antioxidante de las muestras de fresa cortada tratadas con pulsos de luz pueden observarse en los gráficos 1A y 1B. El gráfico 1A muestra los valores de actividad antioxidante de fresa cortada sometida a un tratamiento antioxidante previo a su envasado, mientras que el gráfico 1B muestra los valores de muestras no sometidas al tratamiento con antioxidantes. Los resultados obtenidos se expresan en μmoles equivalentes de Trolox/Kg de muestra.

En el gráfico 1A se puede observar que el día en que se realizan los distintos tratamientos con luz pulsada los valores obtenidos de capacidad antioxidante de las distintas muestras son similares. A lo largo del tiempo se produce un ligero aumento de los valores de capacidad antioxidante en las muestras. Además, no se pueden observar diferencias en los distintos tratamientos con pulsos de luz, ni en el mismo día ni a lo largo del tiempo.

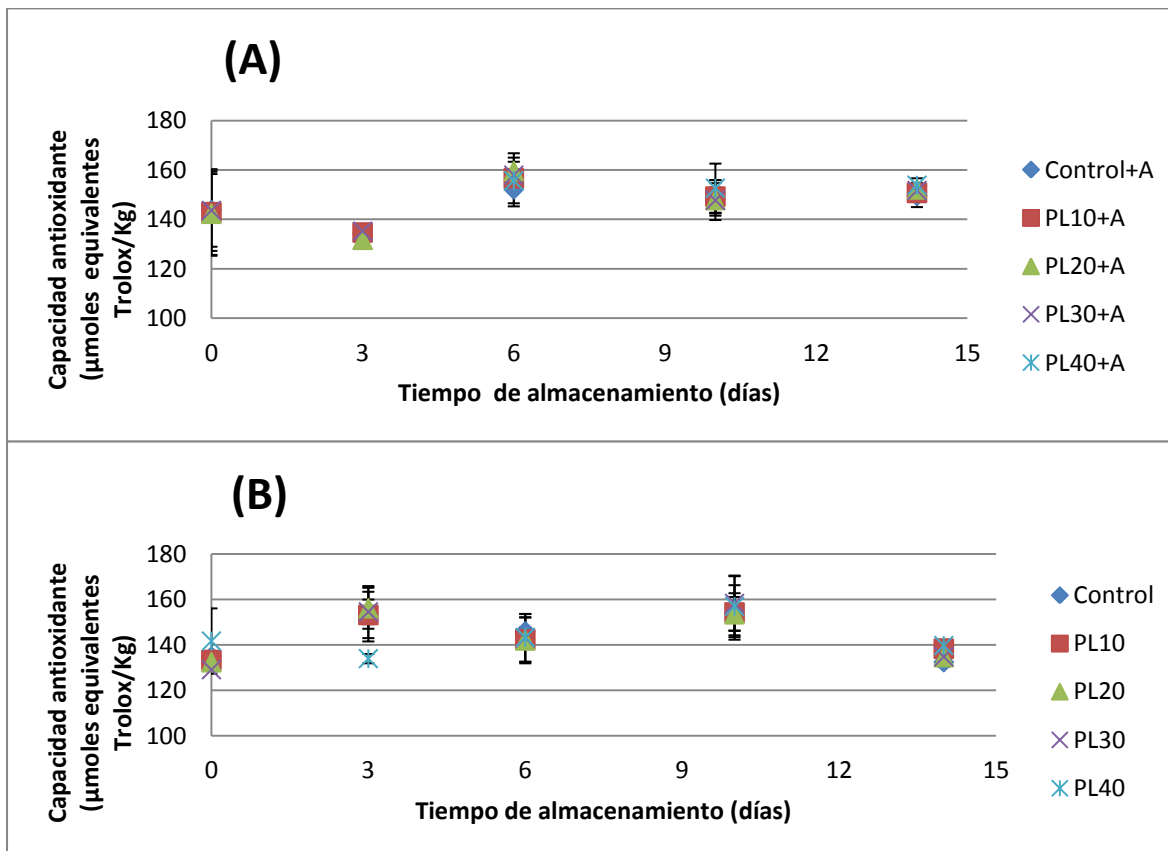


Gráfico 1. Resultados de la capacidad antioxidante obtenidos en las muestras tratadas con distintos tratamientos de luz pulsada en muestras con antioxidantes (A) y muestras sin antioxidantes (B).

En el gráfico 1B se puede observar que las distintas muestras presentan valores similares justo después de ser procesadas en un rango comprendido entre 129.03 y 141.64 μ moles equivalentes de Trolox/Kg de muestra. Los valores de capacidad antioxidante se mantienen a lo largo del tiempo de almacenamiento en las distintas muestras, produciéndose un ligero aumento con el paso de los días. En general, no se pueden observar diferencias del efecto en la capacidad antioxidante de los distintos tratamientos con pulsos de luz. Los resultados del análisis de varianza permiten corroborar los resultados observables, indicando la existencia de diferencias significativas entre los valores muestreados a lo largo del tiempo de almacenamiento, pero no pudiendo distinguir entre fresas sometidas a distintos tratamientos y muestreadas simultáneamente.

Por lo tanto, podemos decir que los distintos tratamientos con pulsos de luz no producen diferencias en la capacidad antioxidante de las distintas muestras, y que la presencia de antioxidantes tampoco afecta a la capacidad antioxidante de las muestras.

5.2 COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES MEDIANTE EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

Los resultados obtenidos en la determinación de compuestos fenólicos totales mediante el método del reactivo de F-C se han expresado en dos gráficos. El gráfico 2 A para las muestras tratadas con antioxidantes y el gráfico 2 B para las muestras que no han sido tratadas con antioxidantes. Los resultados obtenidos están expresados en mg equivalentes de ácido gálico en 100 g de muestra.

En el gráfico 2A se puede observar que la cantidad de compuestos fenólicos totales en las distintas muestras son similares justo después del procesado y a lo largo del tiempo de almacenamiento. Se puede observar que con el tiempo de almacenamiento se produce una ligera disminución de los valores de compuestos fenólicos totales en las muestras. No se observan diferencias entre los distintos tratamientos con luz pulsada.

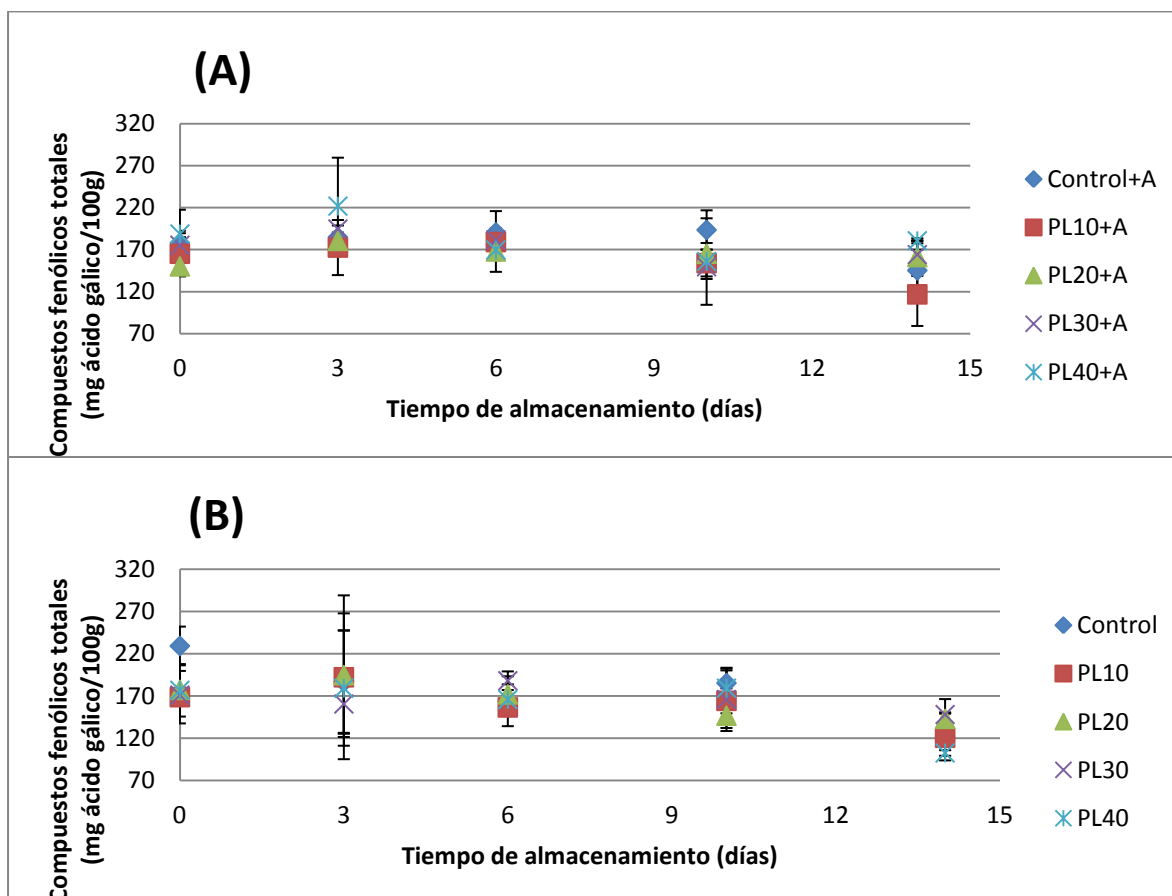


Gráfico 2. Resultados de los compuestos fenólicos totales mediante el método del reactivo de F-C obtenidos en las muestras tratadas con distintos tratamientos de luz pulsada en muestras con antioxidantes (A) y muestras sin antioxidantes (B).

En el gráfico 2B se puede observar que los valores obtenidos en las fresas recién procesadas presentan algunas diferencias, siendo la muestra control, es decir la no tratada con luz pulsada, la de mayor contenido en compuestos fenólicos. Los mayores valores de compuestos fenólicos totales son los de las muestras control, es decir, las que no se han tratado con luz pulsada, con una media de 177.9 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de muestra. Por lo tanto, en este caso, el tratamiento con luz pulsada sí que afecta al contenido de compuestos fenólicos en las fresas analizadas. No obstante, a lo largo del tiempo, se puede observar que los valores obtenidos van disminuyendo ligeramente, no pudiéndose identificar diferencias significativas entre las fresas sometidas a distintos tratamientos. Al realizar la prueba de diferencia de medias se obtienen diferencias significativas ($p < 0,05$) a lo largo del tiempo en los valores de compuestos fenólicos obtenidos mediante el método del reactivo de F-C. Por lo que respecta a los distintos tratamientos con luz pulsada no se observan diferencias.

5.3 COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES MEDIANTE EL ENSAYO DEL REACTIVO DE FAST BLUE BB

Los resultados obtenidos en la determinación de compuestos fenólicos totales mediante el ensayo del reactivo de FBBB se han expresado en dos gráficos. El gráfico 3 A para las muestras tratadas con antioxidantes y el gráfico 3 B para las muestras que no han sido tratadas con antioxidantes. Los resultados obtenidos están expresados en mg equivalentes de ácido gálico en 100 g de muestra.

Los valores obtenidos de compuestos fenólicos totales en las distintas muestras analizadas justo después de su procesado son similares y no se observan grandes diferencias entre sus valores (Grafica 3 A). Durante el tiempo de almacenamiento se produce una ligera disminución en los valores obtenidos en las distintas muestras. Además, se pueden observar pequeñas diferencias entre los distintos tipos de tratamientos con luz pulsada.

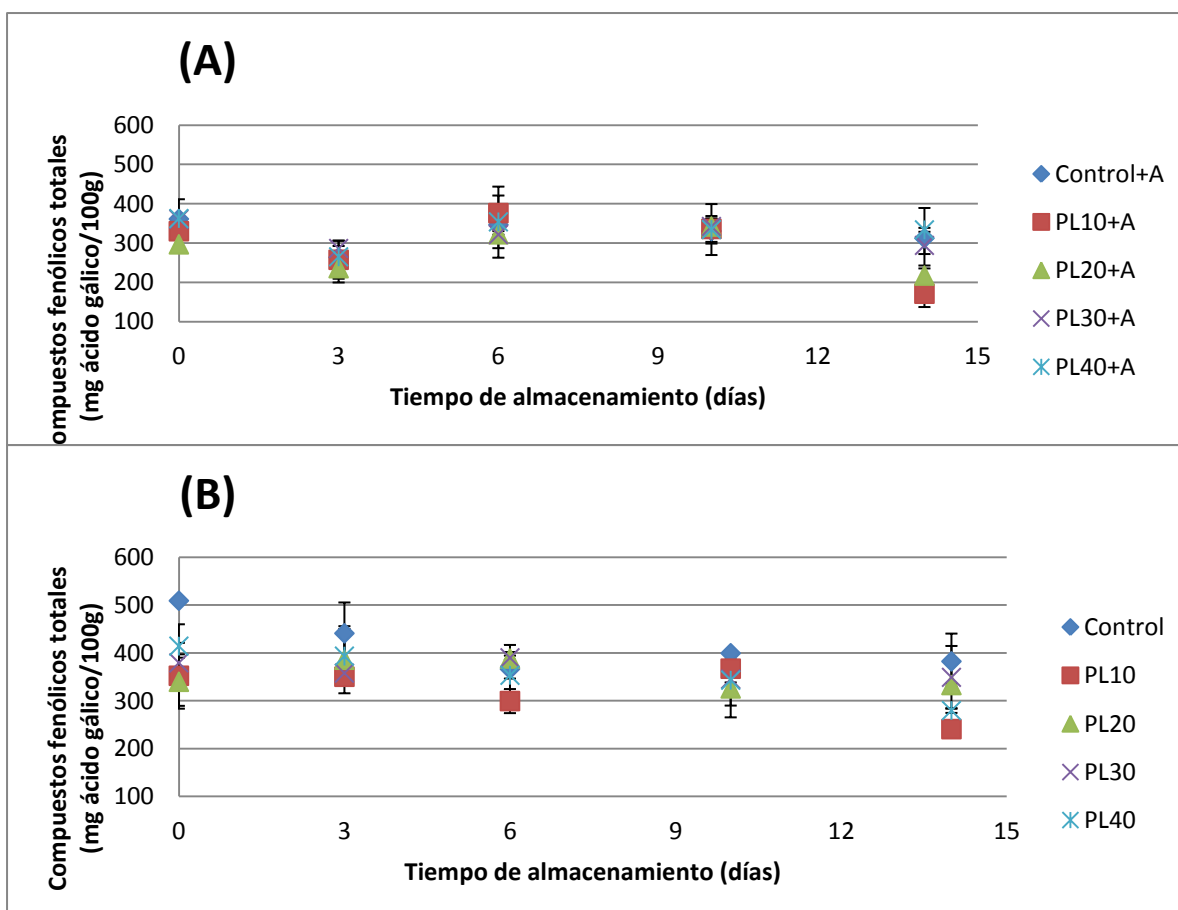


Gráfico 3. Resultados de los compuestos fenólicos totales mediante el ensayo del reactivo FBBB obtenidos en las muestras tratadas con distintos tratamientos de luz pulsada en muestras con antioxidantes (A) y muestras sin antioxidantes (B).

En el gráfico 3 B se pueden observar ligeras diferencias en el contenido en compuestos fenólicos totales después del procesado, a lo largo del tiempo de almacenamiento y también entre los distintos tratamientos de luz pulsada. Los valores más altos de compuestos fenólicos son los tomados en muestras recién procesadas, alcanzando valores superiores a 500 mg equivalentes de ácido gálico/100 g en la muestra control. A lo largo del almacenamiento, los valores de las distintas muestras han disminuido ligeramente, siendo las fresas no sometidas al tratamiento con pulsos de luz las que presentaron valores significativamente superiores en la mayoría de tiempos de muestreo, con una media de 371.4 mg equivalentes de ácido ascórbico/100g de muestra. Por lo tanto, en este caso se podría afirmar que el tratamiento con luz pulsada causa ligeras pérdidas en el contenido en compuestos fenólicos totales de las distintas muestras de fresa analizadas mediante el ensayo del reactivo FBBB.

Según el análisis de varianza realizado en los compuestos fenólicos totales obtenidos mediante el ensayo de FBBB se observan diferencias con el tiempo, los distintos tratamientos de pulsos de luz y la presencia de antioxidantes en las muestras. Por lo tanto, existen diferencias significativas entre los tratamientos con distinta intensidad de luz pulsada afectando al contenido total de compuestos fenólicos de las muestras.

5.4 ANTOCIANINAS TOTALES

Los resultados obtenidos en la determinación de antocianinas totales se han expresado en dos gráficas. El Gráfico 4 A para las muestras tratadas con antioxidantes y el gráfico 4B para las muestras que no han sido tratada con antioxidantes. Los resultados obtenidos están expresados en mg antocianinas por Kg de muestra.

En el gráfico 4 A la cantidad de antocianinas totales obtenidas en la determinación realizada después del procesado las distintas muestras presentan valores similares. Durante el tiempo de almacenamiento, los valores de antocianinas totales se mantienen estables entre las distintas muestras, sin embargo, se puede observar una ligera disminución de los valores con el paso de los días.

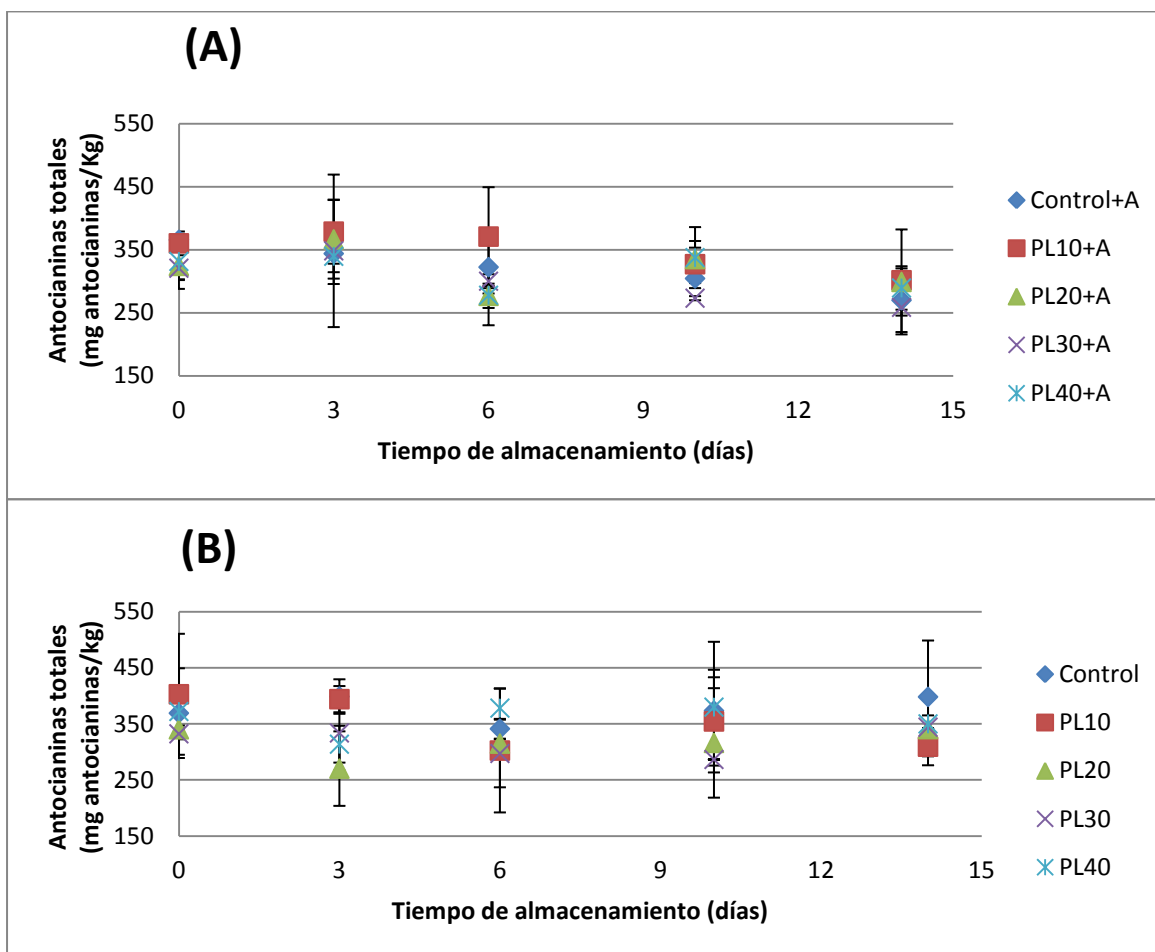


Gráfico 4. Resultados de las antocianinas totales obtenidos en las muestras tratadas con distintos tratamientos de luz pulsada en muestras con antioxidantes (A) y muestras sin antioxidantes (B).

En el gráfico 4 B están expresados los resultados obtenidos de antocianinas totales de las muestras que no han sido tratadas con antioxidantes. En esta gráfico se puede observar pequeñas diferencias entre las distintas muestras después del procesado y también durante el tiempo de almacenamiento. En este caso se puede observar diferencias entre los distintos tipos de tratamiento con luz pulsada.

Al realizar el análisis de varianza de los resultados obtenidos durante la determinación de las antocianinas totales se observan diferencias entre las muestras con el paso del tiempo, pero las diferencias entre los distintos tratamientos con luz pulsada son pequeñas y no se puede establecer un orden lógico de la influencia del tratamiento con luz pulsada.

6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En la determinación de la capacidad antioxidante se produce un ligero aumento de los valores obtenidos a lo largo del tiempo, hecho que indica una variación en el contenido en compuestos antioxidantes de la fruta. Este aumento de la capacidad antioxidante es factible en productos metabólicamente activos, como son los productos de cuarta gama, y se produce para compensar el efecto de los radicales libres que se producen ante situaciones de estrés provocadas por la manipulación, el procesado y los distintos tratamientos a los que se ha sometido la fruta. Chen y Breen (1991) observaron este comportamiento, observado en fresas enteras, al metabolismo fenilpropanoide, modulado por la enzima fenilalanina amonioliase y que conduce a la síntesis de compuestos fenólicos por parte del fruto.

Al comparar los resultados obtenidos en la determinación de la capacidad antioxidante con los resultados obtenidos en la determinación de compuestos fenólicos se observan evoluciones diferentes a lo largo del tiempo. El contenido en compuestos fenólicos tiene a disminuir con el tiempo, tanto si se analizan con el método de del reactivo de Folin-Ciocalteu como si se utiliza el ensayo del reactivo FBBB. En cambio, la capacidad antioxidante de las muestras parece aumentar ligeramente con el tiempo de almacenamiento. Esto se debe a que los valores de capacidad antioxidante no solo dependen del contenido fenólico, sino que hay otras sustancias antioxidantes a considerar. La presencia de otras sustancias antioxidantes en la fresa, como el ácido ascórbico o los carotenoides, podrían explicar las diferencias en las tendencias observadas entre compuestos fenólicos y capacidad antioxidante a lo largo del almacenamiento.

Otro aspecto destacable es que las muestras no sometidas a tratamientos antioxidantes con ácido ascórbico son las que mayor contenido fenólico presentan. Ello podría explicarse por una mayor respuesta al estrés producido durante la manipulación y procesado de las fresas no tratadas con antioxidantes. En cambio, en las muestras tratadas con una disolución antioxidante justo después del corte la respuesta al estrés no fue tan intensa y por ello el procesado no provocó un aumento en la síntesis de compuestos fenólicos.

Al comparar los resultados obtenidos en la determinación de compuestos fenólicos totales con el método del reactivo de Folin-Ciocalteu y el ensayo del reactivo FBBB, se observa que los valores obtenidos con el ensayo del reactivo FBBB son superiores a los obtenidos con el método del reactivo de Folin-Ciocalteu. Esto se debe a que el reactivo utilizado en el método de F-C puede interferir con otras sustancias presentes en la muestra como son el ácido ascórbico, azúcares (fructosa y sacarosa), aminas aromáticas, dióxido de azufre, ácidos orgánicos, y Fe (II). Al tratarse de un método espectrofotométrico, la cuantificación es indirecta y por tanto se pueden producir errores en la estimación de compuestos fenólicos a causa de las interferencias del reactivo utilizado con otras sustancias presentes en la muestra (Medina, 2011). Sin embargo, en el ensayo FBBB al tratarse de una reacción directa entre el reactivo utilizado y los compuestos fenólicos de la muestra, los valores que se obtienen son superiores.

En un estudio reciente, Medina (2011) obtuvo resultados similares al comparar ambos métodos para la determinación de compuestos fenólicos en fresa. Estos resultados indican que el ensayo FBBB proporciona una estimación superior y más precisa del contenido en compuestos fenólicos totales que el método de Singleton, debido a su selectividad frente a los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos.

Por lo que respecta a la determinación de antocianinas totales, la utilización de ácido ascórbico como antipardeante puede ser la causa de que las muestras tratadas con este antioxidante presenten valores inferiores de antocianinas totales que las muestras no tratadas con antioxidantes. Ello es debido a que el ácido ascórbico favorece la degradación de las antocianinas presentes en las muestras (Garzón y Wrolstad, 2002).

Con estos resultados se puede evaluar el impacto que presentan los tratamientos con luz pulsada sobre el potencial antioxidante de fresa mínimamente procesada. Es preciso recordar que la finalidad de los tratamientos aplicados es meramente higienizante. Estudios realizados en paralelo a los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo permiten constatar la efectividad antimicrobiana de los tratamientos empleados. Además, en un estudio ya publicado, Ramos-Villaruel et al. (2012) reportaron la eficacia que el uso de tratamientos con luz pulsada posee contra microorganismos sustitutos de cepas patógenas

como *Escherichia coli* y *Listeria innocua*. Según los autores, se requieren fluencias de 12 J/cm², equiparables a las aplicadas en el presente estudio, para reducir en más de 3 y 2 ciclos logarítmicos, la población de *E. coli* y *L. innocua*, respectivamente.

7. CONCLUSIONES

La capacidad antioxidante de las fresas no se vio afectada por el tratamiento no térmico con luz pulsada. No obstante el tiempo de almacenamiento sí presentó un efecto significativo, ya que con el paso de los días la capacidad antioxidante de las muestras aumentó ligeramente.

El tratamiento con luz pulsada en las fresas analizadas afectó al contenido de compuestos fenólicos totales realizado mediante el método del reactivo de Folin-Ciocalteu y el ensayo del reactivo Fast Blue BB, ya que las muestras no tratadas con pulsos de luz fueron las que mayor contenido en compuestos fenólicos presentaron en la determinación de estos mediante los dos métodos. El tiempo de almacenaje también afectó al contenido total de compuestos fenólicos, ya que se produjo una ligera disminución de su contenido en las muestras con el paso de los días. Los tratamientos antipardeantes con ácido ascórbico no presentaron un efecto significativo sobre el contenido de compuestos fenólicos de las fresas. Los resultados obtenidos indicaron que el ensayo del reactivo FBBB proporciona una superior y más precisa estimación de los compuestos fenólicos, debido a su reacción directa con compuestos fenólicos en fresas, que el total indirecto actual de los compuestos fenólicos del método de F-C. Por lo tanto, se ha de tener en cuenta que al utilizar el método de F-C no se están estimando los compuestos fenólicos en su totalidad.

El contenido en antocianinas totales de los trozos de fruta cortada no sufrió cambios significativos como consecuencia de los tratamientos con luz pulsada; sin embargo la utilización de ácido ascórbico como estabilizante del color favoreció la degradación de las antocianinas totales en las muestras de fresa cortada sometidas a tratamientos con este antioxidante.

La utilización de tratamientos con luz pulsada para la descontaminación microbiológica de los productos vegetales es efectiva al tener un poder antimicrobiano. La capacidad antioxidante de las frutas analizadas no se vio afectada por los tratamientos con pulsos de luz, sin embargo, sí que provocó una ligera disminución en la cantidad de compuestos fenólicos totales.

BIBLIOGRAFÍA

- AMES, B.M.; SHIGENA, M.K.; HAGEN, T.M. (1993). "Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging". *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915-7922.
- ASTIASARÁN, I.; MARTÍNEZ, J.A (2000). *Alimentos: composición y propiedades*. 2ⁿ ed. Madrid: McGraw-Hill. ISBN 84-486-0305-2.
- BUETTNER, G.R (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem biophys* 300:535-543.
- BURTON, G.W.; INGOLD, K.U (1981). "Autoxidation of biological molecules. I. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro". *Journal of the American Chemical Society* 103, 6472-6477.
- BURTON, G.W.; DOBA, T.; GABE, E.J.; HUGHES, L.; LEE, F.L.; PRASAD, L.; INGOLD, K.U (1985). "Autoxidation of biological molecules. 4. Maximizing the antioxidant activity of phenols". *Journal of the American Chemical Society* 107, 7053-7065.
- BUTLER, L.G (1992). Protein-polyphenol interactions: nutritional aspects. *Proceedings of the 16th International Conference of Grape Polyphenols*, Vol 16, II, 11.
- CHENG, G.W.; BREEN, P. J. (1991). "Activity of Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) and Concentrations of Anthocyanins and Phenolics in Developing Strawberry Fruit". *Journal of the American Society of Horticultural Science*, Vol. 116, 5: 865-869.
- CLIFFORD, M.N (1992). Sensory and dietary properties of phenols. *Proceedings of the 16th International Conference of Grape Polyphenols*, Vol 16, II, 19.
- CUQ, J-L. Calidad de nuestros alimentos y tecnología. *La alimentación humana*. Barcelona: Bellaterra. ISBN 84-7290-088-6.
- CUQ, J-L. Cocción y conservación de los alimentos. *La alimentación humana*. Barcelona: Bellaterra. ISBN 84-7290-088-6.
- DIXON, R.A.; PAIVA, N.L (1995). "Stress-induced phenylpropanoid metabolism". *Plant Cell*, 7, 1085-1097.

-
- DOBA, T.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U (1985). “Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes”. *Biochimica et Biophysica Acta* 835, 298-303.
 - DUNN, J (1996). “Pulsed light and pulsed electric field for foods and eggs”. *Poultry Science*, 75, 1133-1136.
 - DUPIN, H.; CUQ, J-L.; MALEWIAK, M.; LEYNAUD-ROUAUD, C.; BERTHIER, A (1997). *La alimentación humana*. Barcelona: Bellaterra. ISBN 84-7290-088-6.
 - FOLIN, O., CIOCALTEU, V (1927). “On tyrosine and tryptophan determinations in proteins”. *The Journal of Biological Chemistry* 73, 627–650
 - FOURIE, P.C (1996). *Procesado de frutas. Las frutas y la nutrición humana*. Zaragoza: Acribia. ISBN 84-200-0839-7.
 - GARZÓN, G.A, WROLSTAD, R.E (2002). “Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate”. *J Food Sci.* 67(4):1288-1299
 - HERRERO, A.M.; ROMERO DE AVILA, M.D (2006). “Innovaciones en el procesado de alimentos: tecnologías no térmicas”. *Revista Medica Universidad de Navarra*, vol 50, nº4, 71-74.
 - HUTCHINGS, J.H (1999). *Food Color and Appearance*. 2nd ed. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers, Inc.
 - KALLNER, A.; HARTMANN, D.; HORNING, D (1979). Steady-state turnover and body pool of ascorbic acid in man. *Am J Clin Nutr* 32, 530-539.
 - KAUR, C; KAPOOR, H.C (2001). “Antioxidants in fruits and vegetables – at millenium’s health”. *International Journal of Food Science and technology*, 36, 703-7025.
 - KAUR, C; KAPOOR, H.C (2002). “Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables”. *International Journal of Food Science and technology*, 37, 153-161.
 - KRINSKY, N. I.; BEECHER, G. R.; BURK, R. F.; CHAN, A. C. et al. (2000). *Dietary Reference Intakes (DRIs) for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and*

- Caratenoids*. Washington, D. C: National Academy Press.
- KUKLINSKI, C (2003). *Nutrición y bromatología*. Barcelona: Omega. ISBN 84-282-1330.
 - LEVINE, M.; RUMSEY, S.; WANG, Y.; PARK, J.; KWON, O.; XU, W.; AMANO, N (1996). *Vitamin C. Present Knowledge in Nutrition*, 7th edition. Washigton, DC: ILSI Press, 146-159.
 - LEYNAUD-ROUAUD, C. Las hortalizas y las frutas. *La alimentación humana*. Barcelona: Bellaterra. ISBN 84-7290-088-6.
 - MACHEIX, J.J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J (1989). *Fruit phenolics*. CRC Press, Boca Raton Florida.
 - MARTÍNEZ, J.; GARCÍA, P. *Nutrición humana*. Valencia: UPV. ISBN 84-9705-072-X.
 - MAZZA, G.; MINIATI, E (1994). *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*. CRC Press, Boca Raton, FL.
 - McEVILY, A. J.; IYENGER, R.; GROSS, A. T (1992). Inhibition of polyphenol oxidase by phenolics compounds. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Healt II. Antioxidants and Cancer Prevention*, Huang, M., Ho, C., Lee, C. Y., Eds., ACS Symposium Series 507, American Chemical Society, Washington, DC 318.
 - MEDINA, M.B. (2011). “Determination of the total phenolics in juices and superfruits by novel chemical method”. *Journal of Functional Foods* 3, 79-87.
 - MERGENS, W. J (1992). Tocopherol: Natural phenol inhibitor of nitrosation. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Healt II. Antioxidants and Cancer Prevention*, Huang, M., Ho, C., Lee, C. Y., Eds., ACS Symposium Series 507, American Chemical Society, Washington, DC, 350.
 - MEYERS, K.J.; WATKINS, C.B.; PRITTS, M.P.; LIU, R.H. (2003). “Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6887-6892.
 - MOREIRAS, O.; CARBAJAL, A.; CABRERA, L.; CUADRADO, C. (2006). *Tablas de composición de alimentos*. 10^a ed. Madrid: Pirámide. ISBN 84-368-2050-9.
 - MULLER, D.P.; HARRIES, J.T.; LLOYD, J.K (1974). “The relative importance of

- the factors involved in the absorption of vitamin E in children”. *Gut* 15, 966-971.
- ODRIOZOLA, I. (2009). Obtención de zumos y frutos cortados con alto potencial antioxidante mediante tratamientos no térmicos. Tesis doctoral. Universitat de Lleida. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària.
 - OMS-OLIU, G.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R (2009). “Pulsed light treatments for food preservation. A review”. *Food Bioprocess Technol* (2010) 3:13-23.
 - PACKER, L (1994). “Vitamin E is nature’s master antioxidant”. *Scientific American Science and Medicine* 1, 54-63.
 - PRIOR, R.L., WU, X., SCHAICH, K (2005). “Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4290–4302.
 - RAMOS-VILLARROEL, A. Y.; ARON-MAFTEI, N.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R (2012). “The role of pulsed light spectral distribution in the inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on fresh-cut mushrooms”. *Food Control* 24, 206-213.
 - TIMBERLAKE, C.F (1980). “Anthocyanins-Occurrence, Extraction and Chemistry”. *Food Chem.*, 5(1)69-80.
 - SOLIVA-FORTUNY, R. C., MARTÍN-BELLOSO, O (2003). “New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: a review”. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 341-353.
 - SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A (1965). “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents”. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–158
 - SINGLETON, V.L; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M (1999). “Analysis of total phenols and other oxidation substances and antioxidants by mean of Folin-Ciocalteu reagent”. *Methods in Enzymology* 299, 152-178.
 - SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. J. P. D (1992). Phenolic antioxidants. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 67.
 - SHAHIDI, F.; NACZK, M (1995). *Food phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc. ISBN 1-56676-279-0.

- TALANEN, M (1995). *Vitaminas y minerales en la salud y en la nutrición*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- TSAO, C.S (1997). An overview of ascorbic acid chemistry and biochemistry. *Vitamin C in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker, 25-58.
- VAN SUMERE, C.F (1989). Phenols and phenolic acids. *Methods in Plant Biochemistry. Vol I. Plant Phenolics*, Harborne, J.B., Ed. Academic Press, London, 29.
- VESTRHEIM, S (1970). "Effects of chemical compounds on anthocyanin formation". *Journal American Society for Horticultural Science*, 95, 712.
- WILEY, R. (1997). *Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas*. Editorial Acribia, Zaragoza, España.