



EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS SOBRE LA MICROESTRUCTURA DEL CAQUI “ROJO BRILLANTE” Y SU RELACIÓN CON LA DISPONIBILIDAD DE COMPUESTOS BIOACTIVOS



**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y GESTIÓN
ALIMENTARIA**

José Luis Vázquez Gutiérrez

DIRECTORA: Isabel Pérez Munuera

CENTRO: Departamento de Tecnología de Alimentos

EFFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS SOBRE LA MICROESTRUCTURA DEL CAQUI “ROJO BRILLANTE” Y SU RELACIÓN CON LA DISPONIBILIDAD DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

J.L. Vázquez-Gutiérrez, I. Pérez-Munuera¹

RESUMEN

El caqui es una importante fuente de compuestos fenólicos, fibra dietética y carotenoides, cuya biodisponibilidad está directamente relacionada con el procesado. Muestras de dos estados distintos de maduración de caqui de la variedad “Rojo Brillante” con y sin tratamiento de desastringencia (95-98% CO₂) fueron tratadas por altas presiones hidrostáticas (APH) a 200 y 400 MPa durante 1, 3 y 6 minutos. Se realizó un estudio de la microestructura mediante Microscopía Electrónica de Barrido a Bajas Temperaturas, Microscopía Óptica y Microscopía Láser Confocal de Barrido (Cryo-SEM, LM y CLSM) y se analizó el contenido en sólidos solubles totales (SST) y algunas propiedades texturales. El objetivo de este estudio fue el análisis del efecto de las APH sobre la microestructura del caqui “Rojo Brillante” en distintos estados de madurez y su relación con la disponibilidad de compuestos bioactivos. El análisis de la microestructura mostró que la aplicación de APH produce rotura de paredes celulares y dispersión de componentes intracelulares en el tejido, mejorando así la disponibilidad de compuestos de interés nutricional como taninos, fibra y carotenoides. El contenido en SST disminuye en las muestras astringentes al aplicar APH, atribuyéndose este hecho a la precipitación de los taninos solubles, lo cual podría permitir la eliminación del tratamiento de desastringencia con CO₂ en muestras procesadas con APH. El tratamiento con APH provocó una disminución generalizada de la firmeza en ambos estados de maduración y un aumento de la cohesividad en las muestras más maduras.

PALABRAS CLAVE: caqui, altas presiones hidrostáticas, componentes bioactivos, microestructura, Cryo-SEM, CLSM, propiedades texturales.

RESUM

El caqui és una font important de compostos fenòlics, fibra dietètica y carotenoides, estant la seua biodisponibilitat directament relacionada amb el processat. Mostres de dos estadis de maduració diferents de caqui de la varietat “Rojo Brillante” amb i sense tractament de desastringència (95-98% CO₂) foren tractades per altes pressions hidrostàtiques (APH) a 200 i 400 MPa durant 1, 3 i 6 minuts. Es va realitzar un estudi de la microestructura

¹ Grupo de Microestructura y Química de Alimentos. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n 46022 Valencia (España)

mitjançant Microscòpia Electrònica d'Escombratge a Baixes Temperatures, Microscòpia Òptica i Microscòpia Làser Confocal d'Escombratge (Cryo-SEM, LM y CLSM) i es va analitzar el contingut en sòlids solubles totals (SST), i algunes propietats texturals. L'objectiu d'aquest estudi va ser l'anàlisi de l'efecte de les APH sobre la microestructura del caqui "Rojo Brillante" en diferents estadis de maduració i la seua relació amb la disponibilitat de compostos bioactius. L'anàlisi de la microestructura va mostrar que l'aplicació de APH produeix trencament de parets cel·lulars i dispersió de components intracel·lulars en el teixit, millorant així la disponibilitat de compostos d'interès nutricional com tanins, fibra i carotenoides. El contingut en SST disminueix en les mostres astringents quan s'apliquen APH, atribuint-se aquest fet a la precipitació dels tanins solubles, fet que podria permetre l'eliminació del tractament de desastringència amb CO₂ en mostres processades amb APH. El tractament amb APH va provocar una disminució generalitzada de la fermesa en els dos estadis de maduració i un augment de la cohesivitat en les mostres més madures.

PARAULES CLAU: caqui, altes pressions hidrostàtiques, components bioactius, microestructura, Cryo-SEM, CLSM, propietats texturals.

ABSTRACT

Persimmon fruit is an important source of phenolic compounds, dietary fiber and carotenoids, whose bioavailability is directly connected with processing. Samples from persimmon fruit cv. "Rojo Brillante" from two different ripening stages, with and without deastringency treatment (95-98% CO₂), were treated with high hydrostatic pressure (HHP) at 200 and 400 MPa during 1, 3 and 6 minutes. A microstructural study using Cryo Scanning Electron Microscopy, Light Microscopy and Confocal Laser Scanning Microscopy (Cryo-SEM, LM and CLSM) was carried out. Total soluble solids content (TSS) and some textural properties were also analyzed. The aim of this study was the analysis of the effect of HHP on the microstructure of persimmon fruit cv. "Rojo Brillante" in different ripening stages and its relationship with bioactive compounds availability. The microstructural study showed that the application of HHP provokes cell wall disruption and intracellular components dispersion throughout the tissue, with an improvement in the availability of compounds with nutritional interest, such as tannins, fiber and carotenoids. TSS content diminishes in astringent samples when HHP is applied. This fact was attributed to the precipitation of soluble tannins. Therefore, deastringency treatment with CO₂ could be omitted in samples treated with HHP. An overall decrease in firmness in both ripening stages and an increase in cohesiveness in the more advanced one were caused by HHP treatment.

KEYWORDS: persimmon, high hydrostatic pressure, bioactive compounds, microstructure, Cryo-SEM, CLSM, textural properties.

INTRODUCCIÓN

El efecto beneficioso de los compuestos bioactivos y otros nutrientes presentes en los alimentos, tanto de origen vegetal como animal, depende de la cantidad de dicho compuesto que consigue alcanzar determinados lugares del organismo en la forma química activa y en la cantidad adecuada. Durante el procesado de los alimentos se favorece la reacción de las enzimas con sus correspondientes sustratos y la salida de nutrientes y compuestos bioactivos desde los orgánulos y otros compartimentos celulares. Este hecho da lugar a modificaciones relacionadas con la calidad sensorial (color, textura, aroma) y nutricional de los alimentos. De esta manera, la biodisponibilidad de los nutrientes es afectada por las modificaciones de la microestructura como consecuencia del procesado (Parada y Aguilera, 2007).

El procesado de alimentos por alta presión hidrostática (APH) consiste en la aplicación de presión al alimento con una intensidad entre 50 a 1000 MPa, sola o en combinación con otros tratamientos (térmicos suaves, ultrasonidos, CO₂, aditivos naturales, etc). El principal objetivo del procesado de alimentos mediante APH es la obtención de alimentos seguros y saludables, manteniendo su calidad sensorial y organoléptica. La mayoría de los estudios realizados sobre el potencial y limitaciones del procesado de alimentos mediante APH se han centrado en la inactivación microbiana y enzimática. Sin embargo, el efecto que ejerce esta tecnología sobre los compuestos nutricionales, vitaminas y compuestos bioactivos de los alimentos ha sido menos estudiado (Patterson, 2000; Cano y De Ancos, 2005; Hogan et al., 2005). Los avances en el diseño de equipos y los estudios de investigación, han permitido el desarrollo de un amplio rango de productos comerciales tratados por APH a base de frutas y vegetales (zumo de naranja, zumo de manzana, guacamole, mermeladas de frutas, puré de tomate, rodajas de cebolla) (Torres y Velazquez, 2005; Rastogi et al., 2007). Sin embargo, hay otros vegetales, tales como el caqui, donde la aplicación de APH aún se encuentra en fase experimental (De Ancos et al., 2000).

El caqui (*Diospyros kaki* L. f.) es un fruto tropical originario de China que en España se empezó a cultivar en el siglo XIX. Desde hace unos años, el cultivo del caqui cv. "Rojo Brillante" ha sufrido una importante expansión en la Comunidad Valenciana hasta convertirse en una relevante alternativa al cultivo de otros frutales. Entre 2002 y 2008, la superficie dedicada al caqui aumentó un 87%, con casi 4.000 hectáreas cultivadas y una producción de entre 40.000 y 50.000 toneladas, según datos de la Asociación Valenciana de Agricultores AVA-ASAJA (Aguado, 2009).

El caqui es una buena fuente de compuestos fenólicos, fundamentalmente taninos condensados (proantocianidinas del grupo B), que tienen la propiedad de formar complejos estables con metales y proteínas y, por ello, son los responsables de la astringencia característica de estos frutos (Nakatsubo et al., 2002; Santos-Buelga y Scalbert, 2000). La conversión de los taninos solubles (astringentes) a insolubles (no astringentes) tiene lugar durante la maduración o por determinados tratamientos, como la aplicación de atmósferas modificadas con etanol o

CO₂ (Arnal y Del Río, 2003). También presenta un alto contenido en ácidos fenólicos, como el ferúlico o el p-cumárico, así como niveles de fibra dietética dos veces superior que la cuantificada en manzana (Gorinstein et al., 2001). El caqui también destaca por su alto contenido en compuestos carotenoides que además de tener una importante actividad antioxidante (β -caroteno, β -cryptoxantina, luteína, zeaxantina y licopeno), algunos de ellos presentan también actividad de provitamina A (β -caroteno y β -cryptoxantina) (De Ancos et al., 2000). También presentan un contenido alto en vitamina C y algunos minerales como el potasio (Wright y Kader, 1996).

En la actualidad hay un reducido número de estudios relacionados con la microestructura del caqui “Rojo Brillante” (Salvador et al., 2007; Salvador et al., 2008; Pérez-Munuera et al., 2009a; Pérez-Munuera et al., 2009b). El caqui “Rojo Brillante” pertenece al grupo de cultivares de caqui astringentes en el momento de recolección, conocido comercialmente como *persimon* tras eliminarse la astringencia con CO₂. La firmeza del fruto es el parámetro con el que más se identifica la calidad de este caqui, directamente relacionado con los polisacáridos de la pared celular, entre los que destacan las pectinas y las hemicelulosas.

El objetivo de este estudio fue el análisis del efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la microestructura del caqui “Rojo Brillante” en distintos estados de madurez y su relación con la disponibilidad de compuestos bioactivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Frutos de caqui de la variedad “Rojo Brillante” recolectados en dos estados distintos de maduración fueron facilitados por la Agrupación Nacional de Exportación de Cooperativas Citrícolas (ANECOOP). El estado de maduración del fruto se determinó en base a la coloración externa del fruto, desde el estado más inmaduro o estado 1 (verde-amarillo) al más avanzado o estado 6 (naranja-rojo) (Salvador et al., 2007). En este trabajo se estudian lotes correspondientes a los estados de maduración 3 y 5 (M1 y M2, respectivamente). Previamente al tratamiento con APH, la mitad del lote para cada estado de maduración fue sometida a un tratamiento de desastringencia en una atmósfera de CO₂ al 95-98% durante 20 horas a 18 °C (muestras no astringentes), y la otra mitad del lote fue directamente conservada en refrigeración (muestras astringentes).

Cubos de 15 mm de la zona ecuatorial de estos caquis se introdujeron en bolsas flexibles de plástico tipo Doypack (110x220 mm de Amcor, España) selladas, conteniendo cada una, aproximadamente, 80 gramos de muestra. Las bolsas se colocaron en una unidad de presión hidrostática (Gec Alsthom ACB 900 HP, type ACIP 665, Nantes, France) de 2350 ml de capacidad, donde se sometieron a tratamientos de alta presión de 200 y 400 MPa durante 1, 3 y 6 minutos, respectivamente. Tras la descompresión instantánea, las bolsas fueron almacenadas a 4 °C hasta su análisis.

Métodos

TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

La caracterización de la microestructura se llevó a cabo con la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido a Bajas Temperaturas (Cryo-SEM), Microscopía Óptica (LM) y Microscopía Láser Confocal de Barrido (CLSM).

Para su observación por Cryo-SEM, a partir de los cubos de caqui se cortaron muestras de 1 mm de espesor con una cuchilla de acero inoxidable. Se sumergieron en nitrógeno nieve ($T \leq -210$ °C) y se transfirieron a un Cryo-Trans (CT1x500C, Oxford Instruments Ltd., Oxford, Reino Unido) acoplado a un microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM 5410, Tokio, Japón) que trabaja en condiciones de congelación ($T < -130$ °C) y a vacío (10^{-2} bar de presión). En el Cryo-Trans las muestras se fracturaron a -180 °C con ayuda de un pequeño punzón. Los cortes se sublimaron a -90 °C, se recubrieron con oro (0.2 kPa, 40 mA) y se observaron en el microscopio a 10 kV y a una distancia de trabajo de 15 mm.

Para la observación por LM, se obtuvieron secciones criostato de 10 μm de espesor con un criostato Leica CM1950. Algunos cortes se tiñeron con azul de toluidina (0,2 g/100 g H_2O) y otros con vainillina-HCl (1:1 v/v) (Panreac Química S.A., Barcelona, España). Los cortes se observaron en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E800 V-PS100E, Nikon Co., Ltd., Tokio, Japón). Una parte de las secciones criostato se observaron sin agente de tinción para estudiar la presencia de carotenoides.

Las observaciones por CLSM se realizaron mediante un microscopio láser confocal Nikon C1 acoplado a un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 (Nikon Co., Ltd., Tokio, Japón) en modo de fotón simple equipado con un láser Ar-Kr. La longitud de onda de excitación fue de 488 nm y la radiación de la muestra se tomó a través de un filtro de paso de banda de 515/530 nm.

SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES

El contenido en sólidos solubles totales (SST) se determinó mediante un refractómetro (Atago ATC-1E) a partir de zumo obtenido de caquis sometidos a los distintos tratamientos. Para la elaboración de los zumos se homogeneizaron 60 gramos de cubos de caqui, por triplicado, para cada tratamiento. Los resultados se expresaron en °Brix.

PROPIEDADES TEXTURALES

Se evaluaron las propiedades texturales del fruto mediante un analizador de textura TA.XTplus de Stable Micro Systems. La firmeza fue expresada como el valor máximo de la fuerza (N) necesaria para romper la pulpa en sentido longitudinal mediante una probeta cilíndrica de 4 mm de diámetro. Mediante un análisis de perfil de textura (TPA), se determinó el parámetro de cohesividad, más directamente relacionado con la interacción entre los principales componentes estructurales de las muestras estudiadas. Para ello se realizó una compresión en dos tiempos de los cubos de caqui con un

émbolo de sección plana de 50 mm de diámetro. La cohesividad se expresó como el cociente entre las áreas correspondientes a la segunda y la primera compresión. Cada tipo de ensayo (penetración y TPA) se efectuó sobre ocho cubos de 15 mm de lado para cada tratamiento.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias mínimas significativas (LSD) se calcularon a un nivel de significación $p < 0.05$. Para ello se empleó el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1 (Manugistics, Inc., Rockville, MA, Estados Unidos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio microestructural

CRYO-SEM

El tejido parenquimático del caqui "Rojo Brillante" astringente en estado de maduración M1 (Figura 1A) es compacto con pequeños espacios intercelulares llenos de aire, aunque algunos ocupados por material soluble procedente del interior celular debido a la degradación del tejido durante la maduración. Las células parenquimáticas observadas en sección transversal son redondeadas, con diámetros entre 100 y 130 μm . El interior celular está casi totalmente ocupado por una gran vacuola, llena de material soluble (Figura 1D). Tras el tratar a 200 MPa durante 1 minuto (Figura 1B y 1E), se mantiene la misma estructura, aunque más compacta. Las células aparecen deformadas y una mayor cantidad de los espacios intercelulares se observan ocupados por material solubilizado desde las paredes celulares (fibra soluble, principalmente sustancias pécticas) o procedentes del interior celular, debido a la degradación del tejido por efecto de la presión. La aplicación de APH aumenta la disponibilidad de componentes de las paredes celulares, que se incorporan a la fracción de fibra dietética soluble. Además, en algunas células (células tánicas) aparece una masa compacta de material insoluble en el interior de la vacuola debido a la precipitación de los taninos (Figura 1E). En los espacios intercelulares también se observa material insoluble, indicando que al aplicar presión se produce la difusión de líquido intracelular y, posteriormente, la precipitación de los taninos, tanto dentro como fuera de las células tánicas. La aplicación de altas presiones favorece cualquier reacción que lleve a un descenso del volumen molar total y, en este sentido, podría favorecer la precipitación de los taninos (Cheftel, 1992).

Al aplicar 400 MPa durante 6 minutos, las células se colapsan, las paredes celulares están muy afectadas y se pierde la identidad celular (Figura 1C y 1F). Los espacios intercelulares están ahora completamente ocupados por líquido, aunque aparecen nuevas cavidades por el efecto de compresión-descompresión durante el tratamiento (Figura 1C) (Préstamo y Arroyo, 1998).

ASTRINGENTE M1

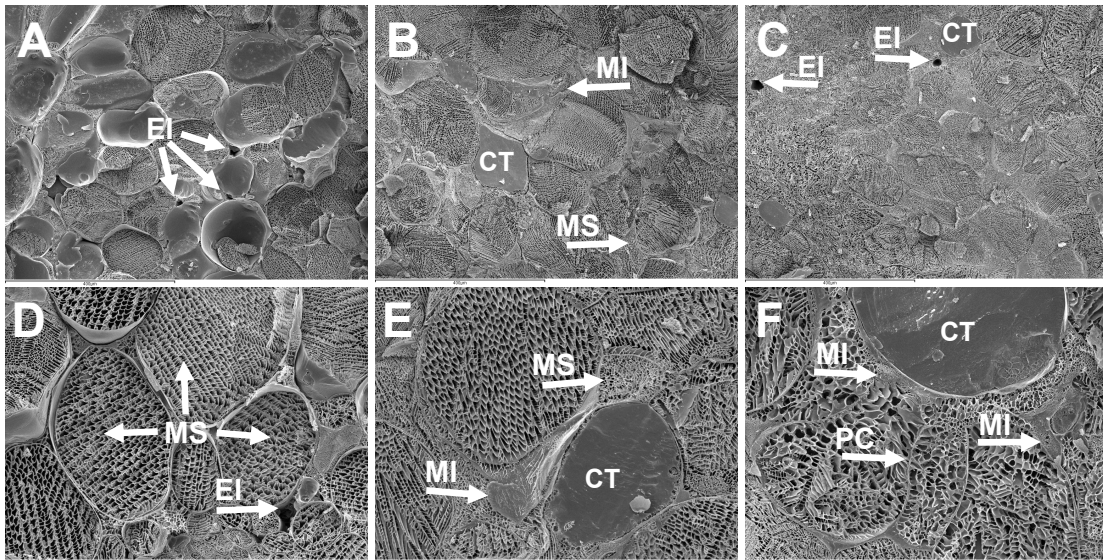


FIGURA 1. Cryo-SEM. Caqui astringente en estado de maduración M1. Control (A, D); 200 MPa, 1 minuto (B, E) y 400 MPa, 6 minutos (C, F). Magnificación x150 (A, B, C) y x500 (D, E, F). EI: espacio intercelular; MS: material soluble; MI: material insoluble; CT: célula tánica; PC: pared celular.

La estructura de las muestras no astringentes en estado de maduración M1 (Figura 2) presentan una estructura similar a las astringentes, aunque el tejido es más sensible a la aplicación de presión porque el tratamiento previo con CO₂ ya afectó ligeramente la estructura celular (Salvador et al., 2007).

NO ASTRINGENTE M1

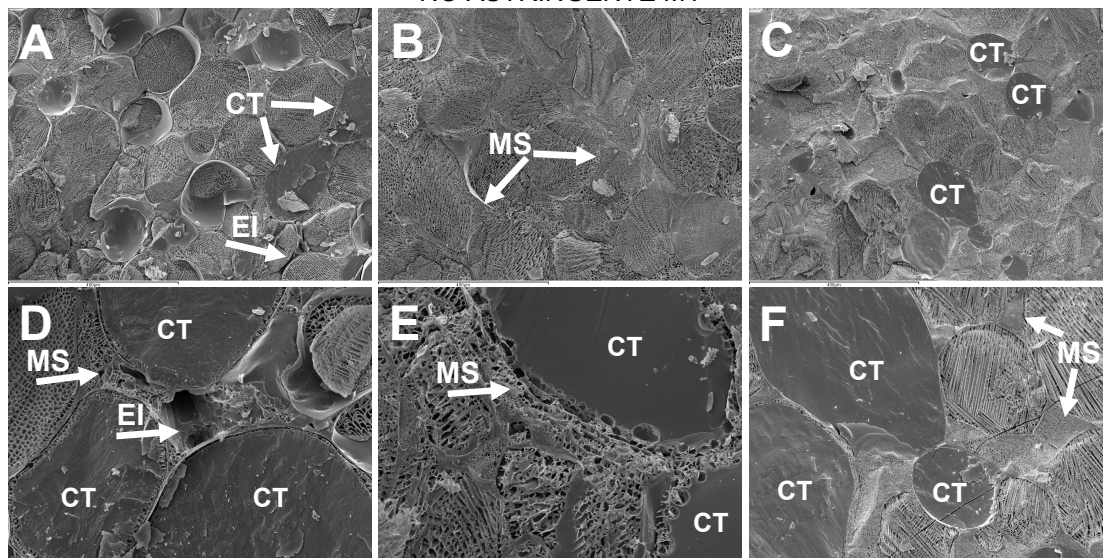


FIGURA 2. Cryo-SEM. Caqui no astringente en estado de maduración M1. Control (A, D); 200 MPa, 1 minuto (B, E) y 400 MPa, 6 minutos (C, F). Magnificación x150 (A, B, C) y x500 (D, E, F). EI: espacio intercelular; MS: material soluble; CT: célula tánica.

Las muestras control no astringentes tienen una mayor proporción de espacios intercelulares llenos de líquido (Figura 2A y 2D) que las astringentes. Además, ya presentan sus células tánicas llenas de material insoluble (taninos polimerizados) debido al tratamiento de desastringencia aplicado. Las células tánicas se encuentran formando agrupaciones (Figura 2D), tal y como se ha descrito en estudios anteriores (Salvador et al., 2007).

El tejido de muestras control de caqui en estado de maduración M2 presenta, al comparar con el estado M1, cambios estructurales relacionados con el proceso de maduración. Así, la membrana plasmática está altamente degradada y separada de la pared celular en muchas células (Figura 3A) y hay una pérdida generalizada de la cohesión intercelular, siendo este hecho más acusado en las muestras no astringentes (Figura 3B). Además, la mayor parte de los espacios intercelulares están ocupados por solutos. Las muestras no astringentes siguen presentando las células tánicas características del tratamiento con CO₂ (Figura 3D). La aplicación de presión produce cambios equivalentes a los descritos para las muestras M1 (Figura 3B, 3C, 3E y 3F).

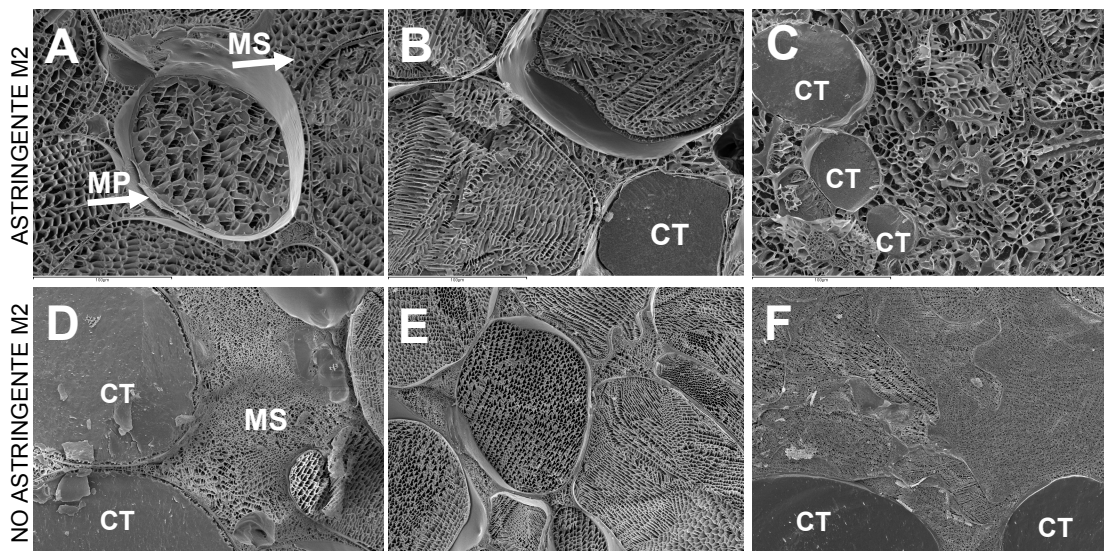


FIGURA 3. Cryo-SEM. Caqui astringente (A, B, C) y no astringente (D, E, F) en estado de maduración M2. Control (A, D); 200 MPa, 1 minuto (B, E) y 400 MPa, 6 minutos (C, F). Magnificación x500. MP: membrana plasmática; MS: material soluble; CT: célula tánica.

MICROSCOPÍA ÓPTICA

La aplicación de técnicas microscópicas complementarias a cryo-SEM permite identificar componentes químicos de interés así como hacer un seguimiento de su distribución después de ser sometidos a las APH.

En muestras astringentes no tratadas con APH se observan los taninos solubles teñidos de azul oscuro con azul de toluidina y de rojo con vainillina-HCl. Estos taninos solubles, situados en el interior de las células tánicas, se dispersan por todo el tejido durante la obtención de secciones criostato en la preparación de la muestra (Figura 4A y 4B).

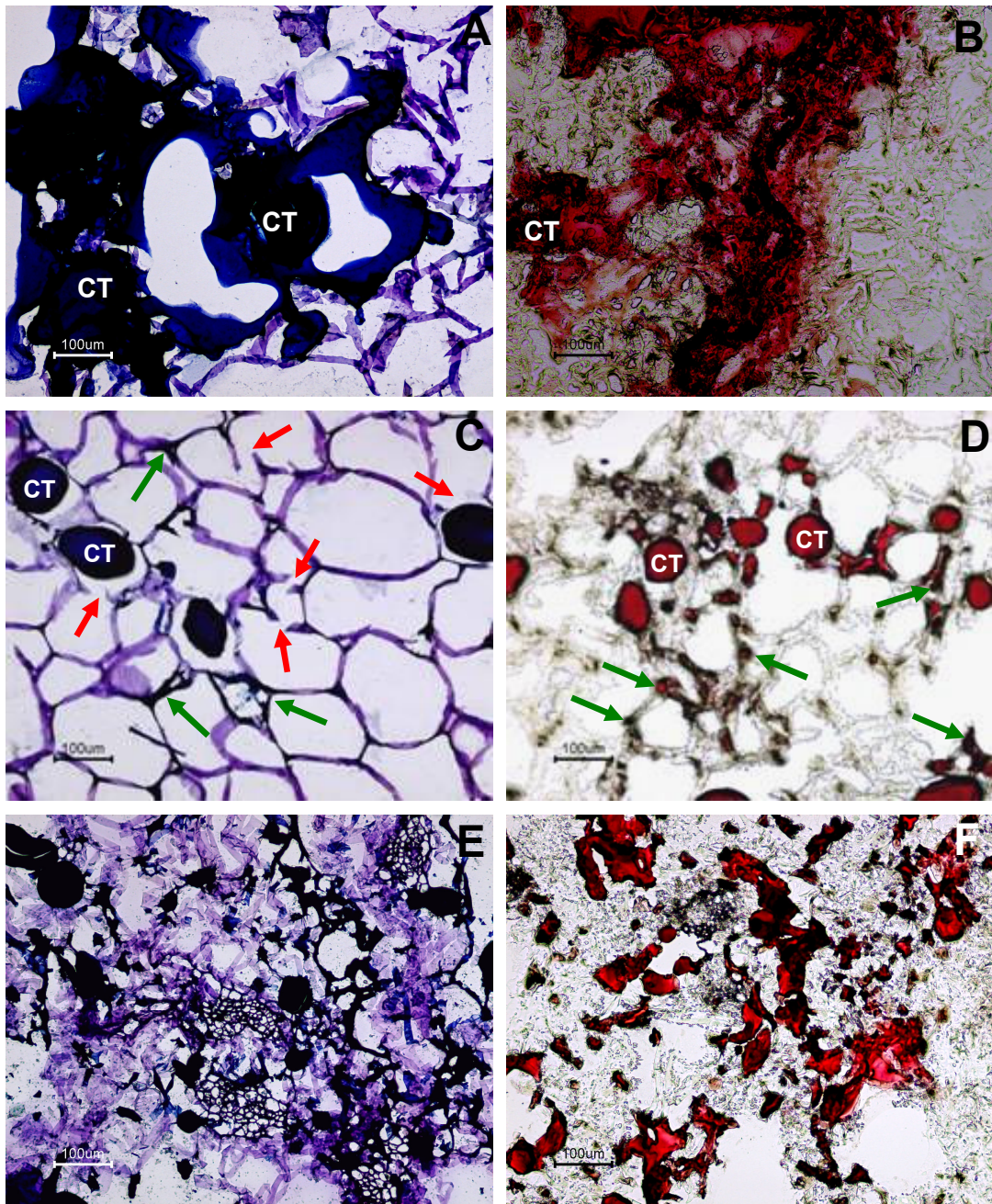


FIGURA 4. Microscopía óptica. Caqui astringente en estado de maduración M1. Control (A, B); 200 MPa, 1 minuto (C, D); 400 MPa, 1 minuto (E, F). Tinción con azul de toluidina (A, C, E) y con vainillina-HCl (B, D, F). Flechas rojas: paredes celulares rotas; Flechas verdes: taninos precipitados en espacios intercelulares; CT: célula tánica.

A bajas presiones y tiempos cortos (200 MPa/1 min) se aprecia el efecto de la presión en la rotura de las paredes celulares y la localización de los taninos precipitados en el interior de las células tánicas y en los espacios intercelulares por efecto de la presión (Figura 4C). La localización de los taninos dispersados desde el interior de las células y precipitados en los espacios intercelulares se observa más claramente en muestras teñidas con

vainillina-HCl (Figura 4D). La aplicación de presiones superiores afecta más al tejido y se observa una mayor dispersión de los taninos en el mismo (Figura 4E y 4F), lo que se puede relacionar claramente con una mayor biodisponibilidad de estos compuestos en muestras tratadas con APH.

En muestras no astringentes, el tejido no tratado por APH (Figura 5A y 5B) presenta los taninos polimerizados en el interior de las células tánicas por efecto del CO₂ (Gottreich y Blumenfeld, 1991; Oshida et al., 1996).

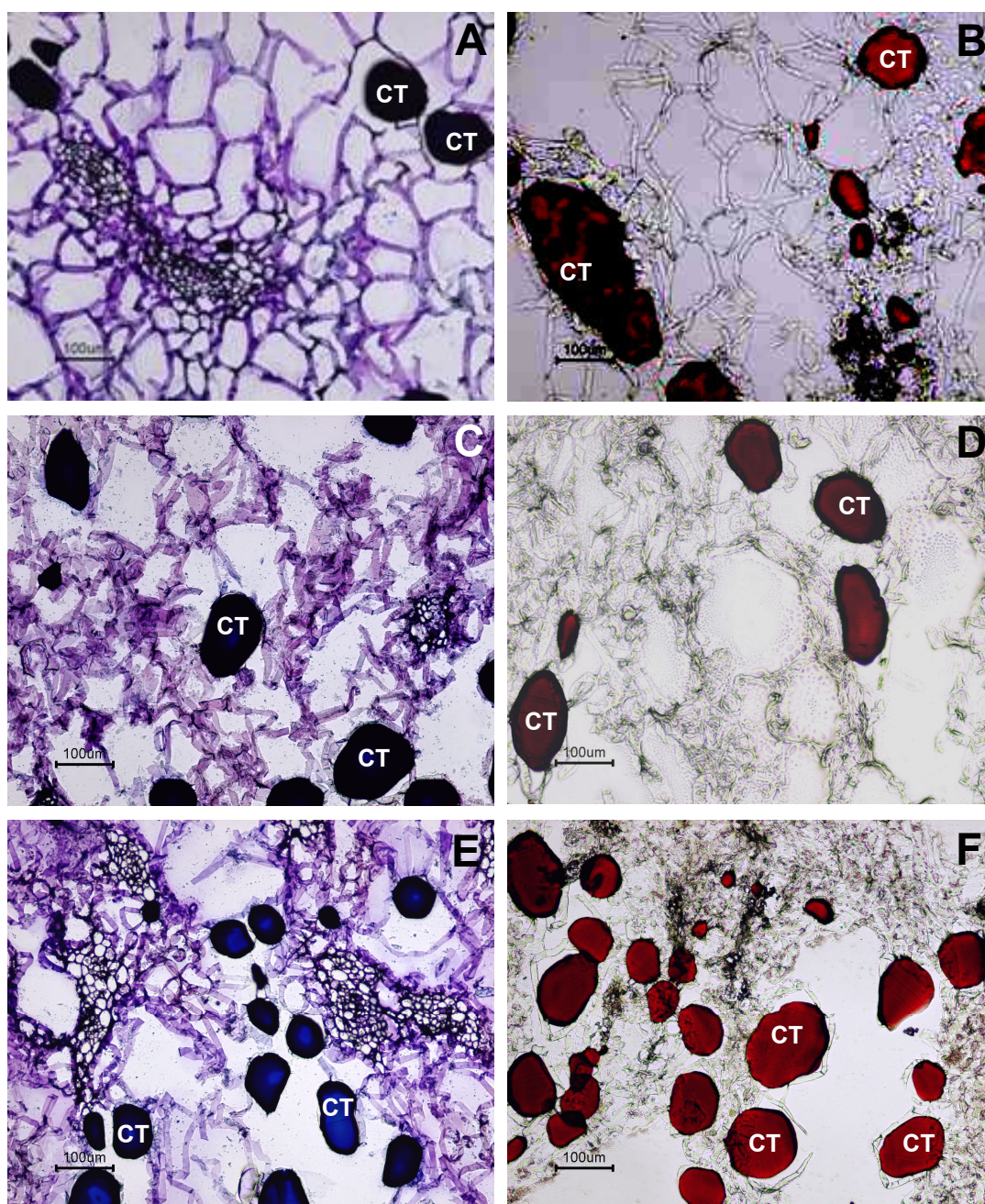


FIGURA 5. Microscopía óptica. Caqui no astringente en estado de maduración M1. Control (A, B); 200 MPa, 1 minuto (C, D); 400 MPa, 1 minuto (E, F). Tinción con azul de toluidina (A, C, E) y con vainillina-HCl (B, D, F). CT: célula tánica.

Al aplicar 200 MPa durante 1 minuto (Figura 5C y 5D), se observa mayor deformación celular y daño en las paredes celulares que en las muestras astringentes (Figura 4C), debido al efecto previo del CO₂ en el tejido (Salvador et al., 2007). Los taninos ya se encontraban polimerizados en el interior celular antes de aplicar APH, por lo que no difunden y no se aprecian taninos precipitados en el exterior celular, tal y como se observa en muestras astringentes (Figura 4). Con 400 MPa y 1 minuto, el tejido está completamente degradado, y los taninos precipitados se observan sueltos entre restos de paredes celulares (Figura 5E y 5F).

El efecto del tratamiento con APH sobre la estructura de caquis en estado de maduración M2 es similar (imágenes no mostradas), aunque el tejido de las muestras control está más deteriorado, tanto en muestras astringentes como no astringentes, por el avance del proceso de maduración.

Al tratar con 200 MPa durante un minuto se observan taninos precipitados fuera de las células tánicas en las muestras astringentes, aunque menos que en el estado de maduración M1. Esto puede indicar que ya había parte de los taninos precipitados en el interior de las células por el proceso intrínseco de maduración y, por tanto, la dispersión de los taninos solubles se produce en menor grado. Un efecto similar se aprecia al comparar las muestras tratadas a 400 MPa durante un minuto en los estados de maduración M1 y M2. En la Figura 6 se aprecia que, aunque el tejido está altamente degradado después de aplicar APH, en las muestras recolectadas en el estado de maduración M2 prácticamente no se distinguen taninos dispersos en los espacios intercelulares.

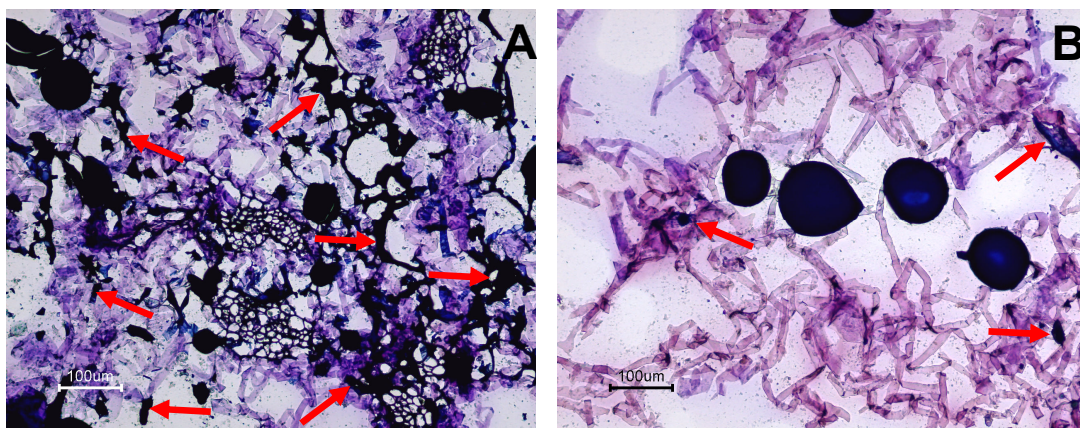


FIGURA 6. Microscopía óptica. Caqui astringente tratado con 400 MPa durante 1 minuto. A: estado de maduración M1; B: estado de maduración M2. Tinción con azul de toluidina. Flechas: taninos precipitados en espacios intercelulares.

A la vista de los resultados, se deduce que el tratamiento con APH realmente influye en la biodisponibilidad de las sustancias tánicas en el caqui, en el caso que éste no haya sido sometido a tratamientos con CO₂. Hay que tener en cuenta que la polimerización de taninos que tiene lugar debido al tratamiento con CO₂, tal y como ha sido descrita (Matsuo y Ito, 1982; Oshida et al., 1996), se trata de una polimerización química en la que se establecen enlaces covalentes, lo que en principio dificultaría su resolubilización.

MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL DE BARRIDO

La observación de las muestras en el microscopio láser confocal de barrido permite distinguir una serie de cuerpos autofluorescentes en las muestras de caqui. En un estudio sobre la cuantificación de carotenoides mediante autofluorescencia en levaduras, An y colaboradores concluyeron que mediante excitación con un láser de ión argón de 488 nm, la autofluorescencia a longitudes de onda mayores de 515 nm era debida principalmente a carotenoides (An et al., 2000).

En la Figura 7A, se observa tejido celular de caqui astringente donde las paredes celulares emiten fluorescencia y asociados se distinguen, con un verde más intenso, cuerpos esféricos también autofluorescentes, que se identifican con sustancias carotenoides. Si estas mismas secciones se observan por microscopía óptica, se aprecian los carotenoides distribuidos homogéneamente por el tejido con su color amarillo-anaranjado característico (Figura 7B). A más detalle (Figura 7C), se observa que realmente, estas sustancias carotenoides se encuentran asociadas a las paredes celulares, agrupadas en cuerpos esféricos (cromoplastos) de, aproximadamente, 15 μm de diámetro. Aparentemente, están rodeadas de una membrana. PC: pared celular.

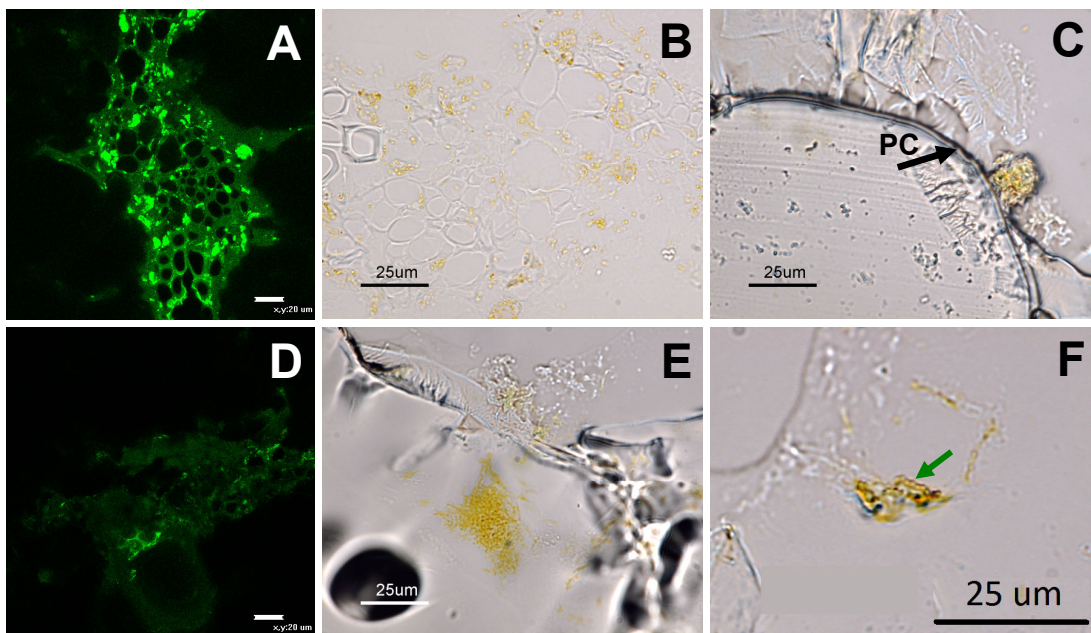


FIGURA 7. Observación de carotenoides en tejido parenquimático de caqui astringente en estado de maduración M1. Control (A, B, C); 400 MPa, 3 minutos (D, E, F). Imágenes de microscopía láser confocal de barrido (A, D) y microscopía óptica (B, C, E, F). Flecha verde: cadena de glóbulos de carotenoides; PC: pared celular.

El efecto de las APH sobre las paredes celulares, tal y como se ha visto anteriormente, explicaría que la emisión de fluorescencia de las mismas se observe ahora más difuminada, distinguiéndose con un verde más brillante, únicamente, las concentraciones de carotenoides (Figura 7D). La autofluorescencia típica de las paredes celulares se pierde después del

tratamiento con APH por efecto de degradación y solubilización de sus componentes observado en este trabajo (subapartado *Cryo-SEM*). En la Figura 7E, se observa con microscopía óptica cómo la presión favorece la difusión de las sustancias carotenoides desde los cromoplastos, cuya membrana debe haber sido dañada por el tratamiento. A más detalle (Figura 7F), se observa que, aparentemente, los carotenoides deben estar a su vez agrupados constituyendo pequeñas estructuras redondeadas de 0,75 μm , aproximadamente, que se asocian formando cadenas en el interior de los cromoplastos.

Sólidos solubles totales

En la Tabla 1 se presentan las medias de los valores de sólidos solubles totales (SST) con su correspondiente desviación estándar, indicando las diferencias significativas entre las mismas. En los frutos control, tanto M1 como M2, el contenido de SST es, aproximadamente, 17 °Brix en las muestras astringentes y 15-16 °Brix en las no astringentes. En ambos estados de maduración se observa un descenso significativo de SST tras el tratamiento con CO_2 , que se relaciona con la insolubilización de taninos y consecuente pérdida de astringencia (Arnal y Del Río, 2003; Salvador et al., 2004; Salvador et al., 2005; Salvador et al., 2007; Besada et al., 2008; Igual et al., 2008; Del Bubba et al., 2009).

TABLA 1. Sólidos solubles totales (°Brix) de muestras de caqui astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 y M2. Los valores presentados constituyen el promedio de tres determinaciones con su desviación estándar.

		ESTADO DE MADURACIÓN M1		ESTADO DE MADURACIÓN M2	
		Astringente	No astringente	Astringente	No astringente
Control		16,94 \pm 0,85 ^{a*}	15,23 \pm 1,01 ^a	17,00 \pm 0,44 ^{a*}	15,83 \pm 0,15 ^a
200 MPa	1 min	15,30 \pm 0,24 ^{bc}	15,20 \pm 0,18 ^a	16,33 \pm 0,21 ^{b*}	16,97 \pm 0,15 ^b
	3 min	15,40 \pm 0,47 ^{bc}	14,91 \pm 0,57 ^{ab}	16,50 \pm 0,21 ^{bc*}	17,60 \pm 0,25 ^c
	6 min	14,60 \pm 0,49 ^d	15,00 \pm 0,64 ^{ab}	16,93 \pm 0,16 ^{ac}	16,73 \pm 0,27 ^d
400 MPa	1 min	14,83 \pm 0,29 ^{cd*}	14,33 \pm 0,33 ^b	16,67 \pm 0,16 ^{abc*}	16,20 \pm 0,13 ^e
	3 min	15,40 \pm 0,63 ^{bc}	14,83 \pm 0,98 ^{ab}	17,70 \pm 0,93 ^{d*}	17,07 \pm 0,16 ^b
	6 min	15,78 \pm 0,35 ^{b*}	15,03 \pm 0,23 ^{ab}	17,10 \pm 0,21 ^{a*}	16,50 \pm 0,21 ^f

Los valores de una misma columna sin letra en común tienen diferencias significativas ($p < 0,05$). La presencia de asterisco implica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, la muestra astringente tiene diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la no astringente.

La aplicación de APH en frutos M1 provocó un descenso significativo de SST en las muestras astringentes hasta valores similares a los de las muestras control no astringentes; esto podría atribuirse al efecto de las altas presiones (200 ó 400 MPa) sobre la precipitación de los taninos solubles, tal

y como se ha observado en el estudio microestructural (ver subapartado de *Cryo-SEM*, Figura 1). Las muestras no astringentes no experimentaron variación en el contenido de SST. Así, la aplicación de 200-400 MPa a frutos de caqui “Rojo Brillante” astringente produce un descenso de sólidos solubles, principalmente taninos, de forma equivalente al ocasionado durante el tratamiento de desastringencia con CO₂.

En frutos M2, el contenido en SST de las muestras tratadas con APH fue superior al de las correspondientes muestras M1. Esto se atribuye a la rotura de paredes y membranas celulares ocasionada por la aplicación de APH (ver apartado de *Estudio microestructural*), que favorece la solubilización de determinadas sustancias cuya concentración en el fruto aumenta según avanza el proceso de maduración (azúcares, sustancias pécticas de la pared celular, etc).

El análisis multifactorial de la varianza para SST permite concluir que tanto los efectos simples de los factores considerados (astringencia, estado de maduración, presión aplicada y duración del tratamiento) como tres de sus interacciones afectan significativamente ($p < 0,05$) a la variable respuesta SST con un nivel de confianza del 95%. Dado que las interacciones son estadísticamente significativas, es más conveniente llevar a cabo un estudio de éstas en vez de analizar los efectos simples por separado.

En primer lugar, la presión afecta al contenido en SST de manera distinta según el caqui sea astringente o no astringente (Figura 8A). Al aumentar la presión, el contenido en SST disminuye en las muestras no astringentes, mientras que aumenta significativamente en las astringentes. Además, el contenido en SST también varía según la presión aplicada en función del estado de maduración del caqui (Figura 8B).

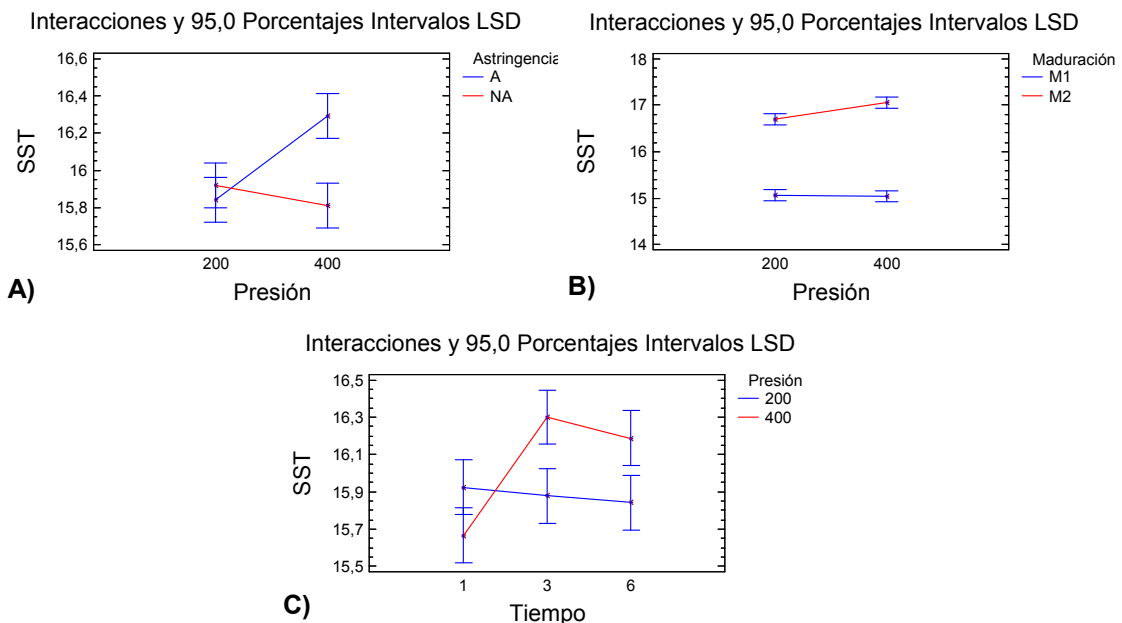


FIGURA 8. Gráficos de interacciones significativas para la variable respuesta SST considerando intervalos LSD. A: interacción entre astringencia y presión aplicada; B: interacción entre estado de maduración y presión aplicada; C: interacción entre presión aplicada y duración del tratamiento.

También se concluye que la influencia de la presión aplicada depende de la duración del tratamiento (Figura 8C). Mientras que a 200 MPa el valor de SST se mantiene sin cambios significativos independientemente del tiempo de aplicación, a 400 MPa el valor de SST aumenta con tiempos largos (3 y 6 minutos). Esto puede atribuirse a una mayor degradación de las paredes y membranas celulares y a una mejor difusión de solutos a altas presiones.

Propiedades texturales

FIRMEZA

La firmeza es un parámetro de calidad fundamental en caqui. En este estudio, se consideran como aptos para el consumo aquellos valores de firmeza superiores a 2,5 N (Arnal y del Río, 2004; Salvador et al., 2004). Las muestras M1 tienen una firmeza en torno a 10,8 N, mientras que en las M2 los valores están entre 3 y 4 N (Tabla 2), valores coherentes con estudios previos (Salvador et al., 2004; Salvador et al., 2005; Salvador et al., 2007; Besada et al., 2008; Igual et al., 2008). Este ablandamiento durante la maduración está asociado a la solubilización e hidrólisis de las sustancias pécticas de la pared celular debido a la actividad de enzimas como la pectinmetilesterasa (PME) y poligalacturonasa (PG) (Artés et al., 1996; Brummell y Labavitch, 1997).

TABLA 2. Firmeza (N) de muestras de caqui astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 y M2. Los valores presentados constituyen el promedio de ocho determinaciones con su desviación estándar.

		ESTADO DE MADURACIÓN M1		ESTADO DE MADURACIÓN M2	
		Astringente	No astringente	Astringente	No astringente
Control		10,871 ± 1,024 ^a	10,832 ± 1,442 ^a	2,925 ± 0,364 ^{a*}	3,935 ± 0,438 ^a
200 MPa	1 min	3,124 ± 0,454 ^{b*}	6,467 ± 1,377 ^b	1,955 ± 0,774 ^b	1,738 ± 0,504 ^b
	3 min	3,563 ± 0,856 ^{bc*}	5,957 ± 0,652 ^{bc}	1,275 ± 0,322 ^{cd*}	0,829 ± 0,224 ^c
	6 min	4,699 ± 1,205 ^d	5,155 ± 1,040 ^{cd}	1,605 ± 0,574 ^{bc}	1,479 ± 0,593 ^b
400 MPa	1 min	3,088 ± 0,626 ^{be*}	4,380 ± 0,512 ^{de}	0,994 ± 0,123 ^{d*}	0,565 ± 0,272 ^c
	3 min	2,342 ± 0,657 ^e	3,022 ± 0,880 ^f	0,856 ± 0,201 ^d	0,670 ± 0,181 ^c
	6 min	3,923 ± 0,668 ^{cd}	3,672 ± 0,591 ^{ef}	1,040 ± 0,389 ^{d*}	0,602 ± 0,199 ^c

Los valores de una misma columna sin letra en común tienen diferencias significativas ($p < 0,05$). La presencia de asterisco implica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, la muestra astringente tiene diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la no astringente.

Los tratamientos de APH provocaron una disminución de la firmeza en ambos estados de maduración. En frutos M1, al aplicar 200 MPa durante tiempos cortos (1 y 3 minutos), las muestras astringentes muestran un valor

de firmeza significativamente inferior con respecto a las tratadas con CO₂. Esto puede deberse a que al aplicar la presión tiene lugar rotura de membranas y paredes celulares que provocan una pérdida de turgor y la consecuente liberación del contenido celular (Knorr, 1995). Los espacios intercelulares se llenan de líquido procedente del interior de las células (Préstamo y Arroyo, 1998), en mayor medida en las muestras no astringentes, ya parcialmente afectadas por el tratamiento con CO₂. Probablemente, la resistencia que opone el tejido con los intersticios completamente anegados es superior al de aquel que aún conserva espacios rellenos de aire, hasta que llega un momento en que los tejidos están tan degradados que este efecto no es significativo. Además, las pectinas procedentes de las paredes celulares tienen la capacidad de formar una red tipo gel con iones divalentes como Ca²⁺ y Mg²⁺ (Basak y Ramaswamy, 1998) y el caqui contiene en su composición 6,5 y 9 mg de calcio y magnesio por cada 100 gramos de fruta fresca, respectivamente (Park et al., 2006), por lo que también podría atribuirse a este hecho el fortalecimiento de la estructura.

En las muestras M2, la tendencia es equivalente a las M1 y presentan, en cualquier caso, valores de firmeza inferiores a las de las muestras M1.

Al realizar el análisis multifactorial de la varianza para la firmeza y considerar las interacciones significativas ($p < 0,05$) se observa, en primer lugar, que según el estado de maduración varía la influencia de la presión aplicada sobre la firmeza (Figura 9A). Al aplicar 400 MPa se produce una disminución de la firmeza con respecto a los valores a 200 MPa. No obstante, esta disminución es más pronunciada en las muestras M1.

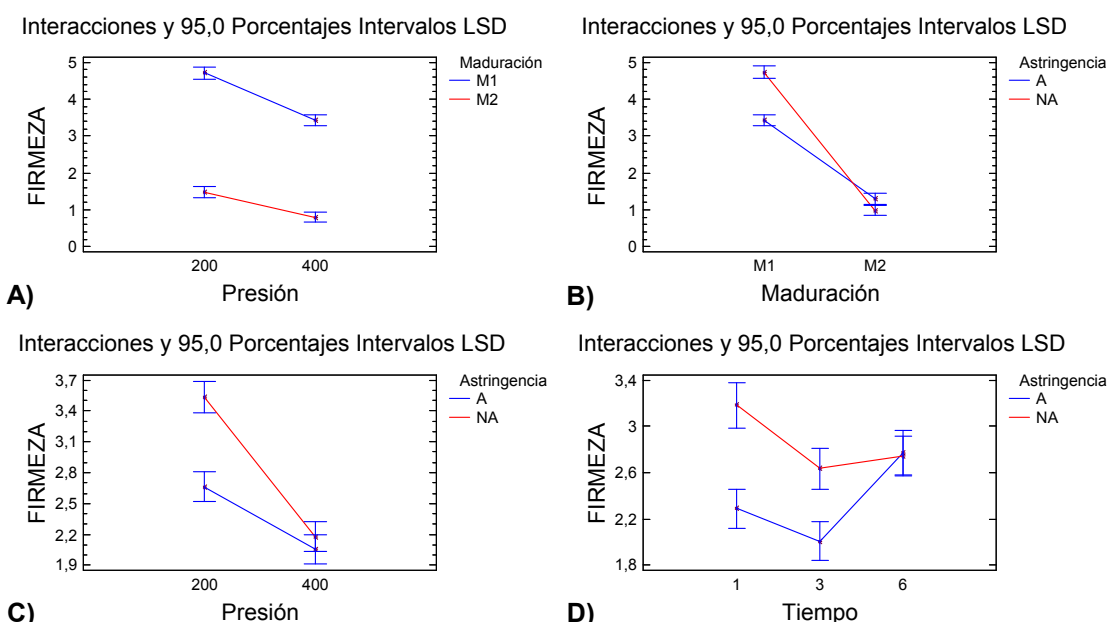


FIGURA 9. Gráficos de interacciones significativas para la variable respuesta firmeza considerando intervalos LSD. A: interacción entre maduración y presión aplicada; B: interacción entre astringencia y estado de maduración; C: interacción entre astringencia y presión aplicada; D: interacción entre astringencia y duración del tratamiento.

Además, el estado de maduración determina qué influencia tiene el tratamiento de desastringencia sobre la firmeza (Figura 9B), de forma que únicamente en el estado de maduración M1, las muestras no astringentes tienen significativamente más firmeza que las astringentes.

También se observa interacción significativa entre la astringencia y la presión aplicada. A 200 MPa las muestras no astringentes tienen mayor proporción de cavidades sin aire y por ello la firmeza es mayor, mientras que a 400 MPa el daño celular es tan acusado que este fenómeno no es significativo y tanto las muestras astringentes como las no astringentes poseen valores de firmeza similares (Figura 9C).

Por último, la duración del tratamiento de APH también influye sobre el efecto de la astringencia en la firmeza (Figura 9D). Así, cuando el tiempo de aplicación de APH es largo (6 minutos), el efecto sobre la estructura se haría homogéneo en caquis tanto astringentes como no astringentes e independiente de la presión aplicada (200 ó 400 MPa).

COHESIVIDAD

Las muestras M2 presentan valores de cohesividad menores a los de las muestras en estado de maduración M1. Además, las muestras astringentes tienen una cohesividad significativamente mayor que las no astringentes en los dos estados de maduración (Tabla 3).

Al aplicar APH a las muestras M1, se produce una disminución de la cohesividad que podría atribuirse a la rotura de paredes y membranas celulares y la separación entre células. Muestras no astringentes tratadas a 200 MPa durante 3 ó 6 minutos mantienen valores similares a las muestras sin tratar.

TABLA 3. Cohesividad de muestras de caqui astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 y M2. Los valores presentados constituyen el promedio de ocho determinaciones con su desviación estándar.

		ESTADO DE MADURACIÓN M1		ESTADO DE MADURACIÓN M2	
		Astringente	No astringente	Astringente	No astringente
Control		0,093 ± 0,011 ^{a*}	0,079 ± 0,006 ^a	0,063 ± 0,007 ^{a*}	0,041 ± 0,010 ^a
200 MPa	1 min	0,060 ± 0,010 ^b	0,050 ± 0,009 ^b	0,054 ± 0,005 ^b	0,059 ± 0,007 ^b
	3 min	0,057 ± 0,010 ^{bc*}	0,075 ± 0,009 ^{ac}	0,082 ± 0,013 ^{c*}	0,055 ± 0,009 ^b
	6 min	0,056 ± 0,006 ^{bc*}	0,070 ± 0,009 ^{cd}	0,071 ± 0,007 ^{ad*}	0,057 ± 0,009 ^b
400 MPa	1 min	0,052 ± 0,002 ^{c*}	0,064 ± 0,010 ^{de}	0,063 ± 0,010 ^{a*}	0,087 ± 0,005 ^c
	3 min	0,058 ± 0,003 ^{bc}	0,057 ± 0,006 ^{be}	0,067 ± 0,007 ^{ad*}	0,083 ± 0,010 ^c
	6 min	0,058 ± 0,004 ^{bc}	0,056 ± 0,006 ^{be}	0,072 ± 0,008 ^{d*}	0,086 ± 0,011 ^c

Los valores de una misma columna sin letra en común tienen diferencias significativas ($p < 0,05$). La presencia de asterisco implica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, la muestra astringente tiene diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la no astringente.

En el estado de maduración M2, en cambio, las muestras astringentes tratadas por APH mantienen o incluso aumentan los valores de cohesividad con respecto a las muestras sin tratar y en las muestras no astringentes se produce también un incremento generalizado de la cohesividad, que resulta especialmente elevado al aplicar 400 MPa. Algunos autores (Basak y Ramaswamy, 1998) han relacionado el aumento de cohesividad en otras frutas con la formación de redes tipo gel entre pectinas e iones divalentes.

CONCLUSIONES

El tratamiento de APH ejerce un importante efecto sobre la estructura del caqui, afectando a la integridad de las paredes y membranas celulares. Se produce la difusión de componentes desde el interior de las células a los espacios intercelulares, aumentando así su biodisponibilidad. Gran parte de los taninos solubles difunden fuera de las vacuolas, las sustancias carotenoides son liberadas desde los cromoplastos y la degradación de paredes celulares tiene como consecuencia el aumento del componente de fibra dietética soluble.

El tratamiento de desastringencia con CO₂, el estado de maduración y la duración del tratamiento de APH determinan cambios estructurales en el caqui que se manifiestan en una disminución firmeza.

La optimización del tratamiento con APH podría suponer la eliminación del tratamiento con CO₂ en el procesado del caqui "Rojo Brillante", astringente después de la recolección, ya que produce la precipitación de los taninos, a los que se atribuye esta propiedad sensorial.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación por el apoyo económico (proyecto AGL2008-04798-C02-02) y la beca FPU otorgada a José Luis Vázquez Gutiérrez. También agradecen a la Agrupación Nacional de Exportación de Cooperativas Citrícolas (ANECOOP) y al Instituto del Frio-CSIC por el abastecimiento y procesado de las muestras, respectivamente.

REFERENCIAS

- Aguado Laza, C. "Los deberes del caqui", [en línea]. *Las Provincias*: 1 de marzo de 2009. Dirección URL: <http://www.lasprovincias.es>. [Consulta: 26 de Mar. 2010].
- An, G.-H.; Suh, O.-S.; Kwon, H.-C.; Kim, K.; Johnson, E.A. 2000. Quantification of carotenoids in cells of *Phaffia rhodozyma* by autofluorescence. *Biotechnology Letters*, 22: 1031-1034.
- Arnal, L.; Del Río, M.A. 2003. Removing astringency by carbon dioxide and nitrogen enriched atmospheres in persimmon fruit cv. "Rojo Brillante". *Journal of Food Science*, 68: 1516-1518.
- Arnal, L.; Del Río, M.A. 2004. Effect of cold storage and removal astringency on quality of persimmon fruit (*Diospyros kaki*, L.) cv. Rojo Brillante. *Food Science and Technology International*, 10(3): 179-185.

- Artés, F.; Cano, A.; Fernandez-Trujillo, J.P. 1996. Pectolytic enzyme activity during intermittent warming storage of peaches. *Journal of Food Science*, 61(2): 311-314.
- Basak, S.; Ramashamy, H. 1998. Effect of High Pressure Processing on the texture of selected fruits and vegetables. *Journal of Texture Studies*, 29: 587-601.
- Besada, C.; Arnal, L.; Salvador, A. 2008. Improving storability of persimmon cv. Rojo Brillante by combined use of preharvest and postharvest treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 50(2-3): 169-175.
- Brummell, D.A.; Labavitch, J.M. 1997. Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates. *Plant Physiology*, 115: 717-725.
- Cano, M.P., De Ancos, B. 2005. Advances in use of high pressure to processing and preservation of plant foods. En: Barbosa-Cánovas, G.V., Tapia, M.S., Cano, M.P. (eds). *Novel Food Processing Technologies*. CRC Press, Boca Ratón, FL, EEUU, 453-477.
- Cheftel, J.C. 1992. Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. En: Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P. (eds). *High Pressure and Biotechnology*. Colloque Inserm, London. John Libbery Eurotext Ltd, Earnshaw, 195-209.
- De Ancos, B.; Gonzalez, E.; Cano, M.P. 2000. Effect of High-Pressure Treatment on the Carotenoid composition and the Radical Scavenging Activity of Persimmon Fruit Purees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3542-3548.
- Del Bubba, M.; Giordani, E.; Pippucci, L.; Cincinelli, A.; Checchini, L.; Galvan, P. 2009. Changes in tannins, ascorbic acid and sugar content in astringent persimmons during on-tree growth and ripening and in response to different postharvest treatments. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(7-8): 668-677.
- Gorinstein, S.; Zachwieja, Z.; Folta, M.; Barton, H.; Piotrowicz, J.; Zemser, M.; Weisz, M.; Trakhtenberg, S.; Martin-Belloso, O. 2001. Comparative contents of dietary fiber, total phenolics and minerals in persimmon and apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 952-957.
- Gottreich, M.; Blumenfeld, A. 1991. Light microscopic observations of tannin cell walls in persimmon fruit. *Journal of Horticultural Science*, 66(6): 731-736.
- Hogan, E., Kelly, A., Sun, D.W. 2005. High pressure processing of foods: an overview. En: Sun, D.W. (ed). *Emerging Technologies for Food Processing*. Elsevier Academic Press, Londres, UK, 3-32.
- Igual, M.; Castelló, M.L.; Ortolá, M.D.; Andrés, A. 2008. Influence of vacuum impregnation on respiration rate, mechanical and optical properties of cut persimmon. *Journal of Food Engineering*, 86(3): 315-323.
- Knorr, D. 1995. High pressure effects on plant derived foods. En: Ledward, D.A., Johnstone, D.E., Earnshaw, R.G., Hasting, A.P.M. (eds). *High Pressure Processing of Foods*. University Press, Nottingham, 123-135.
- Matsuo, T.; Ito, S. 1982. A model experiment for deastringency of persimmon fruit with high carbon dioxide: in vitro gelation of kaki-tannin by reacting with acetaldehyde. *Agriculture and Biological Chemistry*, 46: 683-689.
- Nakatsubo, F.; Enokita, K.; Murakami, K.; Yonemori, K.; Sungiura A.; Utsumoniya, N.; Subhadrabadhu, S. 2002. Chemical structures of the condensed tannins in the fruits of *Diospyros* species. *Journal of Wood Science*, 48: 414-418.
- Oshida, M.; Yonemori, K.; Sugiura, A. 1996. On the nature of coagulated tannins in astringent-type persimmon fruit after an artificial treatment of astringency removal. *Postharvest Biology and Technology*, 8: 317-327.
- Parada, J.; Aguilera, J.M. 2007. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2): 1317-1323.
- Park, Y.-S.; Jung, S.-T.; Kang, S.-G.; Delgado-Licon, E.; Martinez Ayala, A.L.; Tapia, M.S.; Martin-Belloso, O.; Trakhtenberg, S.; Gorinstein, S. 2006. Drying of persimmons (*Diospyros kaki* L.) and the following changes in the studied bioactive compounds and the total radical scavenging activities. *LWT*, 39: 748-755.
- Patterson, M. 2000. High pressure treatments of foods. En: Robinson, T.K., Batt, C.A., Patel, P.D. (eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, San Diego, USA, 1059-1060.

- Pérez-Munuera, I.; Quiles, A.; Larrea, V.; Arnal, L.; Besada, C.; Salvador, A. 2009a. Microstructure of persimmon treated by hot water to alleviate chilling injury. *Acta Horticulturae*, 833: 251-256.
- Pérez-Munuera, I.; Hernando, I.; Larrea, V.; Besada, C.; Arnal, L.; Salvador, A. 2009b. Microstructural study of chilling injury alleviation by 1-methylcyclopropene in persimmon. *HortScience*, 44(3): 742-745.
- Préstamo, G.; Arroyo, G. 1998. High Hydrostatic Pressure effects on vegetable structure. *Journal of Food Science*, 63(5): 878-881.
- Rastogi, N.D.; Raghavarao, K.M.S.; Balasubramaniam, V.M.; Niranja, K.; Knorr, D. 2007. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47: 69-112.
- Salvador, A.; Arnal, L.; Monterde, A.; Cuquerella, J. 2004. Reduction of chilling injury symptoms in persimmon fruit cv. 'Rojo Brillante' by 1-MCP. *Postharvest Biology and Technology*, 33(3): 285-291.
- Salvador, A.; Arnal, L.; Monterde, A.; Martínez-Jávega, J.M. 2005. Influence of ripening stage at harvest on chilling injury symptoms of persimmon cv. Rojo Brillante stored at different temperatures. *Food Science and Technology International*, 11(5): 359-365.
- Salvador, A.; Arnal, L.; Besada, C.; Larrea, V.; Quiles, A.; Pérez-Munuera, I. 2007. Physiological and structural changes during ripening and deastringency treatment of persimmon fruit cv. "Rojo Brillante". *Postharvest Biology and Technology*, 46: 181-188.
- Salvador, A.; Arnal, L.; Besada, C.; Larrea, V.; Hernando, I.; Pérez-Munuera, I. 2008. Reduced effectiveness of the treatment for removing astringency in persimmon fruit when stored at 15 °C: Physiological and microstructural study. *Postharvest Biology and Technology*, 49: 340-347.
- Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds, nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1094-1117.
- Torres, J.A.; Velazquez, G. 2005. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, 67: 95-112.
- Wright K.P.; Kader, A.A. 1996. Effect of controlled-atmosphere storage on the ascorbate content and quality of strawberries and persimmons. *Postharvest Biology and Technology*, 10: 89-97.