

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA Y
GESTIÓN ALIMENTARIA**



**EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES
HIDROSTÁTICAS SOBRE LA ESTRUCTURA
Y ESTABILIDAD DE TEJIDOS VEGETALES.
RELACIÓN CON LA EXTRACTABILIDAD DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

José Luis Vázquez Gutiérrez

Dirigida por:

Dra. Isabel Hernando Hernando

Dra. Amparo Quiles Chuliá

Valencia, Julio 2012



ISABEL HERNANDO HERNANDO, CATEDRÁTICA DE UNIVERSIDAD, Y AMPARO QUILES CHULIÁ, TITULAR DE UNIVERSIDAD, AMBAS DEL DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA,

CONSIDERAMOS: que la memoria titulada **Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la estructura y estabilidad de tejidos vegetales. Relación con la extractabilidad de compuestos bioactivos**, que presenta Don José Luis Vázquez Gutiérrez, para aspirar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia, y que ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Grupo de Investigación de Microestructura y Química de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia, reúne las condiciones adecuadas para constituir su tesis doctoral, por lo que

AUTORIZAMOS al interesado su presentación

Valencia, España, a 14 de junio de 2012

Isabel Hernando Hernando

Amparo Quiles Chuliá

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mis directoras Isabel Hernando y Amparo Quiles por su esfuerzo constante, por sacar tiempo y ánimos de donde no había para conseguir que esta tesis sea lo que es hoy. A ti Isabel por darme la primera oportunidad de trabajar con gente tan maravillosa hace mucho tiempo y no dejar de creer en mí. A ti Amparo por tu dedicación incondicional, por tu positividad y tu fuerza. A las dos gracias por vuestros consejos y apoyo, tanto profesionales como personales.

A ti, Isabel, mi directora original, porque sin ti este trabajo no hubiera sido posible, porque no sabes cuánto desearía que pudieras ver el resultado del entusiasmo e ilusión que ponías en este proyecto y en todo lo que emprendías, por todo lo que me enseñaste en todos los sentidos, porque no has dejado de acompañarme ni un solo día y estás en cada una de las páginas de esta tesis.

Gracias a la doctora Pilar Cano por sus labores de coordinación del proyecto AGL2008-04798-C02-02, dentro del cual se enmarca el trabajo de investigación llevado a cabo en esta tesis.

Gracias a las doctoras Begoña de Ancos, Lucía Plaza, Concepción Sánchez, M^a Dolores Rodrigo y M^a Nieves Criado y a Rubén Domínguez por hacer posible el procesado de las muestras. Gracias a Gussiel, María y Lucía por su esfuerzo y por compartir tantas horas de preparación de muestras.

Gracias a Anecoop y Vilodi S.A. por el abastecimiento de los vegetales estudiados.

Gracias al Ministerio de Ciencia e Innovación por el apoyo económico (proyecto AGL2008-04798-C02-02) y por la concesión de mi beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) para la realización de mi tesis doctoral.

A Diane Barrett por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación durante unos meses y poder vivir así una experiencia inolvidable y enriquecedora en todos los sentidos.

Al resto de tunantes del lab por hacer de estos años en el laboratorio algo tan especial. A Ana por su eterna sonrisa, a Empar por sus palmadas y por resolver siempre todas las dificultades, a Virginia por su alegría, a Juanvi por su ayuda y por hacernos reír con sus historias, a Laura y Raquel por sus consejos y ayuda en mis comienzos en el laboratorio, a Carmen por su amabilidad y buen humor.

A mis amigos y compañeros becarios. Gracias María por no dejar que el Folin acabara conmigo, ayudarme en los momentos clave, por acompañarme en el procesado de las muestras contra viento y marea, por tus consejos de estadística y por no fallar nunca. Gracias Luis por tus consejos, por hacer el día a día más entretenido con tus despistes y por tu gran fondo. Gracias Julia por tu espíritu positivo e inquieto, por mantenerme con energía gracias a tus bizcochos y por tus buenas ideas. Gracias a los tres por vuestra amistad y por ayudarme en la sombra durante todo el camino.

Al resto de amigos y compañeros con los que he tenido la oportunidad de compartir el día a día del laboratorio, a Veronika, Stefano, Cristian, Eli, Lilia, Indira, Annamaría y Vero por acabar apreciando Valencia y este laboratorio tanto como los quiero yo y dejarnos un pedacito de cada uno. Gracias a M^a Ángeles y Aída por su dedicación y ayuda en este trabajo. Gracias a los que también han compartido el día a día en el laboratorio conmigo, María, Nacho, Mar, Jaime, Olga, Pere y Alex.

A los ‘aspados’ por deleitarme desde arriba con sus silenciosos experimentos. A Carmina, César, Edith, Julián, Jader, Marga, Jaime y Jaume por compartir tantas risas, cervezas y buenos momentos.

Al resto de personas que llegaron en algún momento de mi vida y decidieron quedarse para regalarme algo tan valioso como su amistad, que no entiende de crisis ni primas de riesgo y porque no hay mejor forma de sertirse rico que compartiendo el tiempo con ellas. Gracias por aguantar mis malos ratos y reír conmigo en los buenos. A Amparo, Cris, Sara, Peri, Sara, y Bea por seguir compartiendo la amistad y las risas, y por las que nos quedan. Gracias a María por tu arte, a Amada por tus portés, a Melani por tu cariño, a Anica por tu buen humor, a Rosana y Amparocu por vuestra hospitalidad, a Sergio por tus buenos consejos y apoyo, a Rita por no dejar de estar ahí y ayudarme siempre.

Muchas gracias a mi familia, la mejor del mundo. Gracias a mis padres por su paciencia y apoyo, por no dejar de quererme ni un solo momento, porque les debo todo y por darme la oportunidad de sentirme tan afortunado de tener unos padres como ellos. Gracias a mis hermanos/as y cuñados/as por sus consejos, apoyo y por preocuparse por mí, aunque no les quede muy claro lo que he estado haciendo durante todos estos años en el laboratorio. Ya sabéis lo importantes que sois para mí. Gracias a mis sobrinos por su cariño desinteresado y su alegría.

A ti Alex por ser siempre mi sonrisa y mi sol hasta en los días más nublados, porque todos tenemos un por qué y tú eres el mío.



RESUMEN

El procesado por alta presión hidrostática (APH) consiste en la aplicación de presión al alimento con una intensidad que puede variar entre 50 y 1000 MPa. La tecnología APH se considera una de las más viables económicamente dentro de las tecnologías no térmicas y permite la obtención de alimentos seguros y saludables con una elevada calidad sensorial y organoléptica. La mayoría de los estudios realizados sobre el potencial y las limitaciones del procesado de alimentos con APH se han centrado en la inactivación microbiana y enzimática. Sin embargo, el efecto que ejerce esta tecnología sobre la microestructura y los componentes nutricionales, vitaminas y compuestos bioactivos de los alimentos ha sido menos estudiado. El efecto beneficioso de los nutrientes y compuestos bioactivos presentes en los alimentos vegetales depende de su biodisponibilidad, que a su vez, depende de muchos factores, como la variedad, madurez, situación y estructura de la matriz vegetal, interacción con otros componentes, procesado del alimento, etc. En este sentido, el procesado con APH podría influir en la extractabilidad y biodisponibilidad de este tipo de compuestos. Por todo ello, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es avanzar en el conocimiento de la relación entre la microestructura del tejido vegetal y la mejora de la funcionalidad (extractabilidad) de sus componentes bioactivos mediante la aplicación de APH. En este trabajo, como productos vegetales modelo se han seleccionado un fruto, el caqui (*Diospyros kaki* L.f.) y una hortaliza, la cebolla (*Allium cepa* L.) por su contenido en compuestos funcionales. El caqui ‘Rojo Brillante’ ha sufrido una gran expansión en la Comunidad Valenciana y es una importante fuente de compuestos fenólicos (fundamentalmente taninos, responsables de la astringencia característica del fruto), fibra dietética y carotenoides. La cebolla, por su parte, destaca por su alto contenido en polifenoles con importante poder antioxidante. Para estudiar la microestructura de las distintas muestras vegetales sometidas a APH se han utilizado diferentes técnicas microscópicas, Microscopía Óptica (LM), Microscopía Láser Confocal de Barrido (CLSM), Microscopía Electrónica de Barrido a Bajas Temperaturas (Cryo-SEM), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). También se han analizado diversas propiedades fisicoquímicas de las muestras (contenido en taninos solubles, contenido en fenoles solubles totales, porcentaje de proteína soluble, contenido en sólidos solubles totales, pH, color y propiedades texturales).

Los resultados mostraron que el procesado con APH ejerce un importante efecto sobre la microestructura del caqui y la cebolla, afectando a la integridad de las paredes y membranas celulares. Este deterioro celular, mayor cuanto más degradado está el tejido vegetal de partida, parece provocar la difusión de componentes solubles desde el interior de las células hacia el apoplasto y por lo tanto, favorecer su extractabilidad. Las fracciones de fibra soluble y carotenoides también experimentan una mayor

dispersión por el tejido vegetal a causa del tratamiento con APH. La aplicación de APH afecta, además, a algunas propiedades físicoquímicas del vegetal como, el contenido en taninos solubles, el contenido en fenoles solubles totales, el porcentaje de proteína soluble, el contenido en sólidos solubles totales, el pH, el color y la textura. En caqui, las condiciones más adecuadas para la aplicación de APH requieren un estado de madurez temprano y ausencia de tratamiento de desastringencia, siendo los tratamientos con 200 MPa a 37.5 °C durante 3 y 6 minutos los que mejores resultados proporcionan, en cuanto a que mejoran la extractabilidad de algunos componentes y provocan una menor alteración de su microestructura y propiedades físicoquímicas. En el caso de la cebolla, aplicar 100 MPa a 50 °C o 400 MPa 25 °C durante 5 minutos resulta lo más adecuado. El almacenamiento produce en los tejidos tratados con APH degradación estructural y una evolución de las propiedades físicoquímicas estudiadas que varía dependiendo de las condiciones del tratamiento aplicado y de la duración del almacenamiento.



RESUM

El processat per alta pressió hidrostàtica (APH) consisteix en l'aplicació de pressió a l'aliment amb una intensitat que pot variar entre 50 y 1000 MPa. La tecnologia APH es considera una de las més viables econòmicament dins de las tecnologies no tèrmiques i permet l'obtenció d'aliments segurs i saludables amb una elevada qualitat sensorial y organolèptica. La majoria dels estudis realitzats sobre el potencial i les limitacions del processat d'aliments amb APH s'han centrat en la inactivació microbiana y enzimàtica. No obstant això, l'efecte que exercix esta tecnologia sobre la microestructura i els components nutricionals, vitamines i compostos bioactius dels aliments ha sigut menys estudiat. L'efecte beneficiós dels nutrients i compostos bioactius presents en els aliments vegetals depén de la seua biodisponibilitat, que a la mateixa vegada, depén de molts factors, com la varietat, maduresa, situació i estructura de la matriu vegetal, interacció amb altres components, processat de l'aliment, etc. En este sentit, el processat amb APH podria influir en l'extractabilitat i biodisponibilitat d'este tipus de compostos. Per tot això, l'objectiu principal de la present Tesi Doctoral és avançar en el coneixement de la relació entre la microestructura del teixit vegetal i la millora de la funcionalitat (extractabilitat) dels seus components bioactius per mitjà de l'aplicació d'APH. En este treball, com a productes vegetals model s'han seleccionat un fruit, el caqui (*Diospyros kaki* L.f.) i una hortalissa, la ceba (*Allium cepa* L.) pel seu contingut en compostos funcionals. El caqui 'Rojo Brillante' ha patit una gran expansió a la Comunitat Valenciana i és una important font de compostos fenòlics (fonamentalment tanins, responsables de l'astringència característica del fruit), fibra dietètica i carotenoides. La ceba, per la seua banda, destaca pel seu alt contingut en polifenols amb important poder antioxidant. Per a estudiar la microestructura de les distintes mostres vegetals sotmeses a APH s'han utilitzat diferents tècniques microscòpiques, Microscòpia Òptica (LM), Microscòpia Làser Confocal d'Escombratge (CLSM), Microscòpia Electrònica d'Escombratge a Baixes Temperatures (cryo-SEM), Microscòpia Electrònica de Transmissió (TEM) i Microscòpia Electrònica d'Escombratge (SEM). També s'han analitzat diverses propietats fisicoquímiques de les mostres (contingut en tanins solubles, contingut en fenols solubles totals, percentatge de proteïna soluble, contingut en sòlids solubles totals, pH, color i propietats texturals).

Els resultats van mostrar que el processat amb APH exercix un important efecte sobre la microestructura del caqui i la ceba, afectant la integritat de les parets i membranes cel·lulars. Este deteriorament cel·lular, major com més degradat està el teixit vegetal de partida, pareix provocar la difusió de components solubles des de l'interior de les cèl·lules cap a l'apoplast i per tant, afavorir el seu extractabilitat. Les fraccions de fibra soluble i carotenoides també experimenten una major dispersió pel teixit vegetal a causa del tractament amb APH. L'aplicació d'APH afecta, a més, a

algunes propietats fisicoquímiques del vegetal com el contingut en tanins solubles, el contingut en fenols solubles totals, el percentatge de proteïna soluble, el contingut en sòlids solubles totals, el pH, el color i la textura. En caqui, les condicions més adequades per a l'aplicació d'APH requerixen un estat de maduresa primerenc i absència de tractament de desastringència, sent els tractaments amb 200 MPa a 37.5 °C durant 3 i 6 minuts els que millors resultats proporcionen, en el fet que milloren l'extractabilitat d'alguns components i provoquen una menor alteració de la seua microestructura i propietats fisicoquímiques. En el cas de la ceba, aplicar 100 MPa a 50 °C o 400 MPa 25 °C durant 5 minuts resulta el més adequat. L'emmagatzemament produïx en els teixits tractats amb APH degradació estructural i una evolució de les propietats fisicoquímiques estudiades que varia depenent de les condicions del tractament aplicat i de la duració de l'emmagatzemament.



ABSTRACT

High hydrostatic pressure (HHP) processing consists of applying pressure to food with an intensity that can vary between 50 and 1000 MPa. HHP technology is considered one of the most economically viable within the non-thermal technologies and allows the obtention of safe and wholesome food products with a high sensory and organoleptic quality. Most studies on the potential and limitations of HHP food processing have focused on microbial and enzyme inactivation. However, the effect of this technology on the microstructure and nutritional components, vitamins and bioactive food compounds has been less studied. The beneficial effect of nutrients and bioactive compounds present in plant foods depends on their bioavailability, which in turn depends on many factors such as the variety, maturity, location and structure of the vegetable matrix, interaction with other components, processing, etc. In this regard, HHP processing may influence the extractability and bioavailability of these compounds. Therefore, the main objective of this PhD thesis is to advance in the understanding of the relationship between the microstructure of plant tissue and improved functionality (extractability) of their bioactive compounds by applying HHP. In this work, a fruit, persimmon (*Diospyros kaki* L.f.) and a vegetable, onion (*Allium cepa* L.) have been selected as model plant products because of their content of functional compounds. Persimmon 'Rojo Brillante' has undergone a major expansion in the Valencian Community and is an important source of phenolic compounds (mainly tannins, responsible for the characteristic astringency of the fruit), dietary fiber and carotenoids. Onions, meanwhile, noted for their high content of polyphenols with significant antioxidant activity. To study the microstructure of the different plant samples submitted to HHP different microscopic techniques have been used, Optical Microscopy (LM), Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM), Scanning Electron Microscopy at Low Temperatures (cryo-SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM) and Scanning Electron Microscopy (SEM). Several physicochemical properties of the samples have also been examined (soluble tannin content, total soluble phenol content, soluble protein percentage, total soluble solids content, pH, color and textural properties).

The results showed that HHP processing has an important effect on the microstructure of persimmon and onion, affecting the integrity of cell walls and membranes. This cell damage is greater as more degraded is the starting plant tissue and it seems to cause diffusion of soluble components from the interior of the cells into the apoplast and thus favor their extractability. The soluble fiber and carotenoid fractions also experience greater dispersion throughout the plant tissue caused by the HHP treatment. The application of HHP also affects some physicochemical properties of the plant as the soluble tannin content, the total soluble phenol content, the percentage of soluble protein, the total soluble solids content, pH, color and texture.

The most suitable conditions for the application of HHP in persimmon require an early ripening stage and absence of previous destringency treatment, being the treatments with 200 MPa at 37.5 °C for 3 or 6 minutes the ones providing the best results, as these treatments improve the extractability of some components and cause less disruption of the microstructure and the physicochemical properties. Regarding the onions, the most appropriate treatments are 100 MPa at 50 °C or 400 MPa 25 °C for 5 minutes. Storage causes structural degradation in the HHP-treated tissues and the evolution of the physicochemical properties studied varies depending on the treatment conditions applied and the duration of the storage.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS.....	3
I.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES	3
I.1.1.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA	4
I.1.1.2. PRINCIPIOS FUNDAMENTALES	4
I.1.1.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS EQUIPOS DE ALTAS PRESIONES	4
I.1.1.4. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LAS ALTAS PRESIONES	6
I.1.2. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN LA ESTRUCTURA DE LOS ALIMENTOS. ANTECEDENTES	7
I.1.3. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN LOS PRINCIPALES CONSTITUYENTES DE LOS ALIMENTOS. ANTECEDENTES	8
I.1.4. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN LA EXTRACTABILIDAD DE COMPUESTOS BIOACTIVOS. ANTECEDENTES	11
I.2. EL CAQUI	12
I.2.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA Y VARIEDADES.....	12
I.2.1.1. EL CAQUI ‘ROJO BRILLANTE’	13
I.2.2. MADURACIÓN, RECOLECCIÓN Y DESASTRINGENCIA DEL CAQUI.....	15
I.2.3. COMPONENTES DE INTERÉS NUTRICIONAL DEL CAQUI.....	17
I.2.3.1. TANINOS	18
I.2.3.2. CAROTENOIDES	19
I.2.3.3. FIBRA.....	20
I.3. LA CEBOLLA	21
I.3.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA Y VARIEDADES.....	21
I.3.1.1. LA CEBOLLA ‘DOUX’	22
I.3.1.2. LA CEBOLLA ‘RECAS’	23
I.3.1.3. LA CEBOLLA ‘FIGUERES’	24
I.3.2. FISIOLOGÍA DEL BULBO Y CONSERVACIÓN	24
I.3.3. COMPONENTES DE INTERÉS NUTRICIONAL DE LA CEBOLLA	26
I.3.3.1. FLAVONOIDES.....	27
I.3.3.2. PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS	28
I.3.3.3. FIBRA.....	29
II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	31
II.1. OBJETIVOS.....	33
II.2. PLAN DE TRABAJO	34

III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
III.1. MATERIAL VEGETAL	37
III.2. TRATAMIENTOS CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS.....	38
III.3. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS.....	41
III.3.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJAS TEMPERATURAS	41
III.3.2. MICROSCOPIA ÓPTICA	42
III.3.2.1. SECCIONES CRIOSTATO.....	42
III.3.2.2. SECCIONES INCLUIDAS.....	43
III.3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	43
III.3.4. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL DE BARRIDO.....	44
III.3.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	45
III.4. ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS	45
III.4.1. ELABORACIÓN DE LOS ZUMOS	45
III.4.2. CONTENIDO EN TANINOS SOLUBLES	46
III.4.3. CONTENIDO EN FENOLES SOLUBLES TOTALES.....	46
III.4.4. PORCENTAJE DE PROTEÍNA SOLUBLE.....	46
III.4.5. CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES Y PH	47
III.4.6. COLOR	47
III.4.7. PROPIEDADES TEXTURALES.....	47
III.4.7.1. FIRMEZA	48
III.4.7.2. COHESIVIDAD.....	48
III.4.7.3. RESISTENCIA AL CORTE	48
III.4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
IV.1. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN CAQUI ‘ROJO BRILLANTE’	53
IV.1.1. ESTUDIO MICROESTRUCTURAL	54
IV.1.1.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJAS TEMPERATURAS	54
IV.1.1.2. MICROSCOPIA ÓPTICA	60
IV.1.1.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	66
IV.1.1.4. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL DE BARRIDO	71
IV.1.2. ESTUDIO FISICOQUÍMICO.....	74
IV.1.2.1. CONTENIDO EN TANINOS SOLUBLES.....	74

IV.1.2.2. CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES Y PH.....	76
IV.1.2.3. COLOR.....	80
IV.1.2.4. PROPIEDADES TEXTURALES.....	82
IV.1.3. SELECCIÓN DEL ESTADO DE MADURACIÓN, GRADO DE ASTRINGENCIA Y CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRESIÓN Y TIEMPO PARA EL TRATAMIENTO DE CAQUI ‘ROJO BRILLANTE’ CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS.....	88
IV.1.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE TRATAMIENTO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN EL CAQUI ‘ROJO BRILLANTE’ ASTRINGENTE EN ESTADO DE MADURACIÓN M1.....	90
IV.1.4.1. EFECTO SOBRE LA MICROESTRUCTURA.....	90
IV.1.4.2. EFECTO SOBRE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS.....	92
IV.2. EVALUACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE CAQUI ‘ROJO BRILLANTE’ TRATADO CON ALTAS PRESIONES.....	95
IV.2.1. ESTUDIO MICROESTRUCTURAL.....	96
IV.2.1.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJAS TEMPERATURAS.....	96
IV.2.1.2. MICROSCOPIA ÓPTICA.....	98
IV.2.1.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	100
IV.2.2. ESTUDIO FISICOQUÍMICO.....	102
IV.2.2.1. CONTENIDO EN TANINOS SOLUBLES.....	102
IV.2.2.2. CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES Y PH.....	103
IV.2.2.3. COLOR.....	104
IV.2.2.4. PROPIEDADES TEXTURALES.....	106
IV.3. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN CEBOLLA.....	109
IV.3.1. SELECCIÓN DE LA VARIEDAD DE CEBOLLA.....	109
IV.3.1.1. CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURAL.....	109
IV.3.1.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES TEXTURALES.....	116
IV.3.2. ESTUDIO MICROESTRUCTURAL DE CEBOLLA ‘RECAS’ TRATADA CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS.....	120
IV.3.2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJAS TEMPERATURAS.....	120
IV.3.2.2. MICROSCOPIA ÓPTICA.....	121
IV.3.2.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	124
IV.3.3. ESTUDIO FISICOQUÍMICO DE CEBOLLA ‘RECAS’ TRATADA CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS.....	126
IV.3.3.1. CONTENIDO EN FENOLES SOLUBLES TOTALES.....	126
IV.3.3.2. PORCENTAJE DE PROTEÍNA SOLUBLE.....	127
IV.3.3.3. COLOR.....	129
IV.3.3.4. PROPIEDADES TEXTURALES.....	131

IV.3.4. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRESIÓN Y TEMPERATURA DEL TRATAMIENTO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS PARA CEBOLLA ‘RECAS’	133
IV. 4. EVALUACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE CEBOLLA ‘RECAS’ TRATADA CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS.....	136
IV.4.1. ESTUDIO MICROESTRUCTURAL	136
IV.4.1.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJAS TEMPERATURAS	136
IV.4.1.2. MICROSCOPIA ÓPTICA	138
IV.4.1.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	140
IV.4.2. ESTUDIO FISICOQUÍMICO	141
IV.4.2.1. CONTENIDO EN FENOLES SOLUBLES TOTALES	142
IV.4.2.2. PORCENTAJE DE PROTEÍNA SOLUBLE.....	144
IV.4.2.3. COLOR	146
IV.4.2.4. PROPIEDADES TEXTURALES	148
V. CONCLUSIONS	151
VI. REFERENCIAS.....	155
VII. ABREVIATURAS.....	169

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1.1. Principales efectos del procesado con APH en alimentos (Raventós Santamaría, 2005)	8
Tabla I.2.1. Composición nutricional del caqui (Moreiras et al., 2011).....	18
Tabla I.3.1. Composición nutricional de la cebolla (Moreiras et al., 2011).	27
Tabla I.3.2. Principales aminoácidos de la cebolla. Fuente: USDA SR-21, 2008.....	29
Tabla III.2.1. Condiciones de presión, tiempo y temperatura de los tratamientos de altas presiones aplicados en los estudios con caqui ‘Rojo Brillante’	39
Tabla III.2.2. Condiciones de presión, temperaturas y tiempo de los tratamientos de altas presiones aplicados en los estudios con cebolla ‘Recas’	40
Tabla IV.1.1. Combinaciones de presión, tiempo y temperatura utilizadas en los tratamientos de altas presiones para caqui ‘Rojo Brillante’	53
Tabla IV.1.2. Características fisicoquímicas de caqui ‘Rojo Brillante’ en estado de maduración M1 y M2, astringentes y sometidos a tratamiento de desastringencia previo. Media \pm desviación estándar. SST: sólidos solubles totales.....	53
Tabla IV.2.1. Características fisicoquímicas del caqui astringente en estado de maduración M1 empleado para el estudio de vida útil. Media \pm desviación estándar. SST: sólidos solubles totales.	95
Tabla IV.2.2. Condiciones de los tratamientos de altas presiones aplicados para el estudio de vida útil.....	95
Tabla IV.3.1. Características fisicoquímicas de cebolla ‘Recas’. Media \pm desviación estándar. SST: sólidos solubles totales.....	119
Tabla IV.3.2. Combinaciones de presión, temperatura y tiempo utilizadas en los tratamientos de APH para cebolla ‘Recas’	119
Tabla IV.3.3. Valores óptimos obtenidos y condiciones de presión y temperatura a las que se obtienen para las principales características fisicoquímicas de cebolla ‘Recas’ tratada con altas presiones hidrostáticas.	134
Tabla IV.4.1. Características fisicoquímicas de la cebolla ‘Recas’ empleada para el estudio de la vida útil. Valores promedio con su desviación estándar.	136
Tabla IV.4.2. Condiciones de los tratamientos de altas presiones aplicados para el estudio de vida útil.....	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1.1. Unidad de altas presiones hidrostáticas a escala de laboratorio. Modificación de Dong-Un Lee (2002).	5
Figura I.2.1. Corte longitudinal y transversal de un fruto de caqui. ep: eje placentario; co: cavidad ovárica.....	13
Figura I.2.2. Caqui ‘Rojo Brillante’. Hojas y frutos.	14
Figura I.2.3. Caqui tipo ‘Persimon’.	15
Figura I.3.1. Producción de cebolla en España los últimos 5 años. Fuente: Eurostat	21
Figura I.3.2. Foto de cebolla amarilla, blanca y morada. Fuente: Infoagro	22
Figura I.3.3. Cebolla ‘Doux’	23
Figura I.3.4. Cebolla ‘Recas’	23
Figura I.3.5. Cebolla ‘Figueres’	25
Figura I.3.6. Partes del bulbo de cebolla. Fuente: B.log.ia 2.0.	25
Figura III.1.1. Muestras de caqui ‘Rojo Brillante’ consideradas en el estudio sobre el efecto de altas presiones hidrostáticas.	37
Figura III.2.1. Esquema de la preparación de las muestras de caqui ‘Rojo Brillante’ para su procesado con altas presiones hidrostáticas.	38
Figura III.2.2. Unidad de presión hidrostática empleada en el procesado de caqui y cebolla.	39
Figura III.2.3. Esquema de la preparación de las muestras de cebolla ‘Recas’ para su procesado con altas presiones hidrostáticas.	40
Figura III.3.1. Cryo-Trans CT1x500C de Oxford Instruments acoplado a un microscopio de barrido Jeol JSM 5410.....	41
Figura III.3.2. Criostato CM1950 de Leica Biosystems.	42
Figura III.3.3. Ultramicrotomo Ultracut de Reichert-Jung.	43
Figura III.3.4. Microscopio electrónico de transmisión EM 400 de Philips.	44
Figura III.3.5. Microscopio óptico Nikon Eclipse E800 V-PS100E con microscopio láser confocal Nikon C1 acoplado (Nikon, Tokio, Japón).....	45

Figura III.4.1. A) Sondas cilíndrica de 2 y 4 mm de diámetro para los ensayos de punción. B) Curva típica de perfil de textura. C) Disposición de las muestras de cebolla en el ensayo de cizallamiento.	49
Figura IV.1.1. Cryo-SEM. Caqui ‘Rojo Brillante’ astringente en estado de maduración M1 no tratado, tratado con 200 MPa durante 1 minuto y tratado con 400 MPa durante 6 minutos. EI: espacio intercelular; EIA: espacio intercelular anegado; MS: material soluble; MI: material insoluble; CT: célula tánica; TO: tonoplasto; CV: cavidad; PC: pared celular.	55
Figura IV.1.2. Cryo-SEM. Caqui ‘Rojo Brillante’ no astringente en estado de maduración M1 no tratado, tratado con 200 MPa durante 1 minuto y tratado con 400 MPa durante 6 minutos. EI: espacio intercelular; CT: célula tánica; EIA: espacio intercelular anegado; MI: material insoluble.	57
Figura IV.1.3. Cryo-SEM. Caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente en estado de maduración M2 no tratado, tratado con 200 MPa durante 1 minuto y tratado con 400 MPa durante 6 minutos. EIA: espacio intercelular anegado; SM: separación de membrana; CT: célula tánica.	59
Figura IV.1.4. Microscopía óptica. Caqui ‘Rojo Brillante’ astringente en estado de maduración M1 no tratado y tratado durante 1 minuto con 200 y 400 MPa. Tinción con azul de toluidina (A, C, E) y con vainillina-HCl (B, D, F). CT: célula tánica; Flechas rojas: paredes celulares rotas; Flechas verdes: taninos precipitados en espacios intercelulares.	61
Figura IV.1.5. Microscopía óptica. Caqui ‘Rojo Brillante’ no astringente en estado de maduración M1 no tratado y tratado durante 1 minuto con 200 y 400 MPa. Tinción con azul de toluidina (A, C, E) y con vainillina-HCl (B, D, F). CT: célula tánica.	62
Figura IV.1.6. Microscopía óptica. Caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente en estado de maduración M2 no tratado y tratado durante 1 minuto con 200 y 400 MPa. A y B: caqui astringente, C: caqui no astringente. Tinción con azul de toluidina. CT: célula tánica. Flechas: taninos precipitados en espacios intercelulares.	63
Figura IV.1.7. Microscopía óptica. Caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente en estado de maduración M1. Control y tratado con altas presiones. Tinción con azul de toluidina. T: taninos; to: tonoplasto.	65
Figura IV.1.8. Microscopía óptica. Caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente en estado de maduración M2. Control y tratado con altas presiones. Tinción con azul de toluidina. T: taninos; sc: separación celular; to: tonoplasto.	66
Figura IV.1.9. Microscopía electrónica de transmisión. Caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente en estado de maduración M1. Control y tratado con altas presiones. pc: pared celular; m: membrana celular (plasmalema); to: tonoplasto; lc: lumen citoplasmático.	68

- Figura IV.1.10.** Microscopía electrónica de transmisión. Caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente en estado de maduración M2. Control y tratado con altas presiones. pc: pared celular; m: membrana celular (plasmalema);70
- Figura IV.1.11.** Microscopía láser confocal de barrido y microscopía óptica. Observación de carotenoides en tejido parenquimático de caqui astringente en estado de maduración M1. Flechas: agrupación de carotenoides.72
- Figura IV.1.12.** Microscopía láser confocal de barrido y microscopía óptica Observación de carotenoides en tejido parenquimático de caqui astringente en estado de maduración M1 tratado durante 3 minutos con 200 y 400 MPa. Flechas: agrupación de carotenoides.73
- Figura IV.1.13.** Contenido en taninos solubles totales de caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 (A) y M2 (B). Promedio de cuatro determinaciones con su desviación estándar. Los valores de un mismo tipo de caqui sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$). El asterisco indica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la muestra astringente y la no astringente.75
- Figura IV.1.14.** Gráficos de interacción significativa para la variable respuesta contenido en taninos solubles considerando intervalos LSD. A) Astringencia y presión aplicada. B) Astringencia y duración del tratamiento. C) Estado de maduración y presión aplicada. D) Presión aplicada y duración del tratamiento.76
- Figura IV.1.15.** Contenido en sólidos solubles totales (SST) de caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 (A) y M2 (B). Promedio de seis determinaciones con su desviación estándar. Los valores de un mismo tipo de caqui sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$). El asterisco indica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la muestra astringente y la no astringente.77
- Figura IV.1.16.** Gráficos de interacción significativa para la variable respuesta contenido en sólidos solubles totales considerando intervalos LSD. A) Astringencia y presión aplicada. B) Estado de maduración y presión aplicada. C) Presión aplicada y duración del tratamiento.78
- Figura IV.1.17.** pH de caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 (A) y M2 (B). Promedio de seis determinaciones con su desviación estándar. Los valores de un mismo tipo de caqui sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$). El asterisco indica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la muestra astringente y la no astringente.79
- Figura IV.1.18.** Gráficos de interacción significativa para la variable respuesta pH considerando intervalos LSD. A) Estado de maduración y presión aplicada. B) Astringencia y duración del tratamiento. C) Presión aplicada y duración del tratamiento.80
- Figura IV.1.19.** Valores de L^* , C^* y h de caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 (A, C y E) y

M2 (B, D y F). Promedio de diez determinaciones con su desviación estándar. Los valores de un mismo tipo de caqui sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$). El asterisco indica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la muestra astringente y la no astringente.	81
Figura IV.1.20. Gráficos de interacción significativa para las variables respuesta L^* , C^* y h considerando intervalos LSD. Astringencia y estado de maduración (A, C y E) y estado de maduración y presión aplicada (B, D y F)	82
Figura IV.1.21. Valores de firmeza de caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 y M2. Promedio de ocho determinaciones con su desviación estándar. Los valores de un mismo tipo de caqui sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$). El asterisco indica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la muestra astringente y la no astringente.....	84
Figura IV.1.22. Gráficos de interacción significativa para la variable respuesta firmeza considerando intervalos LSD. A) Estado de maduración y presión aplicada. B) Estado de maduración y astringencia. C) Astringencia y presión aplicada. D) Astringencia y duración del tratamiento.....	85
Figura IV.1.23. Valores de cohesividad de muestras de caqui astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 y M2. Promedio de ocho determinaciones con su desviación estándar. Los valores de un mismo tipo de caqui sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$). El asterisco indica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la muestra astringente y la no astringente.....	86
Figura IV.1.24. Gráficos de interacción significativa para la variable respuesta cohesividad considerando intervalos LSD. A) Estado de maduración y presión aplicada. B) Astringencia y presión aplicada. C) Presión aplicada y duración del tratamiento.	87
Figura IV.1.25. Muestras de caqui elegidas y tratamientos de altas presiones seleccionados (amarillo) de entre todos los estudiados.	89
Figura IV.1.26. Cryo-SEM. Tejido parenquimático de caqui ‘Rojo Brillante’ tratado por altas presiones (200 MPa durante 3 y 6 minutos a 25 y 37.5 °C). Flecha: espacio intercelular.	91
Figura IV.1.27. Microscopía óptica. Tejido parenquimático de caqui ‘Rojo Brillante’ tratado por altas presiones. T: taninos.	92
Figura IV.1.28. Caqui ‘Rojo Brillante’ tratado por altas presiones. A) Contenido en taninos solubles. B) Contenido en sólidos solubles totales. C) pH. D) Luminosidad. E) Firmeza. F) Cohesividad. Los segmentos verticales representan la desviación estándar. Diferentes letras entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).	94

Figura IV.2.1. Cryo-SEM. Caqui astringente en estado de maduración M1 tratado por altas presiones. MS: material soluble; EIA: espacio intercelular anegado; SC: separación celular; TO: tonoplasto; M: membrana; T: taninos; PC: pared celular.97

Figura IV.2.2. Microscopía óptica. Caqui astringente en estado de maduración M1 tratado por altas presiones. t: taninos; sc: separación celular; pd: pared degradada; to: tonoplasto; m: membrana.....99

Figura IV.2.3. Microscopía electrónica de transmisión. Caqui astringente en estado de maduración M1 tratado por altas presiones. to: tonoplasto; pc: pared celular; t: taninos...101

Figura IV.2.4. Gráfico de interacción significativa entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para el contenido en taninos solubles de caqui ‘Rojo Brillante’ considerando intervalos LSD. T1: 200 MPa / 3 min / 37.5 °C. T2: 200 MPa / 6 min / 37.5 °C.....103

Figura IV.2.5. Gráficos de interacción significativa entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para el contenido en sólidos solubles totales (SST) y pH de caqui ‘Rojo Brillante’ considerando intervalos LSD. T1: 200 MPa / 3 min / 37.5 °C. T2: 200 MPa / 6 min / 37.5 °C.104

Figura IV.2.6. Gráficos de interacción significativa entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para la luminosidad (L*), la saturación (C*) y el tono (h) de caqui ‘Rojo Brillante’ considerando intervalos LSD. T1: 200 MPa / 3 min / 37.5 °C. T2: 200 MPa / 6 min / 37.5 °C.105

Figura IV.2.7. Cubos de caqui ‘Rojo Brillante’ control y tratados con altas presiones hidrostáticas, almacenados durante 7 días a 4 °C. T1: 200 MPa / 3 min / 37.5 °C. T2: 200 MPa / 6 min / 37.5 °C.....106

Figura IV.2.8. Gráfico de interacción significativa entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para la firmeza de caqui ‘Rojo Brillante’ considerando intervalos LSD. T1: 200 MPa / 3 min / 37.5 °C. T2: 200 MPa / 6 min / 37.5 °C.107

Figura IV.2.9. Gráfico de medias según el tipo de tratamiento para la cohesividad de caqui ‘Rojo Brillante’ considerando intervalos LSD. T1: 200 MPa / 3 min / 37.5 °C. T2: 200 MPa / 6 min / 37.5 °C.107

Figura IV.2.10. Gráfico de interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento (B) para la cohesividad de caqui ‘Rojo Brillante’ considerando intervalos LSD. T1: 200 MPa / 3 min / 37.5 °C. T2: 200 MPa / 6 min / 37.5 °C.108

Figura IV.3.1. Cebollas variedad ‘Figueres’, ‘Recas’ y ‘Doux’ (de izquierda a derecha)..109

Figura IV.3.2. Cryo-SEM y SEM. Microestructura de capa externa de cebolla ‘Recas’. A) y C) Capa externa mediante cryo-SEM; B) Capa externa mediante SEM; D) Epidermis de capa externa mediante Cryo-SEM. EI: espacio intercelular; PC: pared celular; M: membrana; TO: tonoplasto.....110

Figura IV.3.3. Secciones criostato de capa externa de cebolla ‘Recas’ observada por microscopía óptica con distintos agentes de tinción. A) Azul de toluidina. B) Permanganato potásico. C) Cloruro férrico. D) Vainillina-HCl.	111
Figura IV.3.4. Cryo-SEM (A, C y E) y SEM (B, D y F). Microestructura de cebolla ‘Recas’. A y B: Capa interna control, C y D: Capa interna con atmósfera de etanol y E y F: Capa externa con atmósfera de etanol.	112
Figura IV.3.5. SEM y Cryo-SEM. Microestructura de cebolla ‘Doux’, ‘Recas’ y ‘Figueres’. Superficie de epidermis externa por SEM (A, B y C), corte transversal de epidermis externa por cryo-SEM (D, E y F) y corte transversal de tejido parenquimático por cryo-SEM (G, H e I).....	114
Figura IV.3.6. Cryo-SEM. Microestructura de capas interna y externa de cebolla ‘Doux’, ‘Recas’ y ‘Figueres’ con tratamiento en atmósfera saturada de etanol.	115
Figura IV.3.7. Propiedades texturales de cebolla ‘Doux’, ‘Recas’ y ‘Figueres’. A) Firmeza. B) Resistencia al corte. Promedio de diez determinaciones con su desviación estándar....	117
Figura IV.3.8. Gráficos de interacción significativa entre las capas y la variedad para la firmeza (A) y resistencia al corte (B) de cebolla considerando intervalos LSD.....	118
Figura IV.3.9. Cryo-SEM. Microestructura de cebolla tratada con altas presiones hidrostáticas durante 5 minutos (100, 250 y 400 MPa a 25, 37.5 y 50 °C). EI: espacio intercelular; SM: separación de membrana; PR: pared celular rota; P: picaduras; EIA: espacio intercelular anegado; PD: pared celular deformada; CV: nueva cavidad; SC: separación entre células.....	121
Figura IV.3.10. Microscopía óptica. Microestructura de cebolla no tratada. ce: célula epidérmica.....	122
Figura IV.3.11. Microscopía óptica. Microestructura de cebolla tratada con altas presiones hidrostáticas durante 5 minutos (100, 250 y 400 MPa a 25, 37.5 y 50 °C). ce: célula epidérmica; mr: membrana rota; pr: pared celular rota.	123
Figura IV.3.12. Microscopía óptica. Microestructura de cebolla fresca y cebolla tratada con 100 y 400 MPa a 50 °C durante 5 minutos. ce: célula epidérmica.	124
Figura IV.3.13. Microscopía electrónica de transmisión. Microestructura de cebolla no tratada. pc: pared celular; m: membrana celular (plasmalema); to: tonoplasto.	124
Figura IV.3.14. Microscopía electrónica de transmisión. Microestructura de cebolla tratada con altas presiones hidrostáticas durante 5 minutos (100 y 400 MPa a 25 y 50 °C). pc: pared celular; m: membrana.....	125
Figura IV.3.15. Contenido en fenoles solubles totales de cebolla ‘Recas’ con distintos tratamientos de APH. Promedio de seis determinaciones con su desviación estándar. Los valores sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$).....	126

Figura IV.3.16. Gráfico de efecto simple de la presión para el contenido en fenoles solubles totales de cebolla ‘Recas’ considerando intervalos LSD..... 127

Figura IV.3.17. Porcentaje de proteína soluble de cebolla ‘Recas’ con distintos tratamientos de APH. Promedio de tres determinaciones con su desviación estándar. Los valores sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$)..... 128

Figura IV.3.18. Gráficos de interacción significativa entre presión y temperatura de tratamiento para el porcentaje de proteína soluble de cebolla ‘Recas’ considerando intervalos LSD 128

Figura IV.3.19. A), D) y E): Valores de L^* , C^* y h de cebolla ‘Recas’ con distintos tratamientos de APH. Promedio de diez determinaciones con su desviación estándar. Los valores sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$). B), D) y F): Gráficos de interacciones y de efectos simples significativos para las variables respuesta L^* , C^* y h considerando intervalos LSD 130

Figura IV.3.20. Cebolla ‘Recas’ tratada con 100 MPa a 25 °C (T1) y con 250 MPa a 37.5 °C (T5)..... 131

Figura IV.3.21. Valores de firmeza (A) y resistencia al corte (B) de cebolla ‘Recas’ con distintos tratamientos de APH. Promedio de ocho determinaciones con su desviación estándar. Los valores sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$) 132

Figura IV.3.22. Gráficos de interacción y de efecto simple significativos para la firmeza (A) y la resistencia al corte (B) de cebolla ‘Recas’ considerando intervalos LSD 133

Figura IV.3.23. Gráficos de superficie de respuesta de las variables fenoles solubles totales (A), porcentaje de proteína soluble (B), luminosidad (C) y firmeza (D) en función de la presión y temperatura aplicadas en el tratamiento de APH..... 134

Figura IV.3.24. Variedad de cebolla y tratamientos de altas presiones seleccionados (amarillo) para el estudio de vida útil de cebolla tratada con altas presiones hidrostáticas. 135

Figura IV.4.1. Cryo-SEM. Tejido de cebolla control y cebolla tratada por altas presiones inmediatamente tras el tratamiento (D0) y tras 14 y 28 días de almacenamiento (D14, D28). EI: espacio intercelular; EIA: espacio intercelular anegado; P: picaduras; PC: pared celular; M: membrana celular; TO: tonoplasto; SC: separación celular; DC: deformación celular. 138

Figura IV.4.2. Microscopía óptica. Tejido de cebolla ‘Recas’ tratada por altas presiones inmediatamente tras el tratamiento (D0) y tras 14 y 28 días de almacenamiento (D14, D28). sc: separación celular; pr: pared celular rota. 139

Figura IV.4.3. Microscopía electrónica de transmisión. Tejido de cebolla ‘Recas’ tratada por altas presiones inmediatamente tras el tratamiento (D0) y tras 14 y 28 días de almacenamiento (D14, D28). pc: pared celular; m: membrana; to: tonoplasto; lm: lámina media. 141

Figura IV.4.4. Gráficos de efecto simple del tipo de tratamiento (A) y del tiempo de almacenamiento (B) para el contenido en fenoles solubles totales de cebolla ‘Recas’ considerando intervalos LSD. T1: 100 MPa / 50 °C; T2: 400 MPa / 25 °C.	142
Figura IV.4.5. Gráfico de interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para el contenido en fenoles solubles totales de cebolla ‘Recas’ considerando intervalos LSD. T1: 100 MPa / 50 °C; T2: 400 MPa / 25 °C.	143
Figura IV.4.6. Gráficos de efecto simple del tipo de tratamiento (A) y del tiempo de almacenamiento (B) para el contenido en fenoles solubles totales de cebolla ‘Recas’ considerando intervalos LSD. T1: 100 MPa / 50 °C; T2: 400 MPa / 25 °C.	144
Figura IV.4.7. Gráfico de interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para el porcentaje de proteína soluble (PPS) de cebolla ‘Recas’ considerando intervalos LSD. T1: 100 MPa / 50 °C; T2: 400 MPa / 25 °C.	145
Figura IV.4.8. Gráficos de interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para los parámetros de color de cebolla ‘Recas’ considerando intervalos LSD. A) Luminosidad (L*). B) Saturación (C*). C) Tono (h). T1: 100 MPa / 50 °C; T2: 400 MPa / 25 °C.	147
Figura IV.4.9. Gráficos de interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para los parámetros de textura de cebolla ‘Recas’ considerando intervalos LSD. A) Firmeza. B) Resistencia al corte. T1: 100 MPa / 50 °C; T2: 400 MPa / 25 °C	148

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

Los alimentos vegetales que se consumen en fresco pierden calidad desde el momento que son cosechados y también como consecuencia de reacciones físicas, químicas o microbiológicas. Los microorganismos y las enzimas son los principales agentes responsables del deterioro de los alimentos, y se convierten en los objetivos de las técnicas de conservación.

Tradicionalmente, la mayoría de alimentos conservados han sido procesados térmicamente sometiendo al alimento a temperaturas elevadas durante pocos segundos. En este período de tiempo se transfiere una gran cantidad de energía al alimento que puede provocar reacciones indeseables en el mismo, dando lugar a diversos cambios o a la formación de subproductos. El hecho de que no sólo la vida útil del alimento, sino también su calidad son importantes para los consumidores, ha llevado al nacimiento del concepto de conservación de alimentos usando métodos no térmicos. Por esta razón, la investigación en la industria alimentaria se dirige a reemplazar las técnicas de preservación tradicionales por nuevas tecnologías que se adapten mejor al tipo de alimentos que los consumidores demandan; alimentos de alta calidad, nutritivos, naturales, seguros pero poco procesados, libres de conservantes, de larga vida útil y fáciles de preparar, es decir, alimentos lo más parecidos posible a los frescos, que se perciben como más saludables.

Esta creciente demanda de alimentos con características muy similares al producto fresco, está impulsando el desarrollo de nuevas tecnologías de conservación denominadas no térmicas, como los pulsos de luz, los ultrasonidos o las altas presiones hidrostáticas. Estas técnicas permiten conservar, en mayor medida que los tratamientos térmicos, la calidad (color, sabor, aroma y vitaminas) de determinados alimentos frescos e inactivar microorganismos y enzimas, incrementando su vida útil en refrigeración y facilitando su comercialización (Barbosa-Cánovas et al., 1998).

Entre las principales tecnologías emergentes de conservación de alimentos cabe destacar las altas presiones hidrostáticas (APH), cuyo efecto en la microestructura y en la extractabilidad de compuestos bioactivos de tejidos vegetales es el objeto de estudio de la presente tesis doctoral.

I.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El procesado de alimentos por APH consiste en la aplicación de presión al alimento con una intensidad entre 50 y 1000 MPa. Este tratamiento puede efectuarse sólo o en combinación con otras técnicas como tratamientos térmicos suaves, ultrasonidos, CO₂, etc. El principal objetivo del procesado de alimentos mediante esta técnica es la inactivación de microorganismos y enzimas a temperaturas lo suficientemente bajas que eviten los efectos negativos producidos por los tratamientos térmicos tradicionales, permitiendo obtener así productos seguros, saludables y convenientes, manteniendo su calidad sensorial y organoléptica.

I.1.1.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA

El primer experimento en tecnología de alimentos relacionado con la inactivación de microorganismos por altas presiones data de finales del siglo XIX y los efectos en las propiedades físicas de los alimentos fueron estudiados años después. Se estudiaron fenómenos promovidos por las APH, tales como la coagulación de la albúmina del huevo, efectos en la β -caseína de la leche o el ablandamiento de la carne. Tras un periodo de menor actividad investigadora en el campo, esta técnica ha ganado considerable atención en los últimos 20 años (Gould, 2001).

I.1.1.2. PRINCIPIOS FUNDAMENTALES

Debido a que la presión es uniforme a través de todo el alimento, el procesado del mismo con APH también lo es, sin que escape ninguna parte a la conservación. Al contrario del tratamiento térmico, el tratamiento con presión no depende de la relación tiempo/masa, lo que hace que se reduzca el tiempo de procesado.

Existen dos principios fundamentales en los que se basa la aplicación de APH:

- a) *La presión se transmite de manera uniforme e instantánea* a través de todo el material biológico tratado por alta presión. De esta manera se evita la presencia de zonas sobretratadas, así como la deformación del producto, y hace que éste sea más homogéneo.
- b) *Principio de Le Chatelier*: los fenómenos acompañados de una disminución de volumen son favorecidos por un aumento de presión y viceversa. Según este principio, la aplicación de la alta presión desplaza el equilibrio de un proceso hacia el estado que ocupa menos volumen. Los cambios positivos/negativos en el volumen con un aumento en la presión provocan un desplazamiento del equilibrio hacia la rotura/formación de enlaces. Por ejemplo, la aplicación de APH provoca la desprotonación de grupos cargados, rotura de puentes salinos y enlaces hidrofóbicos, con lo que se producen cambios conformacionales y estructurales de las proteínas. Los cambios de hidratación son la fuente mayoritaria del descenso de volumen asociado con la disociación y desplegamiento de las proteínas.

I.1.1.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS EQUIPOS DE ALTAS PRESIONES

A pesar de que los efectos de la aplicación de APH en la inactivación de microorganismos y la desnaturalización de proteínas y polisacáridos era conocida desde hace más de 100 años, la industria alimentaria no se ha interesado por esta tecnología hasta la última década debido a las dificultades técnicas y los costes asociados con las unidades de procesado y el envasado de los alimentos. El interés ha sido activado por los resultados de numerosos estudios científicos que reconocen el mercado prometedor del procesado con APH. Aunque actualmente esta tecnología es más cara que las tradicionales, su uso ofrece nuevas oportunidades a la industria alimentaria para responder a las necesidades del consumidor (Hendrickx et al., 2005).

En función del producto a tratar, existen equipos de altas presiones que trabajan en modo discontinuo (los más utilizados) y semicontinuo. Si se trata de líquidos o sólidos

ya envasados se utiliza el equipo de altas presiones *discontinuo*, mientras que para líquidos no envasados se usa el tipo *semicontinuo*. En los sistemas de procesado en discontinuo el alimento es presurizado por cargas, una después de otra. Mediante este sistema se reduce el riesgo de que grandes cantidades de alimento se contaminen por los lubricantes o por partículas que llegan a la máquina. Se pueden procesar distintos tipos de alimentos sin el riesgo de recontaminación o de la necesidad de limpiar el equipo después de cada operación. En los sistemas semicontinuos la presión se comunica al producto de manera directa a través de un pistón móvil. Una vez presurizado el producto se envasa asépticamente (Van den Berg et al., 2002).

Un equipo típico de APH consiste en una cámara de presión, normalmente de acero de baja aleación y elevada resistencia a la tracción, su cierre, un sistema de generación de presión y un sistema de control de la temperatura (Figura I.1.1). El espesor de la pared de la cámara es lo que determina la presión máxima de trabajo del equipo (Yaldagard et al., 2008). La unidad de APH normalmente emplea agua como fluido presurizante a fin de facilitar la operatividad y la compatibilidad con los alimentos (Earnshaw, 1996). Otros fluidos presurizantes empleados son disoluciones de glicol y agua, aceite de silicona, disoluciones de benzoato sódico, disoluciones de etanol y aceite de ricino (Yaldagard et al., 2008).

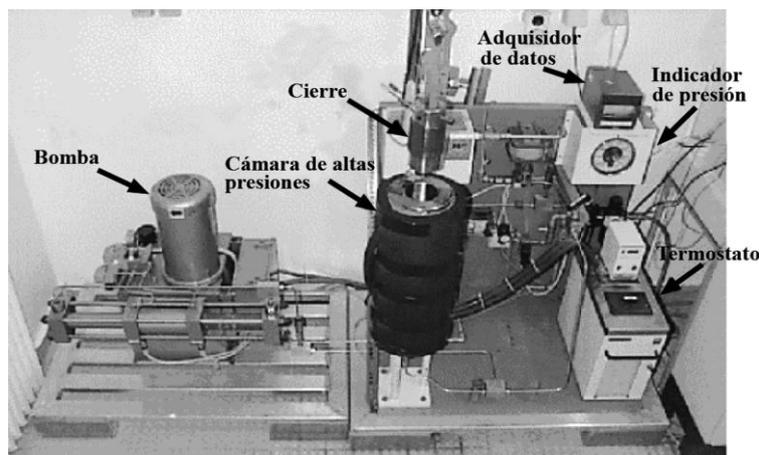


Figura I.1.1. Unidad de altas presiones hidrostáticas a escala de laboratorio. Modificación de Dong-Un Lee (2002).

La industria alimentaria requiere equipos que puedan tolerar presiones superiores a 400 MPa, con un ciclo más eficiente y duradero de 100000 ciclos/año. La alta presión se puede generar de la siguiente manera:

- a) Compresión directa: generada por presurización de un medio con la parte final de un pistón de diámetro pequeño. El diámetro grande del final del pistón se mueve con una bomba de baja presión. Este método permite una compresión muy rápida, pero las limitaciones del cierre dinámico de alta presión entre el pistón y la superficie interna de la cámara restringe el uso de este método a diámetros pequeños de laboratorio o sistemas de planta piloto.

I. Introducción

- b) Compresión indirecta: utiliza un intensificador de alta presión para bombear el medio de presión desde un depósito hacia la cámara de presión cerrada hasta que se alcanza la presión deseada. La mayoría de sistemas industriales de presión isostática utilizan este método.
- c) Calentamiento del medio de presión: usa la expansión del medio de presión mediante el aumento de la temperatura para generar alta presión. Se realiza cuando la alta presión se aplica en combinación con alta temperatura. Esto requiere un control muy estrecho de la temperatura con el volumen interno entero de la cámara de presión.

I.1.1.4. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LAS ALTAS PRESIONES

Las principales ventajas y limitaciones del uso de APH en el procesado de alimentos son las siguientes (Morata Barrado, 2008; Yaldagard et al., 2008):

Ventajas:

- ✓ La transferencia de presión a todo el sistema es instantáneo, lo que reduce el tiempo de procesado, e independiente del tamaño y geometría del alimento.
- ✓ La inactivación enzimática y la muerte microbiana puede producirse a temperatura ambiente, mejorando la calidad de los alimentos y reduciendo la cantidad de energía térmica necesaria en el procesado convencional.
- ✓ No rompe enlaces covalentes, por lo que se evita el desarrollo de olores y sabores extraños en el producto, manteniendo así una alta calidad organoléptica y además el deterioro de nutrientes y vitaminas es escaso.
- ✓ Al ser un proceso isostático, es decir, uniforme en todo el alimento, la preservación es homogénea, sin partes que no resulten adecuadamente tratadas.
- ✓ Resulta útil para alimentos ácidos en los cuales las esporas no pueden germinar, ya que éstas no se ven afectadas por el procesado con APH.
- ✓ En el caso de productos líquidos es posible el tratamiento sin envasado previo.
- ✓ El proceso puede considerarse respetuoso con el medio ambiente ya que sólo necesita energía eléctrica y no se generan residuos.

Limitaciones:

- ✗ Las enzimas y las esporas de bacterias son muy resistentes a la presión y requieren presiones muy elevadas para su inactivación, por lo que puede decirse que la esterilización completa es complicada con esta tecnología.
- ✗ Puede existir actividad enzimática residual y oxígeno disuelto, dando lugar a degradación enzimática y oxidativa de algunos componentes del alimento.
- ✗ La mayoría de los alimentos procesados con APH necesitan conservación y distribución a baja temperatura para retener sus propiedades sensoriales y nutricionales.

- ✗ Aún no hay equipos de procesado en continuo bien establecidos.
- ✗ El procesado con APH afecta a la estructura de los alimentos.
- ✗ La aplicación de esta tecnología supone elevados costes de inversión.

I.1.2. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN LA ESTRUCTURA DE LOS ALIMENTOS. ANTECEDENTES

Además de la inhibición y destrucción de microorganismos, el tratamiento de APH influye en las propiedades fisicoquímicas y en la estructura de los alimentos.

La composición de la pared celular puede cambiar con la activación de ciertas enzimas de la pared o por cambios estructurales en las fracciones lípidas, proteicas o de polisacáridos de la pared durante el procesado con APH. La presión induce cambios en los polisacáridos, así como en la estructura de las proteínas (desplegamiento, agregación, gelificación) y cristalización de las grasas. Todo ello puede afectar a su funcionalidad y a la textura y estructura del tejido vegetal (Galazka y Ledward, 1998). Los cambios estructurales se relacionan con cambios físicos y químicos de la morfología del tejido, orgánulos celulares y membranas, incluso a nivel molecular.

La gelificación de las proteínas por el procesado con APH es el principal proceso relacionado con las propiedades texturales del alimento. El procesado con APH también provoca cambios fisicoquímicos del almidón, como pérdida de cristalinidad y de orden anisotrópico, hidratación y aumento de viscosidad.

En el caso de la leche, por ejemplo, el tratamiento de APH produce un incremento de caseínas y del nivel de fosfato cálcico en el suero y un descenso de las fracciones de nitrógeno en el suero lácteo, además de un descenso en la turbidez de la leche y un incremento de viscosidad (Schmidt y Koops, 1977; Johnston et al., 1992). En la carne las calpastatinas, proteasas que favorecen la ternura de la carne son inhibidas por encima de 200 MPa y las calpaínas son desnaturalizadas por encima de 400 MPa (Montero y Gómez-Guillén, 2002). Los tratamientos superiores a 200 MPa producen la rotura de los lisosomas, lo que incrementa la capacidad autolítica de la carne y por tanto la tenderización. Los azúcares no se ven afectados, pero los polisacáridos sí. En general, el tratamiento de APH inhibe la gelificación, ya que la presión puede modificar la temperatura de transición sol-gel. Además, las APH pueden llegar a la separación de lípidos en diferentes fracciones, lo que puede suponer la destrucción de membranas (Hugas et al., 2002).

Al procesar con APH tienen lugar modificaciones en la organización molecular de los complejos lípido-péptido y disrupciones de la bicapa de ácido fosfatídico de las membranas celulares, que conducen a cambios en la permeabilidad de las mismas (Knorr, 1995). Diversos autores encuentran correlación entre rotura celular por APH y pérdida de firmeza. Tangwonchai et al (2000) observaron por microscopía electrónica de barrido deformación de la pared celular debido a colapso celular, causando pérdida de turgor y firmeza en tomates cherry procesados con presiones de hasta 400 MPa. Sin embargo, a presiones superiores la firmeza aumentó, debido a la pérdida de aire del tejido y una consecuente compresión del mismo. Préstamo y Arroyo (1998) observaron en espinacas tratadas con 400 MPa una disrupción en la organización del parénquima y

formación de nuevas cavidades entre células. Debido a esto, las células perdieron turgor y colapsaron.

El daño físico producido por los tratamientos de APH en tejidos vegetales blandos como tomate y espinaca sugiere que este proceso sería más adecuado para zumos o purés, o para tejidos vegetales más duros, como podría ser la zanahoria o la cebolla (Cano y De Ancos, 2000). En este sentido, la cebolla podría ser un posible objeto de estudio.

I.1.3. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN LOS PRINCIPALES CONSTITUYENTES DE LOS ALIMENTOS. ANTECEDENTES

Cuando un alimento es sometido a APH se observa principalmente una modificación del volumen del sistema, modificación en la estructura del almidón y las proteínas, modificación de la actividad enzimática e inactivación de microorganismos. En la Tabla I.1.1 se indican las condiciones de presión en las que se producen dichos cambios, aunque éstas dependen del alimento a tratar, ya que cada alimento tiene una composición y características particulares.

Tabla I.1.1. Principales efectos del procesado con APH en alimentos (Raventós Santamaría, 2005).

Presión	Efectos
> 200 MPa	Influencia sobre la cinética enzimática. Modificación de las propiedades físicas de las proteínas. Alteración de la membrana de los microorganismos.
> 300 MPa	Inactivación enzimática irreversible. Muerte de los microorganismos.
> 400 MPa	Gelificación de los almidones. Desnaturalización de las proteínas.
> 500 MPa	Muerte de las esporas bacterianas. Inactivación de las enzimas.

En función de la composición del alimento tienen lugar unos cambios u otros. La estructura primaria de las moléculas de bajo peso molecular, tales como vitaminas, péptidos y azúcares simples son raramente afectados por las APH debido a la baja compresibilidad de los enlaces covalentes a presiones inferiores a 2000 MPa (Heinz y Buckow, 2010). Existen numerosos estudios en los que se han analizado los efectos de las APH en cada uno de los constituyentes del alimento.

➤ Agua

La presión modifica muchas propiedades del agua. El volumen del agua disminuye un 4% a 100 MPa y un 15% a 600 MPa a una temperatura de 22 °C (Cheftel, 1992). Los alimentos con alta humedad y poco gas reaccionan a una compresión

similar a la del agua. La compresión adiabática del agua aumenta la temperatura un orden de 3 °C por cada 100 MPa (Knorr, 1999) La ionización del agua también es facilitada por las APH, disminuyendo así el pH (Yaldagard et al., 2008).

➤ Lípidos

La temperatura de fusión de los lípidos, en especial de los triglicéridos, aumenta con la presión de manera reversible en más de 10 °C por cada 100 MPa. Por este motivo, los lípidos en estado líquido a temperatura ambiente pueden cristalizar al aplicar presión. La presión causa la formación de cristales densos y más estables que tienen un nivel de baja energía y alta temperatura de fusión. Esto puede explicar algunas de las causas de destrucción de los microorganismos por la presión debido a los cambios cristalinos en los fosfolípidos de la membrana celular (Cheftel, 1995). El aumento de la presión puede producir un aumento de la oxidación de los lípidos insaturados del alimento. Se ha observado que el tratamiento de alta presión en alimentos de alto contenido proteico produce un incremento de la oxidación lipídica. Se cree que este aumento está relacionado con la desnaturalización de las proteínas causada por la presión quedando libres iones metálicos que catalizarían la oxidación lipídica.

➤ Hidratos de carbono

En general, en aquellos alimentos tratados con APH los cambios que afectan a los carbohidratos se refieren principalmente a la desesterificación de pectinas y degradación de sacarosa, como consecuencia de las reacciones enzimáticas que tienen lugar bajo la acción de APH (Butz et al., 2003). Los azúcares simples no resultan afectados por esta técnica. Las reacciones de Maillard son inhibidas por la aplicación de la alta presión (50-200 MPa), y en consecuencia el desarrollo del sabor y color típicos de esta reacción no se producen. Las APH afectan a la transición sol-gel de los polisacáridos, formándose geles diferentes a los obtenidos por los tratamientos térmicos (Cheftel 1992). La aplicación de APH induce la hidratación de la fase amorfa y deforman la zona cristalina, conduciendo a la destrucción de la estructura granular del almidón. La observación microscópica muestra diferentes grados de hinchamiento para almidones tratados con APH con respecto a los sometidos a un tratamiento térmico (Stute et al., 1996), por lo que debe existir una diferencia en el mecanismo de gelatinización. Estudios con disoluciones de almidón de trigo del 16% muestran que la gelatinización empieza al aplicar 300 MPa y se completa con 600-700 MPa a 25 °C (Douzals et al., 1998; Rubens and Heremans, 2000).

➤ Proteínas

Las modificaciones de las proteínas se deben a cambios en las interacciones intra e intermoleculares entre grupos funcionales de los aminoácidos. En general, la aplicación de presiones superiores a 100-200 MPa a temperatura ambiente, provocan la disociación de macroestructuras en subunidades, así como, el despliegue y desnaturalización de estructuras monoméricas, debido al debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas y la separación de los puentes salinos inter o intramoleculares. Por otra parte, cuando la presión y la

concentración proteica son elevada, dichas interacciones conducen a agregaciones y gelificaciones de los sistemas biológicos. Los efectos que sufren las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas pueden ser reversibles, aunque dependiendo de factores como la temperatura y pH, pueden resultar irreversibles (Heremans, 1995).

➤ Enzimas

La alta presión induce cambios en la velocidad de las reacciones que catalizan las enzimas, así como cambios en su estructura (Balny y Masson, 1993). Así, las APH pueden producir la inactivación parcial o total, reversible o irreversible dependiendo, del tipo de enzima, del nivel de presión, del tiempo y de la temperatura del medio (Hendrickx et al., 1998). También se ha descrito la activación de algunas enzimas por efecto de la alta presión. El efecto de las altas presiones sobre las enzimas presenta dos vertientes: presiones relativamente bajas producen la activación de las mismas, mientras que presiones elevadas contribuyen a la inactivación de éstas. Algunas enzimas son resistentes a la presión y su función no se ve alterada por el tratamiento con APH. Enzimas como la pectinmetilesterasa (PME), la polifenoloxidasas (PPO) y la peroxidasa (POD), presentes en los vegetales y frutas, son muy resistentes a la presión, aunque pueden experimentar cambios en su actividad dependiendo de las condiciones del tratamiento (Cheftel, 1995).

Las *PME* son enzimas responsables de la pérdida de firmeza de los zumos, de la gelificación de concentrados y de la pérdida de consistencia de productos derivados del tomate. Se trata de enzimas bastante termolábiles, ya que la mayoría de ellas se inactiva fácilmente alrededor de los 70 °C. Sin embargo, son bastante resistentes a la aplicación de presión. Se requieren presiones por encima de 600 MPa para inducir la inactivación parcial (en torno al 90%) e irreversible en zumo de naranja (Irwe and Olsson, 1994). En trabajos existentes sobre el efecto de las altas presiones sobre la *PME* de los productos derivados del tomate (Crelier et al., 2001; Fachin et al., 2002) se corrobora que esta enzima es muy resistente a la presión. Este enzima es menos estable bajo presión en presencia de iones Ca^{+2} o en medio ácido (pH = 3.5-4.5) que en agua, y su estabilidad a la presión se incrementa con el aumento de pH. La inactivación de la *PME* del tomate también se produce a bajas presiones y temperaturas moderadas (59-60 °C).

Las *PPO* son las enzimas responsables de numerosas reacciones químicas que provocan el pardeamiento de los vegetales, produciendo el deterioro del color y sabor de algunos alimentos. Distintos estudios realizados, muestran que las *PPO* son enzimas difíciles de inactivar por completo mediante APH a temperatura ambiente y su estabilidad a la presión varía en función de su origen. Weemaes et al. (1998) comprobaron que la inactivación de la *PPO* de la manzana, uva, aguacate y pera a temperatura ambiente era intensa a 600, 700, 800 y 900 MPa respectivamente, mientras que la *PPO* de la ciruela no se inactivaba a temperatura ambiente a 900 MPa.

La enzima *POD* induce cambios negativos en el olor y sabor durante el almacenamiento. Se trata de la enzima más termoestable de todas las vegetales y

también es extremadamente resistente a la presión dependiendo de la procedencia. En guisantes es necesario un tratamiento con 900 MPa durante 10 min a temperatura ambiente para lograr una reducción del 88% en la actividad (Quaglia et al., 1996). De acuerdo a un estudio de Cano et al. (1997) en productos de fresa y naranja, la POD en puré de fresa se inactiva progresivamente a presiones hasta 300 MPa pero aumenta ligeramente a presiones superiores. Al tratar zumo de naranja con 400 MPa a distintas temperaturas, comprobaron que la actividad de la POD aumenta o disminuye dependiendo de la temperatura del tratamiento, de manera que se logra el máximo nivel de inactivación (50%) al aplicar 400 MPa a 32 °C y sin embargo tratamientos a temperaturas entre 32 y 60 °C provocan una activación de la enzima.

I.1.4. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN LA EXTRACTABILIDAD DE COMPUESTOS BIOACTIVOS. ANTECEDENTES

El consumidor valora positivamente aquellos alimentos vegetales que no sólo le proporcionan nutrientes indispensables para la vida (hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas...) sino que además poseen sustancias con un posible efecto saludable conocidas como compuestos bioactivos (antioxidantes, sustancias flavonoides, compuestos organosulfurados, etc). Durante el procesado de los productos vegetales tienen lugar modificaciones en la matriz vegetal y ruptura de la pared celular de los orgánulos que encierran determinados compuestos, favoreciendo la reacción de los enzimas con sus correspondientes sustratos y permitiendo la salida de nutrientes y compuestos bioactivos, dando lugar a modificaciones relacionadas con la calidad sensorial (color, textura, aroma), nutricional y funcional (aumento de extracción de nutrientes y compuestos bioactivos) y la biodisponibilidad de los nutrientes. La bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los nutrientes se ve afectada por las modificaciones de la microestructura como consecuencia del procesado (Parada y Aguilera 2007).

En general, la aplicación de APH da lugar a modificaciones de los biopolímeros celulares (proteínas, polisacáridos y lípidos) que afectan a la estructura y funcionalidad de los productos vegetales. Se sabe que las APH producen cambios en la permeabilidad de iones de las membranas y facilitan la salida de agua y otros metabolitos hacia el exterior de las células vegetales (Dörnenburg y Knorr, 1992; Shouqin et al., 2005). Por otro lado, también se ha comprobado que las APH producen cambios en la estructura de los tejidos vegetales, lo que produce una alteración de las propiedades físico-químicas y esto afecta a la mayor retención de agua y a la extractabilidad (Butz et al., 2002).

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.

La aplicación de APH parece aumentar la retención de vitaminas y otros componentes de bajo peso molecular (Wennberg y Nyman, 2004; Oey et al., 2008). Además, algunos autores han afirmado que la aplicación de APH a alimentos ricos en micronutrientes y fitoquímicos, tales como minerales, carotenoides y otros compuestos antioxidantes podría resultar útil para el desarrollo de productos más saludables por un posible aumento en su bioaccesibilidad (Briones-Labarca et al., 2011; McInerney et al., 2007; Sánchez-Moreno et al., 2009). La biodisponibilidad de vitamina C, vitamina E y compuestos carotenoides de derivados de productos vegetales como zumo de naranja y gazpacho tratados por APH ha sido estudiada durante los últimos años por Sánchez-Moreno et al. (2003a, 2003b y 2004), siendo el primer estudio de biodisponibilidad de compuestos bioactivos de productos tratados por altas presiones.

El tratamiento de APH influye en la estabilidad de vitaminas y en la extractabilidad de algunos compuestos bioactivos, tales como carotenoides y vitamina A en zumo de naranja (De Ancos et al., 2002), licopeno en puré de tomate (Krebbes et al., 2003; Qiu et al., 2006), ácido ascórbico en zanahoria y zumo de tomate (Dede et al., 2007) y flavonoles en cebolla (Roldán-Marín et al., 2009). Roldán-Marín et al. (2009) concluyeron que la extractabilidad de fenoles totales y flavonoles en cebolla podía incrementarse al procesar con 400 MPa y 5 °C.

En lo referente al procesado del caqui mediante APH, en el trabajo de De Ancos y col. (2000) se estudió el efecto de las altas presiones sobre los carotenoides y la actividad antioxidante de zumos de caqui de distintas variedades; en éste se indica la posibilidad de extraer mayor concentración de compuestos bioactivos mediante la liberación de los mismos a partir de complejos proteína-caroteno por la acción de los tratamientos de APH.

I.2. EL CAQUI

I.2.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA Y VARIEDADES

El caqui (*Diospyros kaki* L. f.) pertenece a la familia botánica *Ebanaceae*, género *Diospyros*. Es un fruto originario de China, de donde pasó a Corea y Japón. Podemos encontrar especies de este género adaptadas tanto a las zonas tropical y subtropical, como a la templada. Fue en el s. XIX cuando su cultivo se extendió a Europa, Brasil y Estados Unidos. La mayoría de las variedades de caqui que actualmente se están cultivando en el mundo, y concretamente en España, pertenecen al género *Diospyros kaki* L. f. Gran parte proceden de Japón, donde el *Diospyros kaki* L. f. sufrió un notable proceso de mejora.

A nivel internacional los principales países productores de caqui son: China (con una producción en 2010 superior a los 3 millones de toneladas), Corea, Japón, Brasil, Azerbaiyán e Italia (FAO, 2010). En España las principales regiones productoras son la Comunidad Valenciana, Cataluña y Andalucía.

Las variedades de caqui se dividen desde el punto de vista comercial en astringentes ('Rojo Brillante', 'Triumph', 'Tomatero', 'Fuji', 'Hachiya', 'Atago', etc.)

y no-astringentes ('Fuyu', 'Hana-Fuyu', 'Jiro', 'Suroga', etc.). La astringencia está ligada al contenido y forma de los taninos. En las variedades no-astringentes están insolubilizados permitiendo su consumo sin la realización de ningún tratamiento en postcosecha y sin alcanzar la madurez fisiológica. Las variedades astringentes tienen un elevado contenido en taninos solubles que va disminuyendo a medida que se alcanza la madurez, lo que imposibilita su consumo inmediatamente tras la recolección. Es por ello que las variedades astringentes precisan de un proceso de sobremaduración o de eliminación de la astringencia antes de su comercialización.

El fruto es una baya cuya forma, dimensiones, peso medio y características varían según la variedad. Está provisto de un pedúnculo leñoso que termina en un cáliz cuadrolobulado. Inicialmente, el caqui es de color verde más claro que las hojas, evolucionando su coloración a sonrosado y finalmente a rojizo cuando se alcanza la recolección. La pulpa es un tejido parenquimático con alto contenido en taninos que engloba también a los haces fibroleñosos. En la zona central del fruto se encuentra el eje placentario, que une el ápice y la cavidad calicina, y que posee una coloración más clara que el resto del fruto. En sección transversal pueden distinguirse, normalmente, ocho cavidades ováricas provistas cada una de semillas cuando el óvulo ha sido fecundado (Figura I.2.1). El fruto puede producirse por vía partenocárpica o por vía sexual. La diferencia no puede apreciarse exteriormente, pero sí internamente cuando al partirlo se comprueba la existencia o no de semillas (Hernández Aranda, 1999).

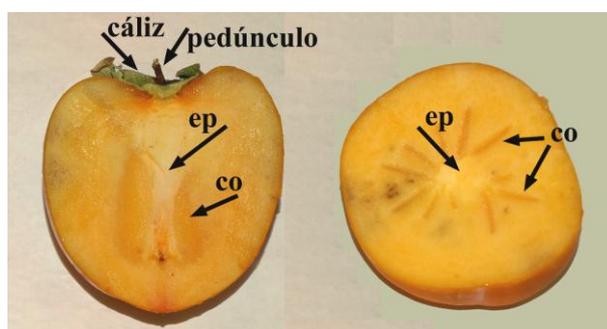


Figura I.2.1. Corte longitudinal y transversal de un fruto de caqui. ep: eje placentario; co: cavidad ovárica.

I.2.1.1. EL CAQUI 'ROJO BRILLANTE'

En el 95% de las plantaciones comerciales de la Comunidad Valenciana se cultiva el caqui de la variedad astringente 'Rojo Brillante', bajo la Denominación de Origen 'Kaki Ribera del Xúquer'. 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). Gran parte de la producción se exporta a Europa, principalmente a Alemania, Portugal y Francia.

I. Introducción

La variedad de caqui ‘Rojo Brillante’ es autóctona de la Ribera del Xúquer y surgió en los años 50, debido probablemente a una mutación de la variedad ‘Cristalino’. En estos momentos, es la variedad de mayor importancia, tanto productiva como comercialmente y, en consecuencia, la mayoría de las nuevas plantaciones que se están realizando en la actualidad son de esta variedad.

La variedad ‘Rojo Brillante’ tiene un gran interés debido a que los árboles son muy productivos (Figura I.2.2). Es una variedad de fecundación constante, astringente, fruto de tamaño medio-grosso, de forma oblonga, con sección transversal circular, color amarillo-anaranjado en la recolección y rojo-anaranjado al terminar la sobremaduración. El tamaño final del fruto es variable en función de la cantidad de frutos por árbol y la forma de recolección, que deberá realizarse en dos o tres pasadas. Los frutos que quedan en el árbol por recolectar continúan aumentando su calibre hasta finales de noviembre.



Figura I.2.2. Caqui ‘Rojo Brillante’. Hojas y frutos.

La gran expansión que ha tenido lugar en el cultivo del caqui ‘Rojo Brillante’ en la Comunidad Valenciana desde 1996, en parte es debida a la adaptación de las técnicas de desastringencia. Estas técnicas consiguen la eliminación de la astringencia sin producir la aceleración de la maduración postcosecha del fruto, que conduce a un fruto blando difícil de manejar por la gran distribución y con limitada aceptación por los

consumidores. Dicha expansión también se debe a la diferenciación que desde el punto de vista de marketing y comercialización se estableció entre las dos formas de comercializar el caqui. Así pues, se bautizó comercialmente el caqui 'Rojo Brillante' desasperizado y duro, que mantiene su firmeza de pulpa, como caqui tipo 'Persimon', cuyo aspecto comercial se identifica en la Figura I.2.3.



Figura I.2.3. Caqui tipo 'Persimon'.

Sin embargo, la comercialización del 'Rojo Brillante' puede tener en el futuro dificultades, ya que su periodo natural de comercialización es de solo unas siete semanas, y en ellas hay que concentrar la venta de toda la producción. Por ello es importante el uso de distintas técnicas para la eliminación de la astringencia del caqui sin provocar maduración y ablandamiento o pérdida de firmeza en el fruto. En estos procesos en los que se crean condiciones anaeróbicas, destacan los tratamientos con elevadas concentraciones de CO₂.

I.2.2. MADURACIÓN, RECOLECCIÓN Y DESASTRINGENCIA DEL CAQUI

Al igual que el resto de frutas, durante la maduración el caqui también sufre modificaciones en sus características organolépticas (color, textura, sabor, etc), fruto de reacciones químicas como las que se mencionan a continuación:

- Modificaciones de los constituyentes glucídicos (responsables del sabor dulce y la textura). El contenido de los azúcares aumenta durante la maduración. Estos azúcares provienen de la hidrólisis del almidón y de hemicelulosas de las paredes celulares. Debido a esta degradación del almidón y las hemicelulosas, la textura del fruto disminuye progresivamente durante la maduración. La fracción péctica se va solubilizando y posteriormente se desmetoxila y despolimeriza por acción de diversas enzimas (pectinmetilesterasa, poligalacturonasa). Estos cambios afectan a las paredes celulares y generan un ablandamiento en el fruto.
- Modificaciones en los pigmentos responsables del color. Se produce síntesis de carotenoides y su desenmascaramiento debido a una progresiva degradación de la clorofila.

- Modificaciones de los compuestos volátiles y no volátiles, responsables del aroma y el sabor. Durante la maduración se originan un gran número de compuestos orgánicos volátiles que contribuyen al aroma del fruto. Entre los compuestos no volátiles que contribuyen al sabor del fruto, hay que mencionar los constituyentes fenólicos, y especialmente los taninos en el caso del caqui, que desaparecen parcialmente durante la maduración.

Cuando la comercialización del caqui ‘Rojo Brillante’ se realiza en forma de caqui ‘Persimon’ (no astringente), la firmeza es uno de los atributos fundamentales a tener en cuenta durante el periodo posterior a la recolección. Es necesaria una elevada firmeza en el momento de la recolección para poder preservar la calidad del fruto, puesto que en el periodo postcosecha tendrá lugar un ablandamiento inevitable, en mayor o menor grado dependiendo de las condiciones a las que sea sometido el fruto. En la actualidad, el parámetro utilizado como indicador de recolección es la coloración externa del fruto, a pesar de resultar un índice totalmente subjetivo. Una coloración amarillo-anaranjada se considera suficiente para la comercialización como caqui ‘Persimon’.

Tal y como ya se ha comentado, el caqui ‘Rojo Brillante’ es una variedad astringente, con una concentración de taninos en el momento de la recolección que imposibilita su consumo. La acción de comer el fruto provoca la lisis de las células que los contienen y la liberación de los mismos (Taira, 1996) provocando una fuerte sensación de astringencia. Es por ello necesario disminuir la cantidad de taninos mediante la sobremaduración, que tiene como inconveniente el ablandamiento del fruto y la pérdida de atractivo comercial, o mediante tratamientos con atmósferas anaerobias (Arnal y Del Río, 2003).

Los taninos solubles responsables de la astringencia, bajo condiciones anaerobias son polimerizados por el acetaldehído producido en la respiración anaerobia pasando a su forma insoluble, de manera que ya no provocan sensación de astringencia en el paladar (Matsuo et al., 1982; Taira et al., 1997). Existen métodos de desastringencia basados en la exposición de los frutos a condiciones anaerobias (Ben Arie y Sonogo, 1993), como la aplicación de atmósferas modificadas enriquecidas con etanol, CO₂ o N₂. De entre todos ellos, el método que ha demostrado ser más efectivo y el que se aplica actualmente es el de atmósferas con altas concentraciones de CO₂, ya que elimina la astringencia preservando su firmeza (Zavrtanik et al., 1999; Yamada et al., 2002; Arnal y Del Río, 2003).

No obstante, la eficacia del tratamiento con CO₂ en la eliminación de la astringencia y la duración del mismo dependen de la variedad, temperatura y estado de maduración del fruto (Ben Arie y Sonogo, 1993). Actualmente a nivel comercial, gracias a la actividad investigadora realizada en el Centro de Tecnología Postcosecha del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), se ha establecido como método estándar para reducir la astringencia del caqui ‘Rojo Brillante’ el consistente en introducir los frutos durante 24 horas en cámaras estancas con condiciones constantes de 95% de CO₂ a 20 °C y con un 90% de humedad relativa (Salvador et al. 2004).

I.2.3. COMPONENTES DE INTERÉS NUTRICIONAL DEL CAQUI

La composición nutricional del caqui es distinta en función de la variedad que se trate, pero todos ellos tienen en común su elevado contenido de agua, en torno al 80%. Aporta una cantidad importante de **hidratos de carbono** (fructosa, glucosa) y escasa de grasas y proteínas, por lo que su valor calórico es bastante elevado respecto a otras frutas. Entre las **grasas** destacan los aceites linoleico, oleico y palmítico. Respecto de su contenido de **vitaminas** y **minerales**, destaca la provitamina A o beta-caroteno, que le confiere al fruto su color característico, la vitamina C y el potasio (Wright y Kader, 1996; De Ancos et al., 2000). La vitamina A es esencial para la visión, el buen estado de la piel, el cabello, las mucosas, los huesos y para el buen funcionamiento del sistema inmunológico. La vitamina C interviene en la formación de colágeno, huesos y dientes, glóbulos rojos y favorece la absorción del hierro de los alimentos y la resistencia a las infecciones. Ambas vitaminas cumplen, además, una función antioxidante, aunque sus niveles descienden con la maduración. El potasio, es un mineral necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso y para la actividad muscular normal, ya que interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula. Además del β -caroteno, el caqui también contiene otros compuestos **carotenoides** de importante actividad antioxidante. En menor proporción se encuentran ciertas vitaminas del grupo B (B1, B2, y B3) y los minerales, calcio, fósforo, hierro y sodio. Contiene una importante cantidad de **taninos**, con carácter antioxidante y responsables de la astringencia del fruto. 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).

Por su aporte de provitamina A, se recomienda su consumo a toda la población, y en especial, a quienes tienen un mayor riesgo de sufrir carencias de dicha vitamina: personas que deben llevar a cabo una dieta baja en grasa y por tanto con un contenido escaso de vitamina A o para quienes tienen unas necesidades nutritivas aumentadas. Algunas de estas situaciones son: periodos de crecimiento, embarazo y lactancia materna. Así mismo, el tabaco, el abuso del alcohol, el empleo de ciertos medicamentos, el estrés, la actividad física intensa, el cáncer, el sida, y las enfermedades inflamatorias crónicas. Las vitaminas A y C, como antioxidantes, contribuyen a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, degenerativas y de cáncer. Su riqueza en fibra los hace recomendables para tratar el estreñimiento. Además, por su riqueza en potasio y bajo aporte de sodio, resultan muy recomendables para aquellas personas que sufren de hipertensión arterial o afecciones cardiovasculares. Su contenido de potasio, deberán tenerlo en cuenta las personas que padecen de insuficiencia renal y que requieren de dietas especiales controladas en este mineral.

La composición del caqui se presenta en la Tabla I.2.1:

Tabla I.2.1. Composición nutricional del caqui (Moreiras et al., 2011).

Composición por 100 g de porción comestible	
Calorías	70 Kcal
Agua	81.4 g
Hidratos de carbono	16 g
Fibra dietética	1,6 g
Proteínas	0.7 g
Lípidos totales	0.3 g
Potasio	190 mg
Fósforo	22 mg
Magnesio	9 mg
Calcio	6 mg
Sodio	4 mg
Provitamina A	158,3 µg
Vitamina B1	0.02 mg
Vitamina B2	0.04 mg
Vitamina B3	0.3 mg
Vitamina B9	7 µg
Vitamina C	16 mg

Se hará hincapié en los taninos, compuestos carotenoides y fibra presentes en el caqui ya que serán objeto de estudio en el presente trabajo.

I.2.3.1. TANINOS

Los taninos son polímeros de sustancias fenólicas, hidrosolubles y con un elevado número de grupos fenólicos sin conjugar. En las plantas los taninos pueden servir como agentes de defensa contra herbívoros y sus efectos son proporcionales a los niveles presentes en la planta (Park et al., 2004). Diversos estudios atribuyen propiedades nutricionales positivas y negativas a los taninos. Por ejemplo, los taninos se consideran responsables de la disminución en digestibilidad de proteínas por su tendencia a asociarse a ellas pero también se consideran compuestos con potencial antimutagénico debido a sus propiedades antioxidantes, protegiendo del daño oxidativo celular, incluyendo la peroxidación lipídica (Chung et al., 1998b).

Los taninos se dividen en dos grandes categorías en función de su estructura: taninos hidrolizables y no hidrolizables (o condensados). El caqui es rico en taninos condensados (proantocianidinas del grupo B), formados por unidades de catequina, catequina-3-0-galato, galocatequina y galocatequina-3-0-galato, tienen la propiedad de

formar complejos estables con metales y proteínas, y por ello son los responsables de la astringencia característica de estos frutos (Santos-Buelga y Scalbert, 2000; Nakatsumo et al., 2002).

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). De esta manera, se produce la reducción de la sensación de astringencia durante el crecimiento y la maduración de las variedades astringentes y la desaparición de ésta en las variedades no astringentes. De acuerdo con Salvador et al. (2007) en un estudio de caqui 'Rojo Brillante' recolectado en 6 estados de maduración distintos, todos dentro del rango comercial del fruto, el contenido de taninos solubles en el caqui 'Rojo Brillante' variaba del 0.78% (peso fresco) en el estado de maduración más temprano, hasta el 0.36% (peso fresco) en el estado de maduración más avanzado. El contenido de taninos solubles en variedades no astringentes, como Jiro y Fuyu varía del 3% en el fruto inmaduro hasta el 0% en el momento de la recolección (Inaba et al., 1971; Taira, 1996).

I.2.3.2. CAROTENOIDES

Los carotenoides son compuestos con propiedades funcionales importantes. Además de ser los responsables de la coloración del caqui, algunos de ellos son precursores de la vitamina A. Gracias a su acción provitamina A, desempeñan una función importante en la prevención de la degradación macular de la retina, la disminución del riesgo de formación de cataratas y la formación y proliferación de epitelios. También están relacionados con un aumento del sistema inmune y una disminución del riesgo de padecer enfermedades degenerativas como cánceres y enfermedades cardiovasculares. Además presentan propiedades antioxidantes.

El caqui destaca por su alto contenido en compuestos carotenoides con actividad antioxidante (β -caroteno, β -cryptoxantina, luteína, zeaxantina y licopeno) y actividad de provitamina A (β -caroteno y β -cryptoxantina) (De Ancos et al., 2000).

En los frutos la distribución de carotenoides es muy compleja y heterogénea. El perfil de carotenoides es característico de cada especie, variando desde perfiles muy simples, que presentan sólo dos carotenoides en pulpa de frutos maduros, licopeno y β -caroteno, hasta perfiles más complejos como el de los cítricos en los que se encuentran más de 50 carotenoides distintos. En general, la biosíntesis de carotenoides en frutos ocurre en mayor medida en la piel que en la pulpa, acumulándose por tanto una mayor cantidad de estos pigmentos en la piel. En los frutos de caqui la concentración de carotenoides de la piel es hasta 9 veces superior a la existente en el endocarpio. El contenido de carotenoides varía durante el desarrollo y la maduración de los mismos. Durante la maduración del caqui se observa la modificación en la coloración del fruto. Este cambio de color se produce como consecuencia de la degradación de las clorofilas seguido de un aumento de la síntesis y acumulación de carotenoides. La marcada intensificación del color que se produce durante la maduración es debido a un gran incremento en el contenido en licopeno; este contenido ha sido utilizado para la

clasificación de los caquis. De acuerdo con De Ancos et al. (2000) la variedad 'Rojo Brillante' se caracteriza por tener un 24% de licopeno y 31% de β -criptoxantina con respecto al total de carotenoides (22.11 μg por gramo de pulpa).

I.2.3.3. FIBRA

La fibra dietética hace referencia a los componentes de la pared celular que no son digeribles por las enzimas de los humanos y sólo pueden ser parcialmente degradados por las bacterias anaerobias del intestino grueso. La fibra dietética puede clasificarse en soluble (pectinas, β -glucanos, fructanos, oligosacáridos, algunas hemicelulosas y gomas) e insoluble (hemicelulosa, celulosa y lignina). La fibra insoluble actúa fundamentalmente sobre el tránsito intestinal generando un efecto laxante, por lo que está indicada para combatir el estreñimiento. Los beneficios de la fibra soluble son más amplios. Equilibra el nivel de colesterol, previene el cáncer de colon, combate las subidas de glucosa en sangre, por lo que es beneficiosa para los diabéticos, y también ayuda a regular el tránsito intestinal (Anderson et al., 1994). La fibra soluble tiene una mayor degradabilidad en el intestino grueso y por ello una carga calórica mayor que la fracción insoluble. La relación entre la fracción soluble y la insoluble depende del vegetal o fruto, de la variedad y del estado de maduración e incluso del procesado de los mismos.

La textura de los frutos frescos, tanto almacenados como procesados, está directamente relacionada con los polisacáridos de la pared celular (Brett y Waldron, 1996). Ésta consiste en un ensamblaje macromolecular heterogéneo formado por microfibrillas de celulosa inmersas en una matriz de polisacáridos complejos y glicoproteínas. Entre estos polisacáridos destacan las pectinas y las hemicelulosas. Entre las hemicelulosas destacan los xiloglucanos, principales polisacáridos estructurales de la pared primaria que se unen a las microfibrillas de celulosa mediante puentes de hidrógeno. Estas interacciones son las que determinan las propiedades mecánicas de la pared.

Estructuralmente, las pectinas y otros componentes de la pared celular primaria (hemicelulosas) se estabilizan por la presencia de enlaces inter e intramoleculares, de forma que la pared es resistente e insoluble al agua. La ruptura de dichos enlaces es fundamental en la pérdida de firmeza asociada a la maduración del caqui así como del procesado de los mismos (De Roeck et al., 2008). Los procesos térmicos convencionales ocasionan una degradación muy importante de polisacáridos pécticos. Esta degradación produce una menor adhesión intercelular y mayor ablandamiento, haciendo un fruto menos atractivo para el consumidor. Por ello es importante el estudio del efecto que las APH producen en la estructura de la pared celular del caqui.

I.3. LA CEBOLLA

I.3.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA Y VARIEDADES

La cebolla o *Allium cepa* L. es una hortaliza perteneciente a la familia de las *Liliaceae*. El origen de este cultivo parece ubicarse en Asia Central, concretamente en zonas de Persia y la India, aunque también se han encontrado evidencias muy antiguas de su existencia en el Norte de África (Egipto). Serían los romanos quienes introducirían, a través de sus conquistas durante la etapa imperial, el consumo de esta hortaliza en los países ribereños del Mediterráneo ya que era uno de los alimentos básicos en la dieta de sus legionarios. Durante la Edad Media los ejemplares plantados presentaban bulbos grandes a partir de los cuales se especializaron las variedades que se comercializan en la actualidad. Al igual que con otras hortalizas y verduras, la cebolla llegó al continente americano a través de los españoles en los primeros tiempos de conquista, por su elevado poder de conservación

La cebolla ha sido fuente de alimento desde tiempos antiguos y también ha sido empleada con fines terapéuticos. Actualmente, la cebolla es un cultivo muy extendido por todo el mundo debido, en gran parte, al gran número de cultivares adaptados a condiciones ambientales diferentes y con distintas características y atributos. La producción mundial asciende a más de 74 millones de toneladas. China es el mayor productor a nivel mundial, seguido de India y EEUU (FAO, 2010). España es uno de los principales productores de cebollas en Europa, con más de 1.3 millones de toneladas producidas en 2011 (Figura I.3.1), sólo superada por Turquía y Holanda.

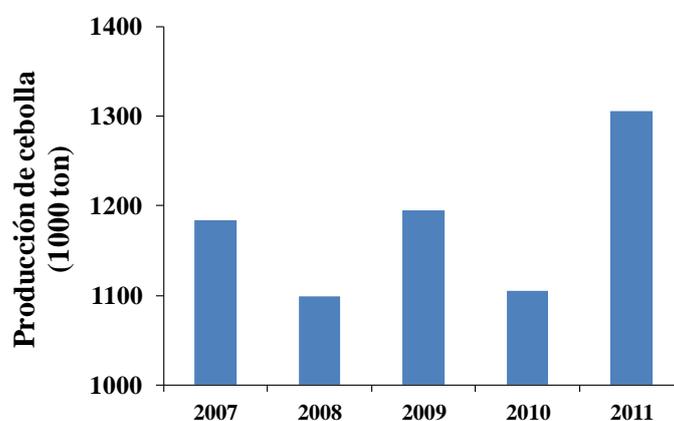


Figura I.3.1. Producción de cebolla en España los últimos 5 años. Fuente: Eurostat.

Para lograr una excelente producción hay que tomar en cuenta los factores de adaptabilidad de las variedades, y las condiciones ambientales de la localidad. Existe una gran cantidad de variedades con bulbos de diversas formas y colores disponibles para la producción comercial. Existe un gran número de variedades de cebolla, así

I. Introducción

como diferentes tipificaciones según el color de la piel, uso (para cocinar o encurtir), época de recolección, etc.

En la Península Ibérica una de las clasificaciones más consolidadas está basada en el **fotoperiodo** y distingue tres tipos:

- Cebollas tempranas. Inician la bulbificación con 12 horas de luz y se recogen en primavera. Destacan las variedades ‘Spring’, ‘Babosa’, ‘Texas Early Grain’, ‘Sangre de Buey’, ‘Amarillo-paja’ y ‘Amarilla Bermuda’.
- Cebollas de media estación. inician la bulbificación con 13 horas de luz: ‘Liria’, ‘Cristal Wax’ o ‘Blanca Bermuda’, ‘Blanca de España’ y ‘Morada de España’.
- Cebollas tardías inician la bulbificación con 14 horas o más de luz: ‘Amarilla azufre de España’, ‘Grano’, ‘Recas’, ‘Doux’, ‘Figueres’, ‘Morada de Amposta’, y ‘Dulce de Fuentes de Ebro’.

Según el **color** del bulbo, existen comercialmente variedades blancas, amarillas y moradas (Figura I.3.2).



Figura I.3.2. Foto de cebolla amarilla, blanca y morada. Fuente: Infoagro

Según la **forma** del bulbo maduro existen variedades de bulbo achatado, grueso, achatado alto, globo achatado, globo redondo, globo cilíndrico, torpedo, trompo.

También se clasifican según la **pungencia**, que es el sabor y olor picante de la cebolla debido a compuestos como el sulfuro de alilo presente en el bulbo. De esta manera existen variedades con pungencia alta, media y baja.

I.3.1.1. LA CEBOLLA ‘DOUX’

La variedad ‘Doux’ es originaria de Francia. Se trata de una variedad tardía de color entre blanco nacarado y cobrizo. El bulbo es de calibre grande, globoso, con capas celulósicas finas y translúcidas y las capas carnosas blancas, gruesas, bastante firmes y jugosas (Figura I.3.3). Es de textura suave y crujiente y su sabor es dulce y de

baja pungencia. Estas características la hacen adecuada para su consumo tanto en crudo como cocinada.

La siembra se realiza de julio a septiembre en semillero para trasplantar en octubre y cosecharla tierna en primavera. Sus bulbos ya bien desarrollados se recolectan en julio-agosto.



Figura I.3.3. Cebolla ‘Doux’.

1.3.1.2. LA CEBOLLA ‘RECAS’

La variedad ‘Recas’ procede de la cebolla ‘Grano’, variedad que se cultiva principalmente en la Comunidad Valenciana. La cebolla ‘Recas’ se cultiva principalmente en la provincia de Toledo, adaptándose muy bien a la climatología más fría de esa zona, aunque también se cultiva en otras regiones. Un 32% de la cebolla producida en la provincia de Lérida corresponde a esta variedad.

Las selecciones ‘Recas’ son fruto del esfuerzo continuado durante muchos años seleccionando a partir de la ‘Grano’ un bulbo más pequeño, con más capas celulósicas enteras y cobrizas y con un poder de conservación mayor (Castell-Roig y Castell-Zeising, 1991).

El bulbo es esférico y de color naranja grisáceo (Figura I.3.4). Las capas carnosas son blancas y con un elevado grado de pungencia y firmeza (Mallor, 2008).

Se trata de una variedad de ciclo medio tardío con buena producción y excelente conservación que aguanta sin brotar hasta final de primavera en buenas condiciones. La siembra se realiza en enero o febrero, según la zona, y se cosecha entre agosto y septiembre. Esta variedad se caracteriza por su larga conservación por lo que se convierte en una cebolla ideal para la exportación.



Figura I.3.4. Cebolla ‘Recas’

I.3.1.3. LA CEBOLLA 'FIGUERES'

La cebolla 'Figueres' es una variedad originaria de Catalunya y la más importante de esa región. De las 32000 toneladas de cebolla que se producen anualmente en Cataluña, un 60% corresponden a la variedad 'Figueres'.

Se trata de una variedad tardía, de planta muy vigorosa y rústica. Los bulbos son gruesos, de forma irregular, redondeada y achatada y de color morado-rosáceo (Figura I.3.5). Las capas carnosas son también rosadas de sabor suave, dulce, de escasa pungencia y muy crujientes, lo que la hace muy adecuada para su consumo en fresco.

La siembra se realiza de septiembre a febrero según la zona y se recolecta entre mayo y agosto también dependiendo de la zona y de la época de siembra. Destaca su buena aptitud a la conservación.



Figura I.3.5. Cebolla 'Figueres'

I.3.2. FISIOLÓGÍA DEL BULBO Y CONSERVACIÓN

La cebolla o *Allium cepa* L. es una hortaliza de la familia de las *Liliaceae*. Su bulbo es comestible y presenta una estructura globosa, esférica o elipsoidal, de un diámetro que oscila entre los 3-10 cm, pesando de media entre 100-250 g. Su interior está formado por capas gruesas, carnosas, donde se acumulan las sustancias nutritivas necesarias para la alimentación de los brotes y protegidas por membranas delgadas, secas, y semitransparentes. Las células de las capas carnosas tienen un tamaño relativamente grande y se encuentran fuertemente unidas entre sí a fin de dar estructura firme y protección al fruto de la *Allium cepa*.

Las principales partes del bulbo son las siguientes (Figura I.3.6):

- **El disco o placa basal**, es la parte inferior del bulbo desde donde crecen las raíces.
- **Las tunicas**, son una o dos capas externas secas que rodean a las escamas y las protege de la desecación.
- **Los catáfilos o escamas, carnosas**, que son el órgano de almacenamiento principal, ya que en sus tejidos parenquimáticos es donde se acumulan los nutrientes. En un bulbo de cebolla típico hay cuatro escamas externas que son vainas engrosadas de hojas con limbo. Estas a su vez encierran tres o cuatro

escamas engrosadas sin limbo del bulbo y, finalmente, en el centro se encuentran cinco primordios de hojas con limbo. Estos primordios internos de hojas con limbo emergen cuando brota el bulbo, de ahí que se denominen hojas de brote (Brewster, 2001).

- **El vástago o pedúnculo floral**, que consiste en una yema floral y otras yemas en desarrollo.

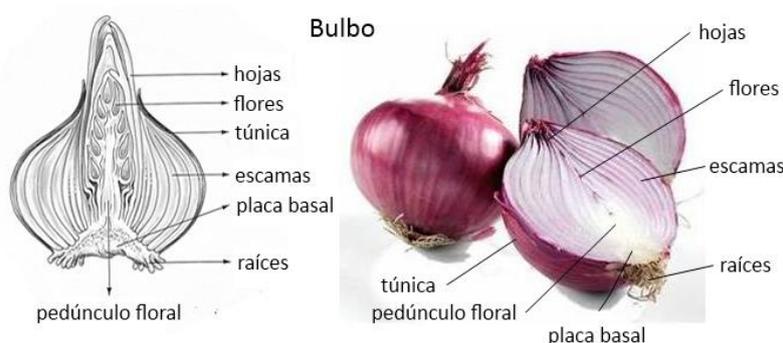


Figura I.3.6. Partes del bulbo de cebolla. Fuente: B.log.ia 2.0.

La recolección se lleva a cabo cuando empiezan a secarse las hojas, señal de haber llegado al estado conveniente de madurez. Tras arrancarlas del suelo, se sacuden y se procede al curado, que consiste en colocarlas sobre el terreno, donde se dejan 2-3 días con objeto de que las seque el sol. Es conveniente que el curado se realice bajo tiempo estable en días secos, a una temperatura mínima de 24 °C y una humedad relativa óptima entre el 75 y el 80% para un mejor desarrollo del color de las escamas. En caso de no contar con estas condiciones en el terreno, el curado se realiza con aire forzado durante 12 horas entre 30 y 45°C.

Una vez en el almacén, se conservan con una humedad relativa entre 65 y 70% con una adecuada circulación de aire (1 m³/min·m³ de cebollas). Las cebollas menos pungentes se conservan entre 15 y 30 días a 0 °C. Las cebollas más pungentes aguantan de 6 a 9 meses a 0 °C, dependiendo de la variedad.

A temperatura ambiente las cebollas aguantan sin deteriorarse de 7 a 10 días en verano y de 10 a 15 días en invierno.

I.3.3. COMPONENTES DE INTERÉS NUTRICIONAL DE LA CEBOLLA

Existen numerosos estudios científicos que confirman los beneficios para la salud que supone el consumo de cebolla. Entre dichos beneficios destacan la reducción de enfermedades cardiovasculares, cáncer y respuesta inflamatoria, así como sus propiedades antidiabéticas, antioxidantes, antibióticas y antifúngicas (Desjardins, 2008).

Las cebollas son vegetales ricos en dos familias de compuestos químicos, los compuestos **flavonoides** y los **derivados de azufre** alquenil-cistein sulfóxidos. Estos últimos son precursores de los compuestos que confieren el aroma y sabor característicos de la cebolla. Destaca el sulfuro de alilo, que tiene propiedades bactericidas y fungicidas. Los compuestos fenólicos de la cebolla, en particular los flavonoides, son conocidos por sus propiedades antioxidantes y captadoras de radicales libres. La importante cantidad de compuestos fenólicos que presenta la cebolla justifica el interés por aumentar su extractabilidad actuando sobre el procesamiento del fruto (Roldán-Marín y col 2009).

Una gran proporción del peso seco de la cebolla corresponde a carbohidratos. Destacan los fructanos y fructooligosacáricos, que modifican favorablemente la microflora intestinal (Mountzouris et al., 2006).

Se trata de un alimento de poco valor energético y muy rico en **minerales y oligoelementos**: azufre, sodio, calcio, magnesio, cloro, cobalto, cobre, hierro, fósforo, yodo, níquel, potasio, silicio, cinc y bromo. La cebolla destaca por su alto contenido en potasio, que ayuda a mantener la presión osmótica en la célula, cataliza algunas reacciones energéticas y ayuda a mantener la presión sanguínea. Tiene ciertas propiedades antianémicas, y gracias a su contenido en hierro, fósforo y minerales repone la pérdida de sangre y glóbulos rojos.

También abundan la **vitaminas A, B, C y E**. Debido a su contenido en vitaminas A y C puede tratar todo tipo de enfermedades respiratorias, también gracias a su contenido en varias vitaminas B (tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina y ácido fólico) puede tratar enfermedades nerviosas. Contiene **aminoácidos** de interés como el ácido glutámico, arginina, lisina y glicina. Sus enzimas favorecen la fijación de oxígeno por parte de las células, colaborando en la función respiratoria.

Es interesante su contenido en glucoquinina, una sustancia hipoglicemiante que ayuda a combatir la diabetes.

La composición de la cebolla fluctúa dependiendo de la variedad. En la Tabla I.3.1 se presenta los valores aproximados de los principales nutrientes en 100 gramos de bulbo fresco.

Tabla I.3.1. Composición nutricional de la cebolla (Moreiras et al., 2011).

Composición por 100 g de porción comestible	
Calorías	29 Kcal
Agua	87.0 – 92.0 g
Hidratos de carbono	5.8 g
Fibra dietética	3.1 g
Proteínas	1.3 g
Lípidos totales	0.3 g
Potasio	175 mg
Azufre	70 mg
Fósforo	42 mg
Magnesio	11 mg
Calcio	31 mg
Sodio	9 mg
Hierro	0.50 mg
Vitamina B1	0.05 mg
Vitamina B2	0.07 mg
Vitamina B3	0.50 mg
Vitamina B5	0.20 mg
Vitamina B6	0.13 mg
Vitamina B9	19 µg
Vitamina C	28 mg
Vitamina E	0.26 mg

I.3.3.1. FLAVONOIDES

Las cebollas son ricas en compuestos flavonoides y ácidos fenólicos y constituyen una de las mayores fuentes de flavonoides en la dieta (Knekt et al., 1996). Los compuestos fenólicos de la cebolla, en particular los flavonoides, son conocidos por sus propiedades antioxidantes y captadoras de radicales libres.

En la cebolla podemos encontrar dos tipos de flavonoides, las antocianinas, responsables del color rosa-morado de algunas variedades, y los flavonoles, como la quercetina y el kaempferol (Leighton et al., 1992). En la cebolla, la quercetina se encuentra mayoritariamente unida a azúcares formando glicósidos (Gennaro et al., 2002). De acuerdo a Hollman y Arts (2000), la concentración de quercetina en cebolla es de 300 mg/kg, superior al contenido de este compuesto en otros vegetales como el

brócoli (100 mg/kg), la manzana (50 mg/kg) o el té (30 mg/kg). No obstante, la concentración de flavonoides en las cebollas depende de la variedad estudiada, así como de la parte de la cebolla, habiendo una notable diferencia entre las capas externas e internas (Griffiths et al., 2002). No obstante la distribución de estos compuestos en la cebolla no es uniforme. La quercetina constituye el 88% de los flavonoles de la cebolla (Lombard et al., 2005) y el 90% de la misma se encuentra en las dos primeras capas externas de la cebolla (Mizuno et al., 1992). El kaempferol también se encuentra mayoritariamente en las capas externas (Bilyk et al., 1994).

Tal y como se ha comentado, el contenido fenólico y la capacidad antioxidante también depende de la variedad. De esta manera, las variedades rojas y amarillas parecen poseer un mayor porcentaje de compuestos fenólicos que las blancas. Prakash et al. (2007) compararon el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de variedades de cebolla verde, blanca, roja y morada y sugirieron que las variedades rojas tenían los contenidos en quercetina y kaempferol más altos. Gorinstein et al. (2009) también concluyeron que las variedades rojas tenían el mayor contenido de compuestos bioactivos y la mayor actividad antioxidante. Gökçe et al. (2010) estudiaron la influencia del color en la capacidad antioxidante y en el contenido de fenoles totales de nueve variedades comerciales y concluyeron que el grupo de variedades amarillas tenía el mayor contenido de fenoles totales pero que el grupo de variedades rojas tenía la mayor actividad antioxidante. No obstante, también indicaron que es posible obtener actividades antioxidantes elevadas en variedades blancas y amarillas debido a su elevado contenido en quercetina y kaempferol. De las variedades producidas en España, la Recas es la que presenta un contenido en compuestos flavonoides y actividad antioxidante más alto, de acuerdo con Roldán et al. (2008).

El contenido total de fenoles, flavonoides y la actividad antioxidante pueden verse afectadas por variables de presión y temperatura. Estudios realizados por Roldán-Marín et al. (2009), demostraron que en cebolla sometida a un tratamiento de 400 MPa/5 °C podría aumentar la cantidad de fenoles totales y la extracción de flavonoides en comparación de una cebolla no tratada.

I.3.3.2. PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS

La cebolla contiene un derivado del aminoácido cisteína denominado aliina (S-alquil-L-cisteína sulfóxido). Se convierte en alicina al entrar en contacto con la enzima aliinasa por rotura del tejido. La alicina es un compuesto inestable que forma espontáneamente mono, di y tri sulfuros. Estos alil sulfuros muestran propiedades anticarcinogénicas (Goveas, 2011) y además son los responsables de la irritación ocular y el consecuente lagrimeo que tiene lugar al cortar este vegetal.

En la cebolla hay presentes diversos aminoácidos libres (Kuon y Bernhard, 1963). El mayor porcentaje de estos aminoácidos corresponde a arginina y ácido glutámico (Schuphan y Schwedtfeger, 1972; Breu, 1991). El contenido de arginina y ácido glutámico aumenta un 29% y un 7%, respectivamente, durante el crecimiento del bulbo, mientras que los niveles del resto de aminoácidos permanece relativamente constante, lo que parece indicar que estos dos aminoácidos actúan como fuente de nitrógeno en la cebolla (Mattikala y Virtanen, 1967; Schuphan y Schwedtfeger, 1972).

La cebolla también contiene compuestos de selenio, como la selenocisteína y la selenometionina (Spare y Virtanen, 1964).

En la Tabla I.3.2, se muestran los principales aminoácidos de la cebolla. Estos aminoácidos se combinan para formar proteínas. Las proteínas de la cebolla son usadas por nuestro organismo para la formación y mantenimiento de nuestra masa muscular.

Tabla I.3.2. Principales aminoácidos de la cebolla. Fuente: USDA SR-21, 2008.

Composición por 100 g de porción comestible			
Ácido glutámico	413 mg	Arginina	166 mg
Ácido aspártico	146 mg	Lisina	62.4 mg
Leucina	40 mg	Fenilalanina	40 mg
Glicina	40 mg	Serina	33.6 mg
Valina	33.6 mg	Alanina	33.6 mg
Treonina	33.6 mg	Triptófano	22.4 mg
Isoleucina	22.4 mg	Histidina	22.4 mg
Tirosina	22.4 mg	Prolina	19.2 mg
Cisteína	6.4 mg	Metionina	3.2 mg

I.3.3.3. FIBRA

La cebolla es una buena fuente de fibra dietética y de fructooligosacáridos (Jaime et al., 2001a y 2001b) y hasta se ha investigado acerca del posible aprovechamiento de sus subproductos como ingredientes ricos en fibra (Roldán et al., 2008, Waldron, 2001). La fibra dietética previene la obesidad, enfermedades cardiovasculares y diabetes (Champ et al., 2003). Existen algunas diferencias varietales en las proporciones de fibra soluble e insoluble. La fracción soluble representa entre el 30 y el 50% del total dependiendo de la variedad (Grigelmo-Miguel y Martin-Belloso, 1999).

De acuerdo con estudios de Ng et al. (1998, 2000), las pectinas de la pared celular de las cebollas consisten en una serie de polímeros que difieren en gran medida por la facilidad de extracción de la pared celular. La composición de los carbohidratos de la pared celular es similar entre las variedades, pero existen variaciones sustanciales en la distribución en el bulbo. En las capas carnosas, el material de la pared celular contiene ácido urónico, glucosa, arabinosa y galactosa, con menores cantidades de xilosa y manosa. En las capas celulósicas, en cambio, no hay galactosa.

El procesado puede afectar a los carbohidratos que forman parte de la fibra dietética. Procesos como la cocción o el calentamiento por microondas generan variaciones importantes en el contenido de fibra dietética y cambios estructurales en los tejidos (Rehman et al., 2003; Sukhwant et al., 1992). Por ello, es de esperar que el procesado con altas presiones hidrostáticas ocasione modificaciones en la fracción de fibra dietética de la cebolla y con ello modificaciones en la textura de las mismas.

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II.1. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es avanzar en el conocimiento de la relación entre la microestructura y la mejora de la funcionalidad de compuestos bioactivos de tejidos vegetales sometidos a altas presiones hidrostáticas (APH), empleando como vegetales modelo, el fruto del caqui (*Diospyros kaki* L.f.) y el bulbo de cebolla (*Allium cepa* L.).

Para la consecución del objetivo general se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Estudiar y caracterizar la matriz de los tejidos vegetales objeto de estudio, caqui y cebolla, mediante análisis microestructurales y fisicoquímicos.
- Analizar el efecto de diversas variables (presión, temperatura y tiempo) del procesado con APH sobre la microestructura y algunas propiedades fisicoquímicas de caqui y cebolla. Relacionar este efecto con la mejora de la funcionalidad (difusión y extractabilidad) de compuestos bioactivos.
- Investigar los posibles cambios microestructurales y fisicoquímicos que se producen en caqui y cebolla tratados con APH, a lo largo del periodo de almacenamiento (28 días a 4 °C), y relacionar estos cambios con la mejora de la funcionalidad de compuestos bioactivos.

II.2. PLAN DE TRABAJO

1. Búsqueda y estudio bibliográfico de manera sistemática durante la realización de la tesis. Estudio de la normativa y protocolos a seguir en la parte experimental.
2. Diseño de experimentos.
3. Caracterización microestructural del caqui 'Rojo Brillante', astringente y no astringente, en distintos estados de maduración mediante las técnicas de microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (Cryo-SEM), microscopía óptica (LM), microscopía electrónica de Transmisión (TEM) y microscopía láser confocal de barrido (CLSM).
4. Estudio de algunas propiedades fisicoquímicas (contenido en taninos solubles (TS), contenido de sólidos solubles totales (SST), pH, color y textura) del caqui 'Rojo Brillante', astringente y no astringente, en distintos estados de maduración.
5. Estudio del efecto del tratamiento con APH, en distintas condiciones de presión, tiempo y temperatura, sobre la microestructura (Cryo-SEM, LM, TEM y CLSM) y algunas propiedades fisicoquímicas (TS, SST, pH, color y textura) del caqui 'Rojo Brillante', astringente y no astringente, en distintos estados de maduración.
6. Estudio del efecto del almacenamiento en refrigeración sobre la microestructura y algunas propiedades fisicoquímicas del caqui 'Rojo Brillante' tratado con APH.
7. Caracterización microestructural de diversas variedades de cebolla mediante las técnicas de Cryo-SEM, microscopía electrónica de barrido (SEM) y LM.
8. Estudio de algunas propiedades fisicoquímicas (contenido en fenoles solubles totales (FST), porcentaje de proteína soluble (PPS), color y textura) de distintas variedades de cebolla.
9. Estudio del efecto del tratamiento con APH, en distintas condiciones de presión y temperatura, sobre la microestructura (Cryo-SEM, LM, TEM) y algunas propiedades fisicoquímicas (FST, PPS, color y textura) de cebolla.
10. Estudio del efecto del almacenamiento en refrigeración sobre la microestructura y algunas propiedades fisicoquímicas de cebolla tratada con APH.
11. Análisis de resultados, redacción de informes y divulgación científica.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. MATERIAL VEGETAL

En este estudio se emplean caqui ‘Rojo Brillante’ y cebollas de las variedades ‘Doux’, ‘Recas’ y ‘Figueres’.

Los frutos de caqui de la variedad ‘Rojo Brillante’ fueron recolectados en Carlet y Alzira (España) y facilitados por la Agrupación Nacional de Exportación de Cooperativas Citrícolas (ANECOOP). Los frutos correspondientes al primer estudio sobre el efecto de distintas condiciones de tratamiento de altas presiones hidrostáticas (APH) en caqui fueron recolectados en dos estados distintos de maduración a principios de noviembre y principios de diciembre de 2009. El estado de maduración del fruto se determinó según la coloración externa del fruto, en base a la cual existe una escala de 6 estados, 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 estudiaron lotes correspondientes a los estados de maduración III y V (denominados 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). Tras el tratamiento de desastringencia, los frutos fueron conservados en refrigeración a 4 °C junto con la otra mitad del lote, el no tratado (muestras astringentes), hasta su posterior tratamiento con APH. En la Figura III.1.1 se presentan en un esquema las cuatro muestras de caqui ‘Rojo Brillante’ consideradas para estudiar el efecto de las APH. Los frutos correspondientes al estudio de vida útil de caqui procesado con APH fueron recolectados a principios de noviembre de 2010. Estos frutos corresponden al estado de maduración M1 y no fueron sometidos a tratamiento de desastringencia (astringentes).

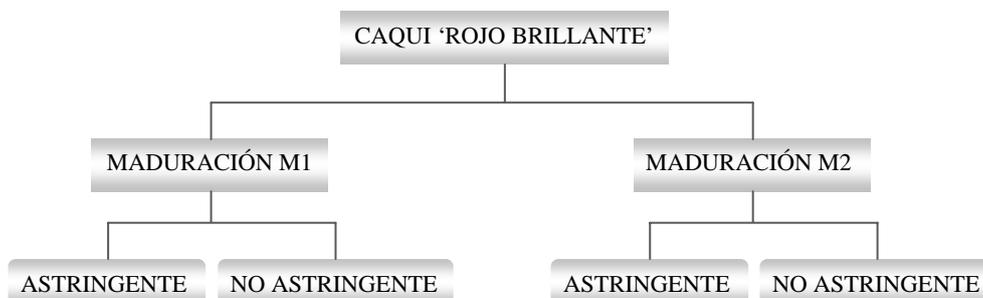


Figura III.1.1. Muestras de caqui ‘Rojo Brillante’ consideradas en el estudio sobre el efecto de altas presiones hidrostáticas.

Tanto las cebollas empleadas para la caracterización y selección de la variedad (variedades ‘Doux’, ‘Recas’ y ‘Figueres’) como las cebollas ‘Recas’, empleadas en los posteriores estudios con APH fueron recolectadas en Lérida (España) y facilitadas por la empresa Cebafruit – Grupo Vilodi. Las cebollas para la caracterización y selección de la variedad fueron recolectadas a principios de mayo de 2009. Las cebollas ‘Recas’ para los estudios de distintas condiciones de tratamiento de APH y de vida útil fueron

III. Material y Métodos

recolectadas a finales de abril de 2010 y principios de mayo de 2011, respectivamente. Tras su recepción, todos los lotes de cebolla fueron almacenados a 4 °C en el Instituto del Frío, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Madrid, España) durante 24 horas hasta su posterior procesado con APH.

III.2. TRATAMIENTOS CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

Para realizar el tratamiento con APH en caqui, se cortaron cubos de 15 mm de lado de la zona ecuatorial de los frutos con una cuchilla de acero inoxidable y se introdujeron de manera aleatoria en bolsas flexibles de plástico tipo Doypack (110x220 mm de Amcor, España) conteniendo al final cada una, aproximadamente, 80 gramos de muestra, es decir, entre 20 y 22 cubos. Las bolsas se presionaron levemente para extraer parcialmente el aire sin dañar los cubos y fueron entonces termoselladas (Figura III.2.1).

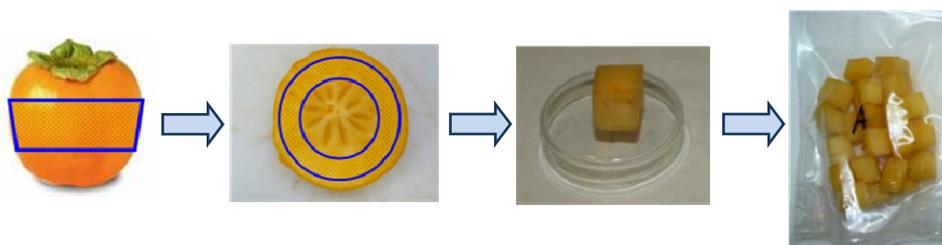


Figura III.2.1. Esquema de la preparación de las muestras de caqui ‘Rojo Brillante’ para su procesado con altas presiones hidrostáticas.

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 empleando agua como medio presurizante (Figura III.2.2.) y se aplicaron diversos tratamientos de APH con diversas combinaciones de presión, tiempo y temperatura.



Figura III.2.2. Unidad de presión hidrostática empleada en el procesado de caqui y cebolla.

En la Tabla III.2.1 se muestran las condiciones de tratamiento aplicadas en el estudio del efecto de las APH sobre el caqui y los tratamientos posteriormente seleccionados para el estudio de vida útil. Tras la descompresión instantánea, las bolsas fueron almacenadas a 4 °C hasta su análisis.

Tabla III.2.1. Condiciones de presión, tiempo y temperatura de los tratamientos de altas presiones aplicados en los estudios con caqui 'Rojo Brillante'.

Efecto de las altas presiones en caqui (Noviembre-Diciembre 2009)			
Tratamiento	Presión (MPa)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
T1	200	1	25
T2		3	
T3		6	
T4	400	1	
T5		3	
T6		6	
Vida útil de caqui tratado con altas presiones (Noviembre 2010)			
Tratamiento	Presión (MPa)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
T1	200	3	37.5
T2	200	6	37.5

III. Material y Métodos

Para su procesado con APH, las cebollas fueron peladas y cortadas por la mitad transversalmente. Las mitades de cebolla se introdujeron a pares en bolsas flexibles de plástico tipo Doypack (Amcor, España) y se procedió a su sellado de la misma manera que con las muestras de caqui (Figura III.2.3). Se empleó el mismo equipo de altas presiones que con el caqui. No obstante las condiciones de tratamiento fueron diferentes.

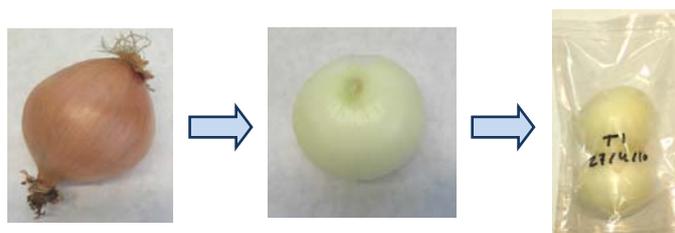


Figura III.2.3. Esquema de la preparación de las muestras de cebolla 'Recas' para su procesado con altas presiones hidrostáticas.

En la Tabla III.2.2 se muestra las diferentes combinaciones de presión, temperatura y tiempo utilizadas con la cebolla 'Recas', tanto las empleadas para el estudio del efecto de las APH en cebolla, como las posteriormente seleccionadas para el estudio de vida útil.

Tabla III.2.2. Condiciones de presión, temperaturas y tiempo de los tratamientos de altas presiones aplicados en los estudios con cebolla 'Recas'.

Efecto de las altas presiones en cebolla (Abril 2010)			
Tratamiento	Presión (MPa)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
T1	100	25	5
T2		37.5	
T3		50	
T4	250	25	
T5		37.5	
T6		50	
T7	400	25	
T8		37.5	
T9		50	
Vida útil de cebolla tratada con altas presiones (Mayo 2011)			
Tratamiento	Presión (MPa)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
T1	100	50	5
T2	400	25	5

III.3. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

Para la caracterización de la microestructura de los vegetales objeto de estudio, caqui y cebolla, se han empleado las técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido a Bajas Temperaturas (Cryo-SEM), Microscopía Óptica (LM), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopía Láser Confocal de Barrido (CLSM) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

III.3.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJAS TEMPERATURAS

Para su observación en el microscopio electrónico de barrido a bajas temperaturas (Figura III.3.1), a partir de los cubos de caqui se cortaron muestras de 1 mm de espesor con una cuchilla de acero inoxidable. En el caso de la cebolla se cortaron piezas de 1 mm de espesor de la segunda (capa externa) y quinta (capa interna) capa carnosa.

Las piezas se sumergieron en nitrógeno nieve a una temperatura no superior a $-210\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se transfirieron rápidamente 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 (temperatura inferior a $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$) y a vacío (10^{-2} bar de presión). En el Cryo-Trans las muestras se fracturaron a $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ con ayuda de un pequeño punzón. Los cortes se sublimaron a $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 15 o 10 minutos, según se tratara de caqui o cebolla, con el fin de eliminar el posible exceso de escarcha superficial que pudiera enmascarar la adecuada observación del tejido.

Finalmente, las muestras se recubrieron con oro en el mismo Cryo-Trans (a 10^{-2} bar y 40 mA) y se observaron en el microscopio a un voltaje de 10 kV en el caso de caqui y 15 kV en el caso de la cebolla, y a una distancia de trabajo de 15 mm.



Figura III.3.1. Cryo-Trans CT1x500C de Oxford Instruments acoplado a un microscopio de barrido Jeol JSM 5410.

III.3.2. MICROSCOPIA ÓPTICA

El análisis microestructural mediante un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 V-PS100E (Nikon, Tokio, Japón) se realizó a partir de secciones criostato de tejido fresco y de secciones semifinas de tejido incluido en resina.

III.3.2.1. SECCIONES CRIOSTATO

Para la obtención de secciones criostato, los cubos de caqui de 15 mm³ y los cuadrados de cebolla de aproximadamente 15 mm² se congelaron a -60 °C en un ultracongelador (Dairei Europe, Denmark) durante 24 horas y fueron transferidos rápidamente al criostato (CM1950, Leica Biosystems, Nussloch, Germany), donde se dejaron 15 minutos para que se equilibraran con la temperatura de la cámara del criostato (-25 °C) y se fijaron a un soporte para muestras. Las secciones de 10 µm se obtuvieron mediante una cuchilla de acero inoxidable, se recogieron mediante un pincel y se depositaron en vidrios portamuestras previamente enfriados en la cámara del criostato (Figura III.3.2).

Para las secciones criostato de caqui se emplearon como agentes de tinción azul de toluidina al 0.2% para una visualización general de la estructura y vainillina-HCl al 10% (1:1 v/v) para la identificación de taninos (Valette et al., 1998). Algunas de las muestras de caqui no fueron teñidas para estudiar la presencia de carotenoides.

Para las secciones criostato de cebolla se emplearon, además de los dos agentes de tinción anteriores, cloruro férrico al 2% y permanganato potásico al 2% para la localización de compuestos fenólicos.



Figura III.3.2. Criostato CM1950 de Leica Biosystems.

III.3.2.2. SECCIONES INCLUIDAS

Para la obtención de secciones de tejido incluido en resina, se cortaron con cuchilla de acero inoxidable trozos de, aproximadamente, 2 mm^3 a partir de los cubos de caqui y de las capas de cebolla. A continuación se sometieron a un proceso de fijación con glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato 0.025 M a 4°C durante 24 horas y tras su lavado con dicho tampón, se postfijaron con tetróxido de osmio al 2% en tampón fosfato 0.05 M. A continuación se deshidrataron con disoluciones de concentraciones crecientes de acetona (30, 50 y 70%), se contrastaron con acetato de uranilo al 4% durante 2 horas y se continuó con la deshidratación con acetona (90 y 100%). Finalmente se infiltraron e incluyeron en resina epoxi (Durcupan, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 65.5°C durante 72 horas.

Los bloques de resina con la muestra incluida en su interior se cortaron con la ayuda de un ultramicrotomo Ultracut de Reichert-Jung (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) para la obtención de secciones semifinas de $1.5 \mu\text{m}$ de espesor y fueronteñidas posteriormente con azul de toluidina al 0.2% (Figura III.3.3).



Figura III.3.3. Ultramicrotomo Ultracut de Reichert-Jung.

III.3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para su observación por microscopía electrónica de transmisión (TEM), se prepararon bloques de resina con muestra incluida de la misma manera que para microscopía óptica. Sin embargo, para TEM los bloques se cortaron por ultramicrotomía para obtener secciones ultrafinas de $0.05 \mu\text{m}$ de espesor. Estas secciones se recogieron sobre rejillas de cobre y se tiñeron con citrato de plomo al 4% y acetato de uranilo al 2%. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión EM 400 de (Philips, Eindhoven, Holanda) a 80 kV (Figura III.3.4).



Figura III.3.4. Microscopio electrónico de transmisión EM 400 de Philips.

III.3.4. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL DE BARRIDO

Las observaciones por microscopía láser confocal de barrido (CLSM) de las muestras de caqui se realizaron mediante un microscopio láser confocal Nikon C1 acoplado a un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 V-PS100E (Nikon, Tokio, Japón) en modo de fotón simple equipado con un láser Ar-Kr (Figura III.3.5). La longitud de onda de excitación fue de 488 nm y la emisión autofluorescente de la muestra se observó a través de un filtro de paso de banda de 515/530 nm. La emisión autofluorescente de las muestras de caqui se atribuyeron a carotenoides, ya que en un estudio sobre la cuantificación de carotenoides mediante autofluorescencia en levaduras, An et al. (2000) 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.



Figura III.3.5. Microscopio óptico Nikon Eclipse E800 V-PS100E con microscopio láser confocal Nikon C1 acoplado (Nikon, Tokio, Japón).

III.3.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Para la observación de las muestras por microscopía electrónica de barrido (SEM), se cortaron trozos de, aproximadamente, 3 mm^3 a partir de las capas de cebolla. A continuación se sometieron a un proceso de fijación primaria con glutaraldehído al 2.5% y fijación secundaria con tetróxido de osmio al 2% idéntico al aplicado para la obtención de muestras incluidas en resina para microscopía óptica. Tras la fijación, las muestras se deshidrataron con concentraciones crecientes de acetona (30, 50 y 70% y 100%) cada 20 minutos. A continuación se ultradeshidrataron por el sistema de punto crítico con CO_2 (7.58 MPa, $31.5 \text{ }^\circ\text{C}$) en un instrumento POLARON E3000 (Watford, Reino Unido). Las muestras fueron recubiertas con oro usando un equipo POLARON E6100 (10^{-4} mbar, 20 mA, 80 s) y observadas en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 6300 (Jeol, Tokio, Japón) a 10 kV y a una distancia de trabajo de 15 mm.

III.4. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

III.4.1. ELABORACIÓN DE LOS ZUMOS

A excepción de la determinación del color y de las propiedades texturales, el resto de análisis físicoquímicos se realizaron a partir de zumos de las muestras. Los zumos se prepararon de forma distinta dependiendo del vegetal a estudiar. En caqui, se homogeneizaron 60 gramos de cubos de caqui de 3 bolsas distintas. En cebolla, se homogeneizaron 60 gramos de trozos de al menos 3 mitades de cebolla distintas y con representación de todas las capas. La homogeneización se realizó con un ultraturrax IKA T25 basic durante 90 segundos. El zumo fue entonces almacenado en botes de cristal herméticamente cerrados a $-60 \text{ }^\circ\text{C}$ en un ultracongelador (Dairei Europe, Denmark) hasta su posterior análisis.

III.4.2. CONTENIDO EN TANINOS SOLUBLES

El contenido en taninos solubles (TS) fue determinado para cada tratamiento a partir de dos zumos de caqui distintos. El análisis se realizó siguiendo el Método Folin-Denis, basado en la reducción del reactivo Folin-Denis por los taninos solubles en una disolución alcalina, según la metodología indicada por Arnal y del Río (2004). Se homogeneizaron 5 gramos de zumo de caqui con 25 mL de una disolución de metanol en agua al 80% con ayuda de un ultraturrax (IKA-ultraturrax T25 basic). El homogeneizado obtenido se centrifugó a 14500 rpm durante 20 minutos a 4 °C y se filtró a vacío con kitasatos y embudo Buchner. El sobrenadante se reservó a 4 °C. Se repitió la operación de homogeneización, centrifugado y filtrado con el precipitado obtenido. El nuevo sobrenadante se mezcló con el previamente reservado y dicha mezcla se aforó a 100 mL con agua destilada. A partir de 1 mL de esta disolución se realizó una dilución 1:7 en agua destilada y se añadió 0.5 mL de reactivo Folin Ciocalteu y se agitó brevemente. Transcurridos 3 minutos se añadió 1 mL de carbonato sódico saturado (20%). Finalmente se adicionó 1.5 mL de agua bidestilada y se dejó reposar en oscuridad durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia de la muestra a 725 nm. La curva de calibrado se realizó utilizando diferentes concentraciones de ácido gálico. La concentración de taninos solubles se expresó como gramos de ácido gálico por 100 gramos de peso fresco (pf). Se realizaron mediciones en dos zumos distintos efectuando dos réplicas por zumo.

III.4.3. CONTENIDO EN FENOLES SOLUBLES TOTALES

El contenido en fenoles solubles totales (FST) fue analizado con un espectrofotómetro Helios Zeta UV-Visible (Thermo Fisher Scientific Inc., Cambridge, Reino Unido) usando una modificación del método empleado para taninos solubles. Se homogeneizaron 10 gramos de zumo de cebolla con 25 mL de metanol 80% y dicho homogeneizado se filtró y se aforó a 50 mL con agua destilada. Con 1 mL de ese extracto se realizó una dilución 1:7 con agua destilada a la que se añadió 0.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Tras 3 minutos, se añadió 1 mL de carbonato sódico al 20%. La disolución se dejó en reposo durante 90 minutos a temperatura ambiente y a continuación se midió su absorbancia a 760 nm. Los resultados fueron expresados como gramos de ácido gálico por 100 gramos de peso fresco. Se realizaron mediciones en tres zumos distintos efectuando dos réplicas por zumo.

III.4.4. PORCENTAJE DE PROTEÍNA SOLUBLE

Tanto la proteína total como la soluble se determinó por N-Kjeldahl a partir de muestras de zumo de cebolla liofilizada empleando como catalizador una mezcla de K_2SO_4 , $CuSO_4$ y Se (10:1:0.1). El nitrógeno soluble fue extraído conforme al método oficial AOAC 932.08 (AOAC, 2000). Se realizaron determinaciones de tres zumos distintos por muestra. El nitrógeno valorado se convirtió a proteína usando un factor de conversión de 6.25 y los resultados se expresaron como porcentaje de proteína soluble respecto a la proteína total.

III.4.5. CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES Y PH

El contenido en sólidos solubles (SST) y el pH se determinaron a partir de tres zumos de caqui distintos con dos repeticiones por zumo. La determinación del contenido en SST se realizó con un refractómetro digital Atago ATC-1E y los resultados se expresaron en °Brix. Para la determinación del pH se utilizó un pH-metro Basic 20 de Crison (Barcelona, España).

III.4.6. COLOR

El color de los cubos de caqui y de las mitades de cebolla se midieron usando las coordenadas triestímulo mediante un cabezal cromatógrafo CR-400 Konica Minolta (apertura de diámetro 8 mm, iluminación estándar D65 y observador a 10°). Se calibró con un patrón estándar blanco ($Y=92.9$; $x=31.37$; $y=31.98$). El color fue registrado usando el espacio uniforme CIELab: L^* (luminosidad), a^* (tonalidad verde-roja) y b^* (tonalidad azul-amarilla). La luminosidad viene descrita por el parámetro L^* . El color negro presenta una luminosidad de 0, mientras que el blanco tiene un valor de luminosidad de 100. El parámetro a^* varía en una escala de -100 a 100, correspondiendo los valores negativos a distintas tonalidades de color verde y los positivos a las de color rojo. Por otra parte, b^* representa la variación entre azulado-amarillento y varía entre los mismos valores que a^* . Ambas coordenadas se utilizan para evaluar la saturación (C^*) y el tono (h). La saturación da la pureza de un color y el tono es la cualidad que diferencia un color de otro. Para el cálculo de estos parámetros se utilizan las ecuaciones Ec.III.1 y Ec.III.2.

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{Ec. III.4.1})$$

$$h = \arctan \frac{b^*}{a^*} \quad (\text{Ec. III.4.2})$$

Los cambios de color en las muestras de caqui y cebolla se analizaron en función de los valores de L^* , C^* y h a partir de 10 mediciones por muestra. En el caso del caqui se realizó el registro de las coordenadas L^* , a^* y b^* en 10 cubos distintos y en el caso de la cebolla se realizó la medida en la capa externa de 5 mitades de cebolla procedente de 5 bulbos distintos, efectuando dos mediciones por mitad.

III.4.7. PROPIEDADES TEXTURALES

La determinación de las propiedades texturales se realizó a temperatura ambiente con un analizador de textura TA XTplus (Stable Micro Systems, Reino Unido). Las propiedades texturales estudiadas fueron la firmeza, tanto en caqui como en cebolla, la cohesividad en caqui y la resistencia al corte en cebolla.

III.4.7.1. FIRMEZA

La firmeza se evaluó mediante un ensayo de punción como la fuerza máxima necesaria para romper el tejido a una velocidad de ensayo de 1 mm/s. En el caso del caqui, se empleó una sonda cilíndrica de 4 mm de diámetro para penetrar en los cubos y se realizaron medidas en 8 cubos por muestra. En el caso de la cebolla, se empleó una sonda de 2 mm de diámetro para romper la epidermis de la tercera capa carnosa de la cebolla (Figura III.4.1 A). Se realizaron 2 medidas por cada mitad y se analizaron 4 mitades distintas por muestra.

III.4.7.2. COHESIVIDAD

La cohesividad es un indicador de la energía mecánica necesaria para destruir la estructura interna del alimento. La cohesividad fue evaluada mediante un análisis de perfil de textura (TPA), más directamente relacionada con la interacción entre los principales componentes estructurales del caqui. Para ello se realizó una compresión en dos tiempos de los cubos de caqui en sentido axial con un émbolo de sección plana de 50 mm de diámetro, a una velocidad de ensayo de 1 mm/s y hasta alcanzar un 75% de compresión con respecto a la altura inicial del cubo. Se dejaron 3 segundos de espera entre los ciclos. La cohesividad se expresó como el cociente entre las áreas correspondientes a la segunda y la primera compresión (Figura III.4.1 B). Se realizaron medidas en 8 cubos por muestra.

III.4.7.3. RESISTENCIA AL CORTE

La determinación de la resistencia al corte en segmentos de cebolla se realizó mediante un ensayo de cizallamiento (Warner-Bratzler). Se cortaron 2 segmentos longitudinales de 15 mm de espesor con representación de todas las capas de cada mitad y se analizaron 4 mitades distintas por muestra. Cada segmento se colocó en la base del analizador de textura de modo que la hoja de corte cuadrada cortara simultáneamente el parénquima de todas las capas por la zona ecuatorial en dirección perpendicular al eje principal de la cebolla (Figura III.4.1 C). La resistencia al corte fue expresada como la fuerza necesaria para romper los segmentos a una velocidad de ensayo de 1 mm/s.

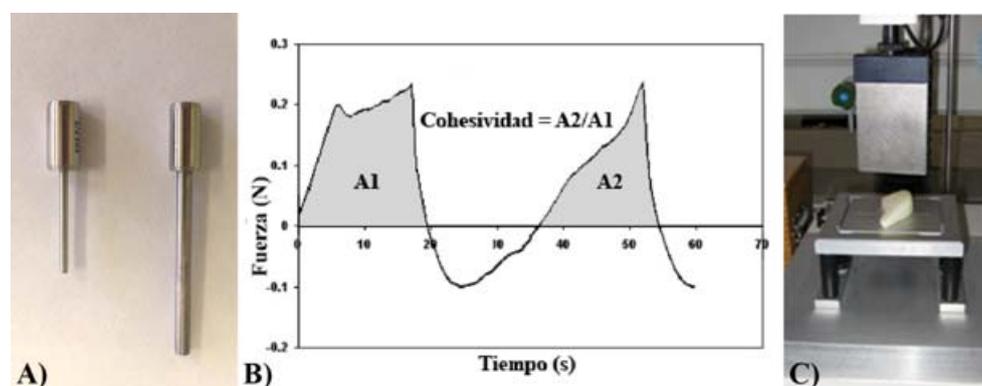


Figura III.4.1. A) Sondas cilíndrica de 2 y 4 mm de diámetro para los ensayos de punción. B) Curva típica de perfil de textura. C) Disposición de las muestras de cebolla en el ensayo de cizallamiento.

III.4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se emplearon diseños de experimentos multifactorial categóricos con cuatro factores en el estudio del efecto de las APH en caqui (estado de maduración, nivel de astringencia, presión aplicada y tiempo de tratamiento), con dos factores en el estudio del efecto de las APH en cebolla (presión aplicada y temperatura de tratamiento) y con dos factores para los estudios de vida útil de caqui y cebolla tratados con APH (tratamiento y tiempo de almacenamiento).

Para la determinación de las condiciones óptimas de APH en cebolla, se empleó un diseño de experimentos multinivel factorial con tres niveles de presión (100, 250 y 400 MPa) y tres de temperatura (25, 37.5 y 50 °C).

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 utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1 (Manugistics, Inc., Rockville, MA, EE.UU.)

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN CAQUI ‘ROJO BRILLANTE’

Para estudiar el efecto de las altas presiones hidrostáticas (APH) sobre la microestructura y algunas propiedades fisicoquímicas del caqui ‘Rojo Brillante’, se realizan tratamientos a distinta presión, tiempo y temperatura (tabla IV. 1.1). Se utiliza caqui, en dos estados de maduración, uno temprano (M1) y uno avanzado (M2), con y sin tratamiento de desastringencia, ya que como se ha comentado en el Capítulo I, el caqui ‘Rojo Brillante’ se comercializa principalmente tras aplicarle un tratamiento de desastringencia con CO₂. En la Tabla IV.1.2 se presentan las principales características fisicoquímicas del caqui en los estados de maduración M1 y M2, astringente y no astringente.

Tabla IV.1.1. Combinaciones de presión, tiempo y temperatura utilizadas en los tratamientos de altas presiones para caqui ‘Rojo Brillante’.

Tratamiento	Presión (MPa)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
T1	200	1	25
T2		3	
T3		6	
T4	400	1	
T5		3	
T6		6	

Tabla IV.1.2. Características fisicoquímicas de caqui ‘Rojo Brillante’ en estado de maduración M1 y M2, astringentes y sometidos a tratamiento de desastringencia previo. Media \pm desviación estándar. SST: sólidos solubles totales.

	Maduración M1		Maduración M2	
	Astringente	No astringente	Astringente	No astringente
SST (°Brix)	16.94 \pm 0.85 *	15.23 \pm 1.01	17.00 \pm 0.44 *	15.83 \pm 0.15
pH	5.78 \pm 0.07 *	5.95 \pm 0.05	5.81 \pm 0.07	5.85 \pm 0.05
L*	66.42 \pm 3.72	67.15 \pm 1.05	70.81 \pm 2.53	69.69 \pm 1.22
C*	43.80 \pm 3.72	38.00 \pm 4.74	42.78 \pm 3.69	44.34 \pm 1.58
h	85.46 \pm 1.64	87.30 \pm 0.87	84.47 \pm 1.44	85.26 \pm 1.08
Firmeza (N)	10.87 \pm 1.02	10.83 \pm 1.44	2.93 \pm 0.36 *	3.94 \pm 0.44

El asterisco indica que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la muestra astringente y la no astringente dentro de un mismo estado de maduración.

IV.1.1. ESTUDIO MICROESTRUCTURAL

El análisis de la microestructura de las muestras mediante la aplicación de diferentes técnicas microscópicas, permite complementar, contrastar y confirmar la información adquirida. Aunar los resultados obtenidos en el estudio microestructural facilita la identificación y localización de componentes químicos de interés y la caracterización de las modificaciones estructurales que se producen después del tratamiento con APH.

IV.1.1.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJAS TEMPERATURAS

El empleo de la técnica de microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (Cryo-SEM) permite obtener información general sobre la microestructura del tejido así como identificar los espacios ocupados por líquido.

El tejido parenquimático del caqui 'Rojo Brillante' astringente en estado de maduración M1 (Figura IV. 1.1) tiene una apariencia compacta y está constituido por células redondeadas de entre 100 y 130 μm de diámetro que están íntimamente unidas entre sí, y por pequeños espacios intercelulares en su mayoría llenos de aire (Figura IV.1.1 A y B). El interior celular está casi totalmente ocupado por una gran vacuola llena de material soluble, que se identifica en las imágenes como una estructura reticular (Figura IV.1.1 B). Esta estructura se conoce como artefacto eutéctico o fenómeno de agregación de solutos y es inherente a la técnica microscópica de Cryo-SEM; se produce por la acumulación de material soluble durante la sublimación del agua superficial de la muestra, (Neri et al., 2010). En este estado de maduración (M1) se observa que algunos de los espacios intercelulares se encuentran ocupados por material soluble procedente del interior celular, probablemente debido a las modificaciones estructurales que produce la maduración.

Tras tratar el caqui astringente en estado de maduración M1 con 200 MPa durante 1 minuto (Figura IV.1.1 C y D), el tejido parenquimático presenta una estructura más compacta. Las células aparecen deformadas, las paredes celulares, plasmalema y tonoplasto se observan degradados, y hay una mayor cantidad de espacios intercelulares repletos de material soluble procedente, de la degradación de las paredes celulares y del interior celular. En el interior de algunas células (células tánicas) aparece una masa compacta de material insoluble debido probablemente a que las APH producen la precipitación de los taninos (Figura IV.1.1 D). En los espacios intercelulares colindantes a estas células tánicas también se observa material insoluble, lo que indica que al aplicar presión se produce la difusión de líquido intracelular hacia los espacios intercelulares y su posterior precipitación. Las APH parecen favorecer la precipitación de los taninos, tanto dentro (simplasto) como fuera (apoplasto) de las células tánicas. De acuerdo con Cheftel (1992), la aplicación de altas presiones favorece cualquier reacción que lleve a un descenso del volumen molar total, como la precipitación de los taninos del caqui.

Al aplicar al caqui astringente en estado de maduración M1 400 MPa durante 6 minutos (Figura IV. 1.1 E y F), las células se colapsan, las paredes y membranas

celulares se observan muy degradadas y los espacios intercelulares están ahora ocupados por líquido, de manera que se pierde la identidad celular. Aparecen nuevas cavidades por el efecto de la compresión-descompresión durante el tratamiento (Figura IV.1.1 E), tal y como también describe Préstamo y Arroyo (1998) en hojas de espinaca tratadas con 400 MPa durante 30 minutos a 5 °C.

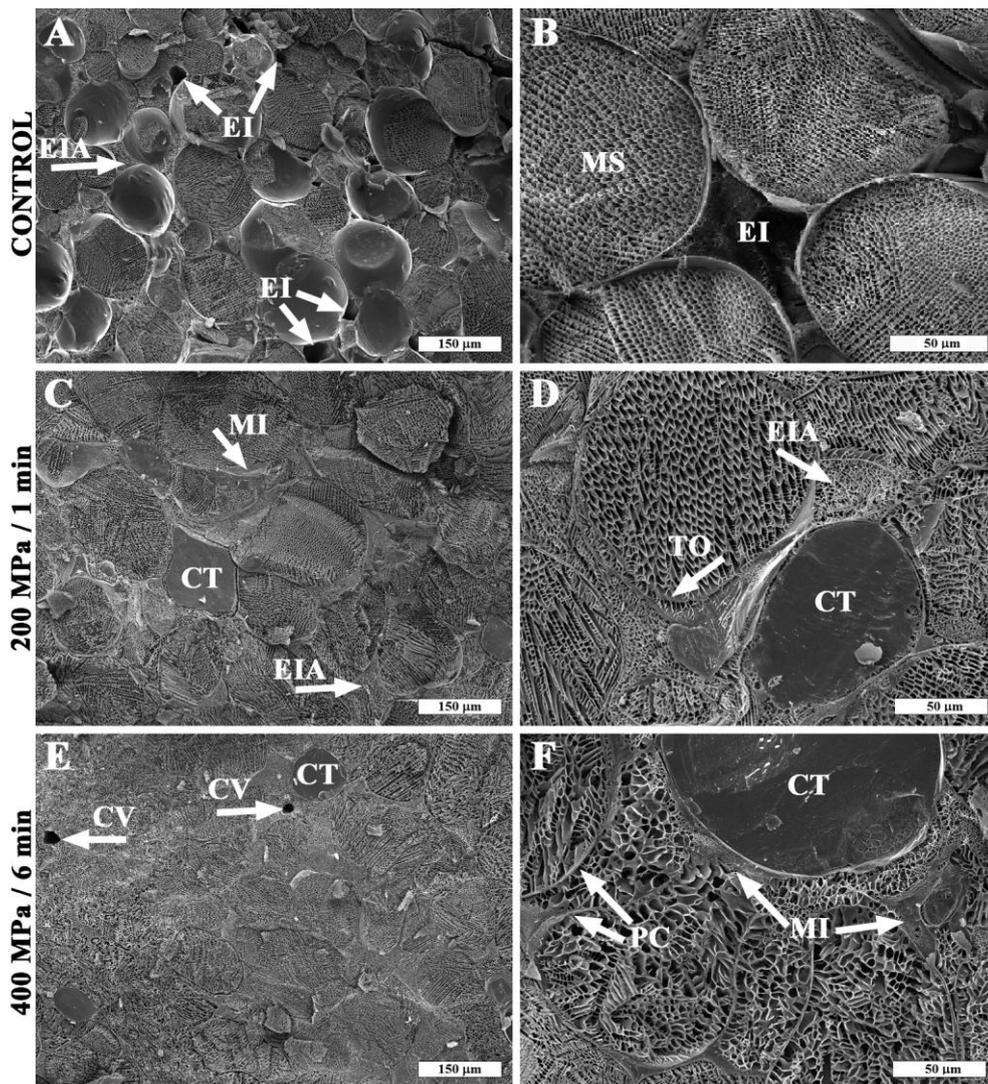


Figura IV.1.1. Cryo-SEM. Caqui ‘Rojo Brillante’ astringente en estado de maduración M1 no tratado, tratado con 200 MPa durante 1 minuto y tratado con 400 MPa durante 6 minutos. EI: espacio intercelular; EIA: espacio intercelular anegado; MS: material soluble; MI: material insoluble; CT: célula tánica; TO: tonoplasto; CV: cavidad; PC: pared celular.

En la Figura IV.1.2 se presentan las imágenes obtenidas por Cryo-SEM del caqui no astringente en estado de maduración M1. Las muestras control (Figura IV.1.2 A y B) presentan células tánicas como consecuencia del tratamiento de desastringencia, que produce la polimerización y precipitación de taninos en el interior celular. Las células tánicas se encuentran formando agrupaciones (Figura IV.1.2 B), tal y como se ha descrito en estudios anteriores (Salvador et al., 2007). Las muestras control no astringentes tienen una mayor proporción de espacios intercelulares llenos de líquido (Figura IV.1.2 A y D) que las astringentes (Figura IV.1.1 A y B). Tras aplicar al caqui no astringente en estado de maduración M1 200 MPa durante 1 minuto (Figura IV.1.2 C y D), las paredes celulares aparecen más deterioradas que en las correspondientes muestras astringentes (Figura IV.1.1 C y D). En algunos espacios intercelulares se observa la presencia de material insoluble (Figura IV.1.2 D), que podría identificarse con restos de taninos solubles que no habrían sido insolubilizados por el CO₂ pero sí por efecto de la presión.

En las muestras de caqui no astringente en estado de maduración M1 tratadas con 400 MPa durante 6 minutos, la degradación es más acusada (Figura IV.1.2 E y F). Las células están más separadas entre sí y se observa una concentración de solutos superior, es decir, un artefacto eutéctico más denso, en los espacios intercelulares que en el interior celular (Figura IV.1.2 F).

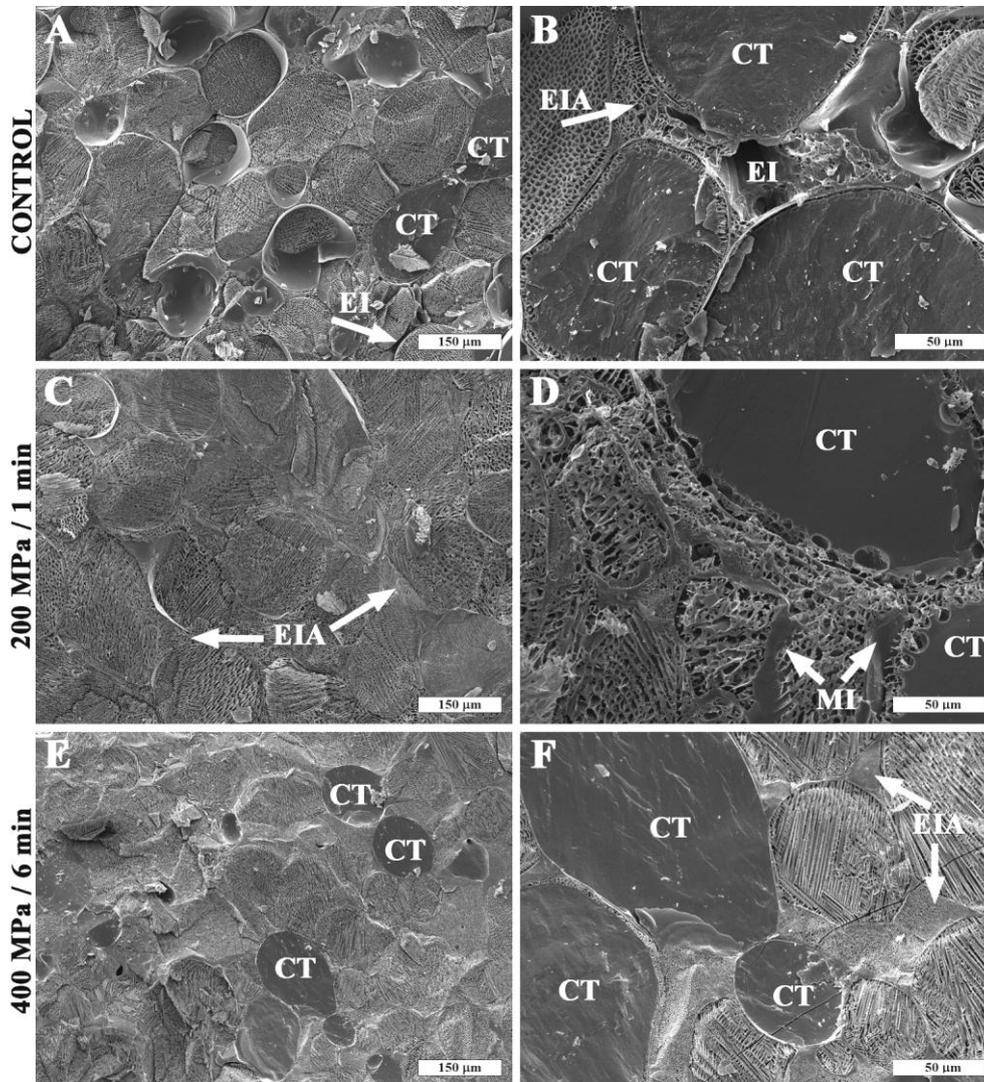


Figura IV.1.2. Cryo-SEM. Caqui 'Rojo Brillante' no astringente en estado de maduración M1 no tratado, tratado con 200 MPa durante 1 minuto y tratado con 400 MPa durante 6 minutos. EI: espacio intercelular; CT: célula tánica; EIA: espacio intercelular anegado; MI: material insoluble.

El tejido parenquimático de las muestras control de caqui 'Rojo Brillante' en estado de maduración M2 (Figura IV.1.3 A y B) presenta, al comparar con el estado M1, una mayor modificación estructural como consecuencia del propio proceso de maduración. Así, la membrana plasmática está degradada y separada de la pared celular en muchas células (Figura IV.1.3 A) y hay una pérdida generalizada de la cohesión intercelular, siendo este hecho más acusado en las muestras no astringentes (Figura IV.1.3 B) que en las astringentes. La mayor parte de los espacios intercelulares están

ocupados por solutos, tanto en muestras astringentes como en no astringentes. Las muestras no astringentes siguen presentando las células tánicas características del tratamiento con CO₂ (Figura IV.1.3 B).

La aplicación de presión al caqui astringente y no astringente en estado de maduración M2 produce cambios equivalentes a los ya descritos en las muestras en estado de maduración M1 (Figura IV.1.3 C, D, E y F). Al aplicar 200 MPa durante 1 minuto a las muestras astringentes en estado de maduración M2 (Figura IV.1.3 C) se favorece, al igual que en el estado de maduración M1 (Figura IV.1.1 C), la precipitación de los taninos solubles. Además, la deformación celular es más pronunciada en el estado de maduración M2 que en el estado de maduración M1, sobre todo en las muestras no astringentes (Figura IV.1.3 D).

Al aplicar al caqui astringente y no astringente en estado de maduración M2 400 MPa durante 6 minutos, la degradación del tejido es todavía más acusada y sólo se distinguen las células tánicas. El tejido de las muestras no astringentes presenta una mayor concentración en solutos (mayor densidad del artefacto eutéctico) en comparación con las muestras astringentes (Figura IV.1.3 E y F).

Parece que las APH podrían favorecer la extractabilidad y mejorar la disponibilidad de algunos componentes bioactivos, como la fracción de fibra dietética soluble, al favorecer la disolución de constituyentes de las paredes celulares, y la fracción de taninos, al favorecer la difusión de estos desde el interior celular hacia el apoplasto.

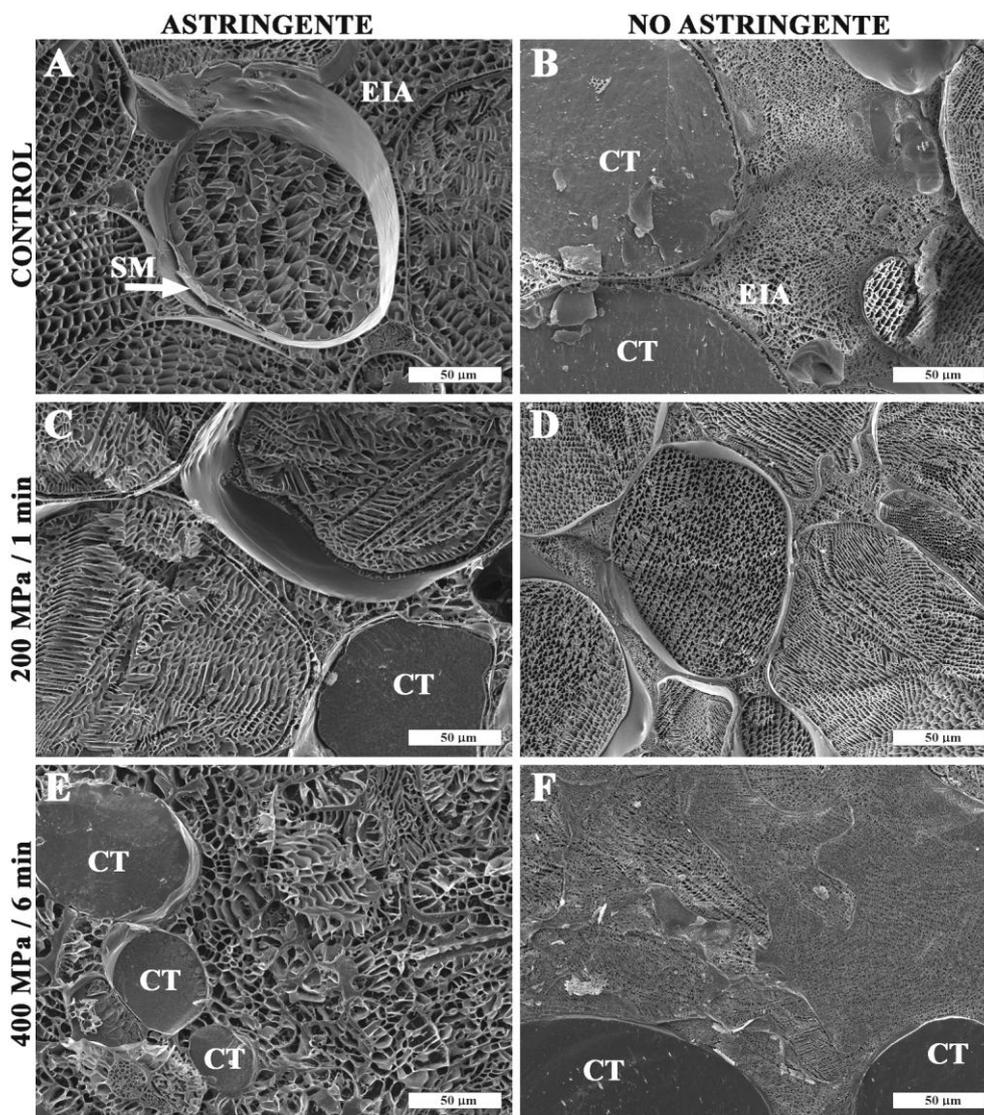


Figura IV.1.3. Cryo-SEM. Caqui 'Rojo Brillante' astringente y no astringente en estado de maduración M2 no tratado, tratado con 200 MPa durante 1 minuto y tratado con 400 MPa durante 6 minutos. EIA: espacio intercelular anegado; SM: separación de membrana; CT: célula tánica.

IV.1.1.2. MICROSCOPIA ÓPTICA

El estudio de la muestra mediante microscopía óptica (LM) a partir de secciones criostato y secciones incluidas en resina permite confirmar y complementar la información obtenida por Cryo-SEM sobre la microestructura del caqui 'Rojo Brillante' tratado con APH.

a) Corte criostato

El corte criostato permite obtener secciones de tejido en un estado muy próximo al natural. La tinción de las secciones con azul de toluidina permite visualizar las paredes y membranas celulares, así como los taninos. La tinción con vainillina-HCl permite localizar de una manera más precisa las sustancias tánicas, al ser un agente de tinción específico para estos compuestos.

En la Figura IV.1.4 se muestran las imágenes criostato obtenidas por LM del caqui astringente en estado de maduración M1. En las muestras control astringentes no tratadas con APH se observan los taninos solubles, teñidos de azul oscuro cuando se utiliza como agente de tinción azul de toluidina (Figura IV.1.4 A) y de rojo cuando se utiliza vainillina-HCl (Figura IV.1.4 B). Estos taninos solubles, situados en el interior de las células tánicas, se dispersan por el tejido durante la obtención de secciones criostato en la preparación de la muestra (Figura IV.1.4 A y B).

Cuando el tratamiento del caqui astringente en estado de maduración M1 con APH se realiza 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 en la localización de los taninos que, debido al tratamiento, aparecen precipitados en el interior de las células tánicas y en los espacios intercelulares (Figura IV.1.4 C). 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 IV.1.4 D).

La aplicación de presiones superiores (400 MPa / 1 min) al caqui astringente en estado de maduración M1 produce mayor modificación en el tejido, ya que se observa una mayor dispersión de los taninos por el tejido parenquimático (Figura IV.1.4 E y F). El tratamiento con APH favorece la difusión de los taninos desde el interior al exterior celular y esto podría mejorar la accesibilidad y extractabilidad de estos compuestos.

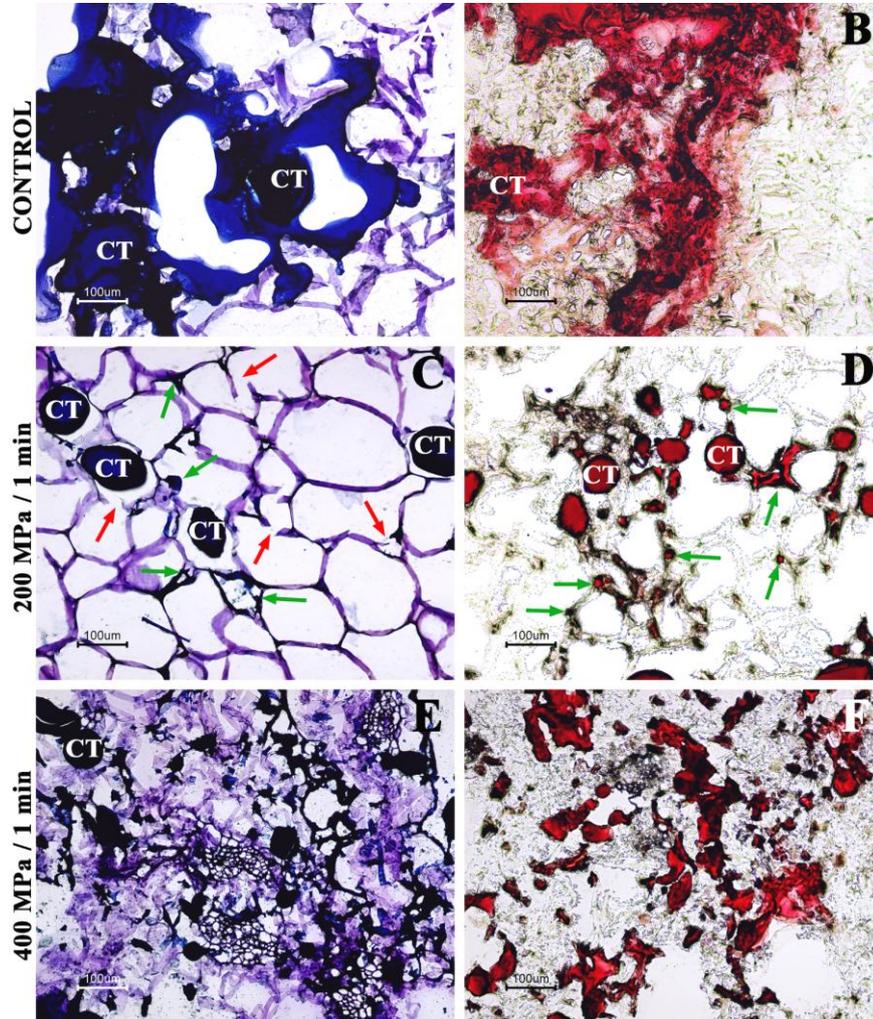


Figura IV.1.4. Microscopía óptica. Caqui ‘Rojo Brillante’ astringente en estado de maduración M1 no tratado y tratado durante 1 minuto con 200 y 400 MPa. Tinción con azul de toluidina (A, C, E) y con vainillina-HCl (B, D, F). CT: célula tánica; Flechas rojas: paredes celulares rotas; Flechas verdes: taninos precipitados en espacios intercelulares.

La Figura IV.1.5 presenta las imágenes criostato obtenidas por LM del caqui no astringente en estado de maduración M1. El tejido no tratado con APH (control) ya presenta los taninos polimerizados en el interior de las células tánicas por efecto del tratamiento previo de desastringencia con CO_2 (Figura IV.1.5 A y B), fenómeno ya descrito en estudios anteriores (Gottreich y Blumenfeld, 1991; Oshida et al., 1996).

Al aplicar al caqui no astringente en estado de maduración M1 200 MPa durante 1 minuto (Figura IV.1.5 C y D), se observa mayor deformación celular y degradación de las paredes celulares que en las muestras astringentes (Figura IV.1.4 C), probablemente

IV. Resultados y Discusión

debido al efecto previo del tratamiento con CO₂. Los taninos ya se encontraban polimerizados en el interior celular antes del tratamiento con APH, por lo que no difunden y no se aprecian taninos precipitados en el apoplasto, tal y como sí ocurre en las muestras astringentes (Figura IV.1.4).

Cuando se trata el caqui no astringente en estado de maduración M1 con 400 MPa durante 1 minuto (Figura IV.1.5 E y F), el tejido está completamente degradado, y los taninos precipitados se observan sueltos entre los restos de paredes celulares.

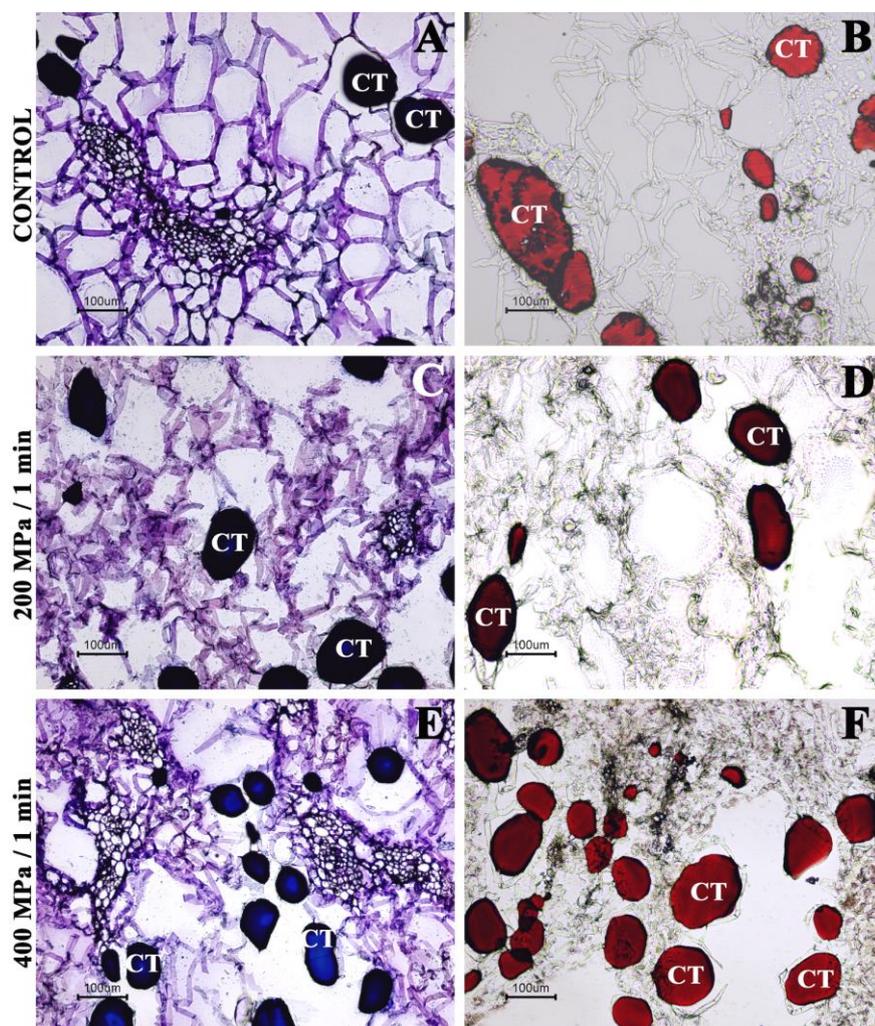


Figura IV.1.5. Microscopía óptica. Caqui 'Rojo Brillante' no astringente en estado de maduración M1 no tratado y tratado durante 1 minuto con 200 y 400 MPa. Tinción con azul de toluidina (A, C, E) y con vainillina-HCl (B, D, F). CT: célula tánica.

Las secciones criostato de las muestras control astringentes en estado de maduración M2 (Figura IV.1.6 A) muestran que el tejido está en general más deteriorado que el de las muestras control en estado de maduración M1 (Figura IV.1.4 A). El tratamiento del caqui en estado de maduración M2 con APH (Figura IV.1.6 B y C) produce las mismas modificaciones que en el estado de maduración M1 pero magnificadas, probablemente porque al efecto de las APH hay que sumarle el efecto que produce el avance del propio proceso de maduración. Al tratar las muestras astringentes en estado de maduración M2 (Figura IV.1.6 B) con 200 MPa durante 1 minuto se observan taninos precipitados fuera de las células tánicas, aunque en menor medida que en el estado de maduración M1 (Figura IV.1.4 C). Esto puede indicar que parte de los taninos ya habían precipitado en el interior de las células como consecuencia del proceso intrínseco de maduración y, por tanto, la dispersión de los taninos solubles se produce en menor grado en las muestras en estado de maduración M1. Un efecto similar se aprecia al comparar las muestras no astringentes tratadas a 400 MPa durante 1 minuto en los estados de maduración M1 y M2 (Figura IV.1.5 E y Figura IV.1.6 C). El tejido en estado de maduración M2 está altamente degradado después de aplicar APH y prácticamente no se distinguen taninos dispersos en los espacios intercelulares.

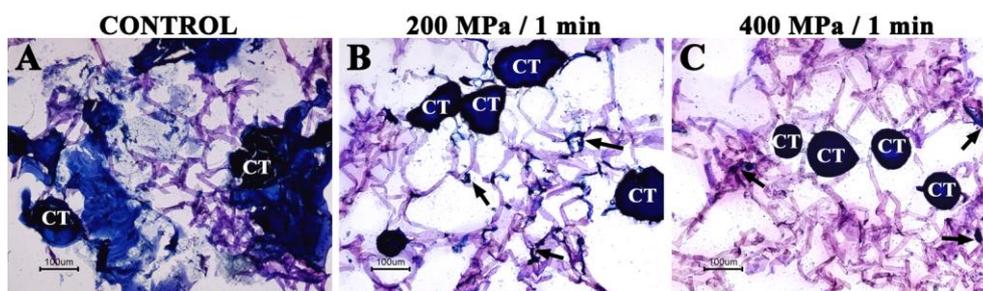


Figura IV.1.6. Microscopía óptica. Caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente en estado de maduración M2 no tratado y tratado durante 1 minuto con 200 y 400 MPa. A y B: caqui astringente, C: caqui no astringente. Tinción con azul de toluidina. CT: célula tánica. Flechas: taninos precipitados en espacios intercelulares.

El tratamiento con APH produce un gran deterioro estructural en aquellos tejidos de caqui que están en un estado avanzado de maduración (M2). El tratamiento de desastringencia del caqui, previo a la comercialización, produce la precipitación y por lo tanto la inmovilización de los taninos en el interior de las células tánicas. La polimerización de taninos debido al tratamiento con CO_2 ha sido descrita por diversos autores (Matsuo y Ito, 1982; Oshida et al., 1996) como una polimerización química en la que se establecen enlaces covalentes, lo que en principio dificultaría su resolubilización.

Con vistas a favorecer la difusión y la extractabilidad de compuestos bioactivos como los taninos, el tejido más adecuado para el tratamiento con APH parece ser el caqui en un estado temprano de maduración (M1) y astringente.

b) Secciones incluidas

La observación de las secciones incluidas en resina mediante LM, permite estudiar con más detalle fenómenos tales como la separación celular o la plasmólisis.

Las imágenes de caqui astringente y no astringente en estado de maduración M1 obtenidas por LM se observan en la Figura IV.1.7. El tejido de las muestras astringentes no tratadas (Figura IV.1.7 A) está constituido por células más o menos redondeadas, turgentes, de paredes uniformemente teñidas e íntegras. Algunos espacios intercelulares aparecen rellenos de solutos, pero no se observa en ellos taninos precipitados. La estructura del caqui control no astringente en estado de maduración M1 (Figura IV.1.7 B) aparece más degradada, por el tratamiento previo de desastringencia. Las células están menos definidas y las paredes celulares menos teñidas. Las células vecinas se separan unas de otras en algunas zonas y se observan los taninos precipitados, teñidos de azul oscuro, en el interior de las células tánicas.

Cuando el caqui astringente en estado de maduración M1 se trata con 200 MPa durante 1 min (Figura IV.1.7 C), las paredes y membranas celulares aparecen más tenuemente teñidas porque están más degradadas. Las células vecinas se observan más separadas unas de otras por la disolución de los cementos celulósicos y de la lámina media, con lo que aumentan los espacios intercelulares. La degradación de las paredes y membranas celulares favorece la difusión del contenido celular hacia el apoplasto y aparecen taninos precipitados en los espacios intercelulares (Figura IV.1.7 C). En el caso de las muestras no astringentes en estado de maduración M1 tratadas con 200 MPa durante 1 minuto (Figura IV.1.7 D), los taninos permanecen dentro de las células tánicas y las células en general aparecen más deformadas y degradadas.

Cuando el caqui astringente y no astringente en estado de maduración M1 (Figura IV.1.7 E y F) se somete a un tiempo de tratamiento mayor (200 MPa durante 6 min) se observa una marcada deformación celular y una compresión del tejido, tanto en las muestras astringentes como en las no astringentes (Figura IV.1.7 E y F). Los taninos aparecen uniformemente distribuidos en los espacios intercelulares de las muestras astringentes (Figura IV.1.7 E) pero no se aprecia difusión de ellos en las muestras no astringentes (Figura IV.1.7 F).

Cuando se aplica el tratamiento de APH más intenso (400 MPa durante 6 minutos) al caqui astringente en estado de maduración M1 (Figura IV.1.7 G), se puede observar un mayor grado de degradación celular, el tonoplasto aparece retraído hacia el centro de la célula y se hace más evidente la pérdida de turgencia celular y de adhesión entre células vecinas. También se observan taninos precipitados dentro y fuera de las células. A estas elevadas presiones, parece que se produce un mayor grado de difusión del contenido celular, ya que hay mayor proporción de sustancias tánicas dispersas por el apoplasto que compactas en el interior de las células (Figura IV.1.7 G). Los mismos efectos de degradación celular, aunque más acentuados, se observan en las muestras no astringentes en estado de maduración M1 (Figura IV.1.7 H) y en el estado de maduración M2 (Figura IV.1.8); sin embargo los taninos permanecen únicamente en el interior de las células tánicas, no hay evidencia de difusión por el apoplasto.

Todo esto parece confirmar que el tratamiento con APH favorece la difusión y la extractabilidad de las sustancias tánicas en el caqui astringente en un estado temprano de maduración (M1).

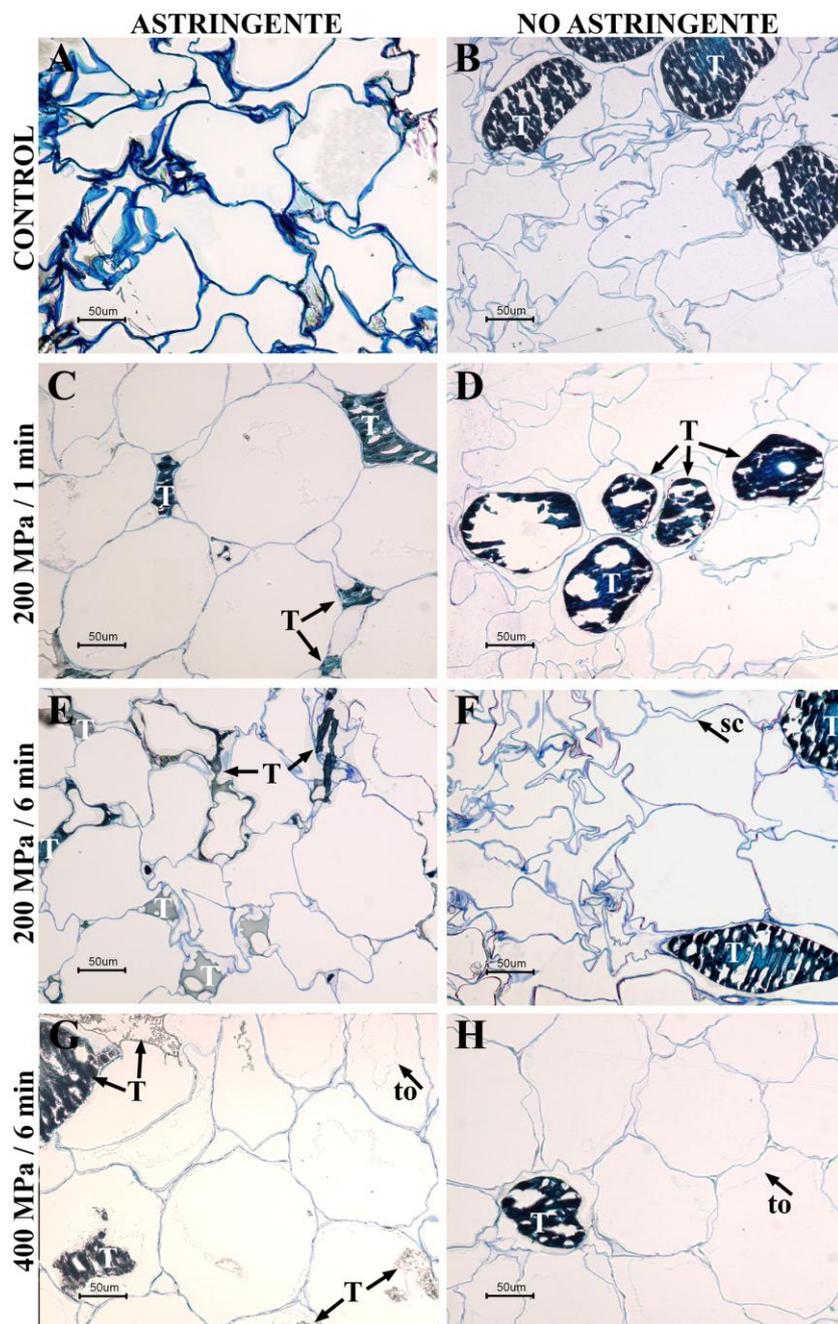


Figura IV.1.7. Microscopía óptica. Caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente en estado de maduración M1. Control y tratado con altas presiones. Tinción con azul de toluidina. T: taninos; sc: separación celular; to: tonoplasto.

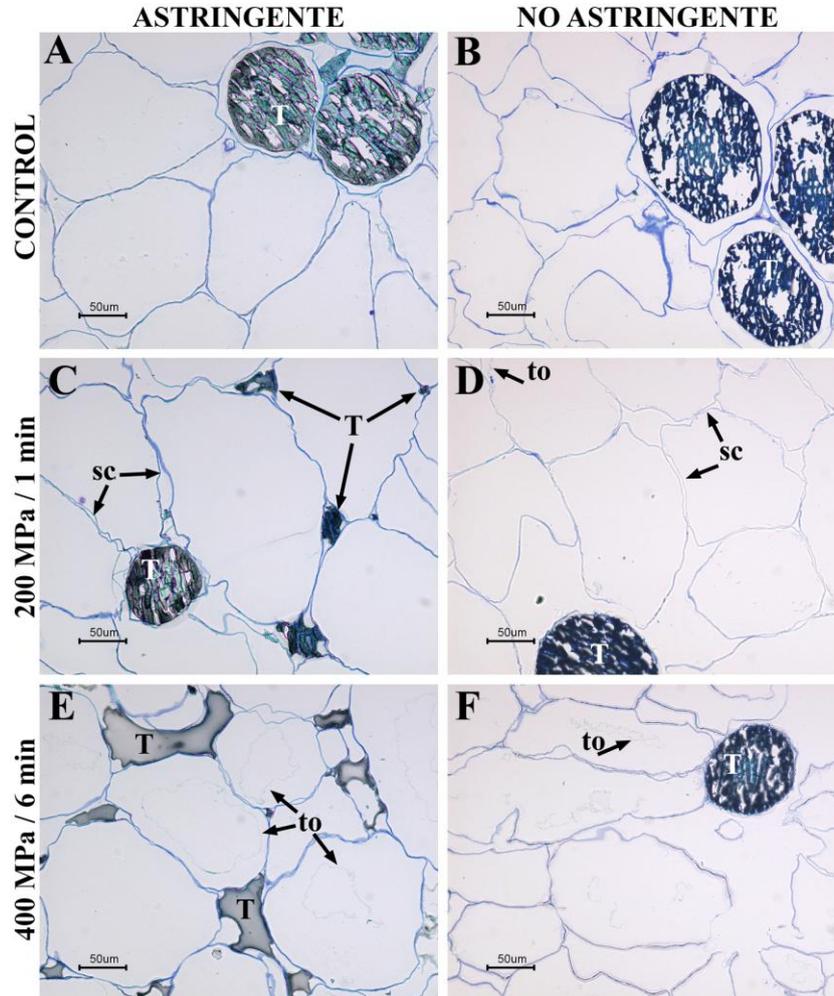


Figura IV.1.8. Microscopía óptica. Caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente en estado de maduración M2. Control y tratado con altas presiones. Tinción con azul de toluidina. T: taninos; sc: separación celular; to: tonoplasto.

IV.1.1.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

El empleo de la microscopía electrónica de transmisión (TEM) permite estudiar con detalle los fenómenos que tienen lugar a nivel ultraestructural en la pared celular, en la membrana celular (plasmalema) y en el tonoplasto.

Tal y como se observa en la Figura IV.1.9 A, en el caqui control astringente en estado de maduración M1, tanto la membrana celular como el tonoplasto están muy próximos a la pared celular. Sin embargo, en el caqui control no astringente en estado

de maduración M1 (Figura IV.1.9 B) puede observarse que el tonoplasto está separado de la pared celular en algunas zonas.

Al tratar el caqui en estado de maduración M1 con 200 MPa durante 1 minuto, tanto en el caqui astringente (Figura IV.1.9 C) como en el no astringente (Figura IV.1.9 D), se produce la degradación de la lámina media, de los cementos celulósicos y como consecuencia la separación de las fibrillas de celulosa que tan íntimamente unidas están en el caqui control (Figura IV.1.9 A). Además tanto en las muestras astringentes como no astringentes, el plasmalema se separa de la pared celular en algunas zonas y se retrae hacia el centro de la célula.

Al someter al caqui astringente y no astringente en estado de maduración M1 a la misma presión durante 6 minutos (Figura IV.1.9 E y F), en algunas zonas parece que el lumen citoplasmático atraviesa la membrana celular y penetra en el interior de la pared celular. Esta invasión del apoplasto, probablemente es debida a que el tratamiento prolongado produce una mayor degradación de las paredes y membranas celulares (Figura IV.1.9 E). La degradación de la pared celular es más notable en las muestras no astringentes (Figura IV.1.9 F).

Al tratar el caqui astringente y no astringente en estado de maduración M1 con 400 MPa durante 6 minutos (Figura IV.1.9 G y H) se aprecia una mayor degradación estructural. Las paredes celulares de las muestras astringentes (Figura IV.1.9 G) aparecen teñidas de forma muy tenue, indicando disolución del material que constituye las paredes. El plasmalema se encuentra roto y completamente separado de la pared celular. Las paredes celulares del caqui no astringente (Figura IV.1.9 H) se muestran más afectadas por este tratamiento, ya que aparecen más deformadas, tenuemente teñidas y de espesor muy irregular. Las paredes están tan degradadas que por efecto de la presión presentan concentrados en su interior, probablemente por invasión de componentes celulares.

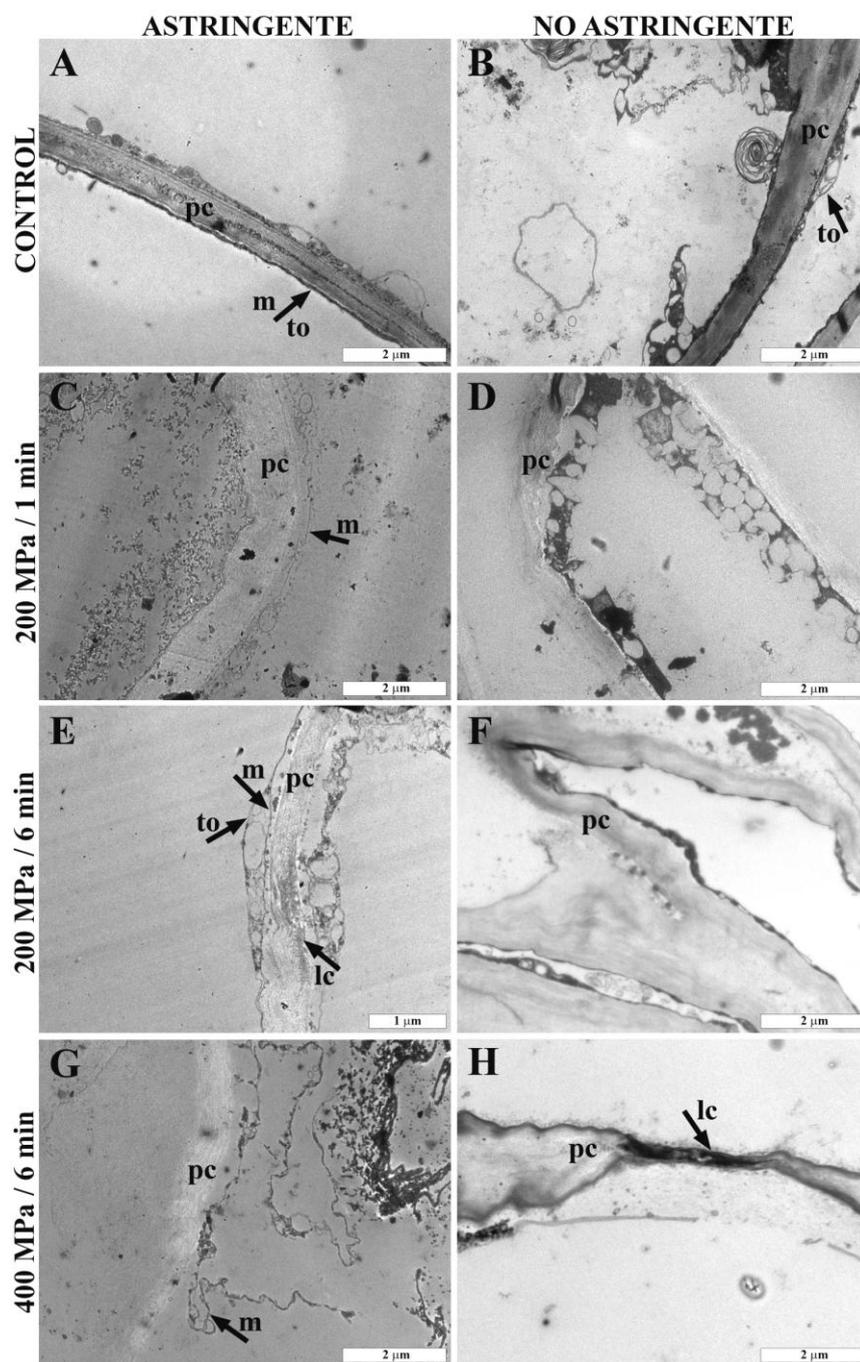


Figura IV.1.9. Microscopía electrónica de transmisión. Caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente en estado de maduración M1. Control y tratado con altas presiones. pc: pared celular; m: membrana celular (plasmalema); to: tonoplasto; lc: lumen citoplasmático.

Las imágenes del caqui astringente y no astringente en estado de maduración M2 se presentan en la Figura IV.1.10. Las paredes celulares de las muestras de caqui control astringente y no astringente (Figura IV.1.10 A y B) están más tenuemente teñidas y son más anchas que las paredes celulares de las muestras en estado de maduración M1, pudiéndose observar ya separación entre paredes celulares adyacentes y separación del plasmalema hacia el interior celular.

Al tratar el caqui astringente y no astringente en estado de maduración M2 con 200 MPa durante 1 minuto (Figura IV.1.10 C y D) las paredes celulares se muestran todavía más tenuemente teñidas y el plasmalema aparece más separado de las mismas. Al aplicar el tratamiento más intenso (400 MPa durante 6 minutos), el material de las paredes está altamente disuelto y el plasmalema muy retraído hacia el interior celular (Figura IV.1.10 E y F).

El efecto de las APH sobre la ultraestructura del caqui es mayor cuanto más intensas son las condiciones del tratamiento en cuanto a presión.

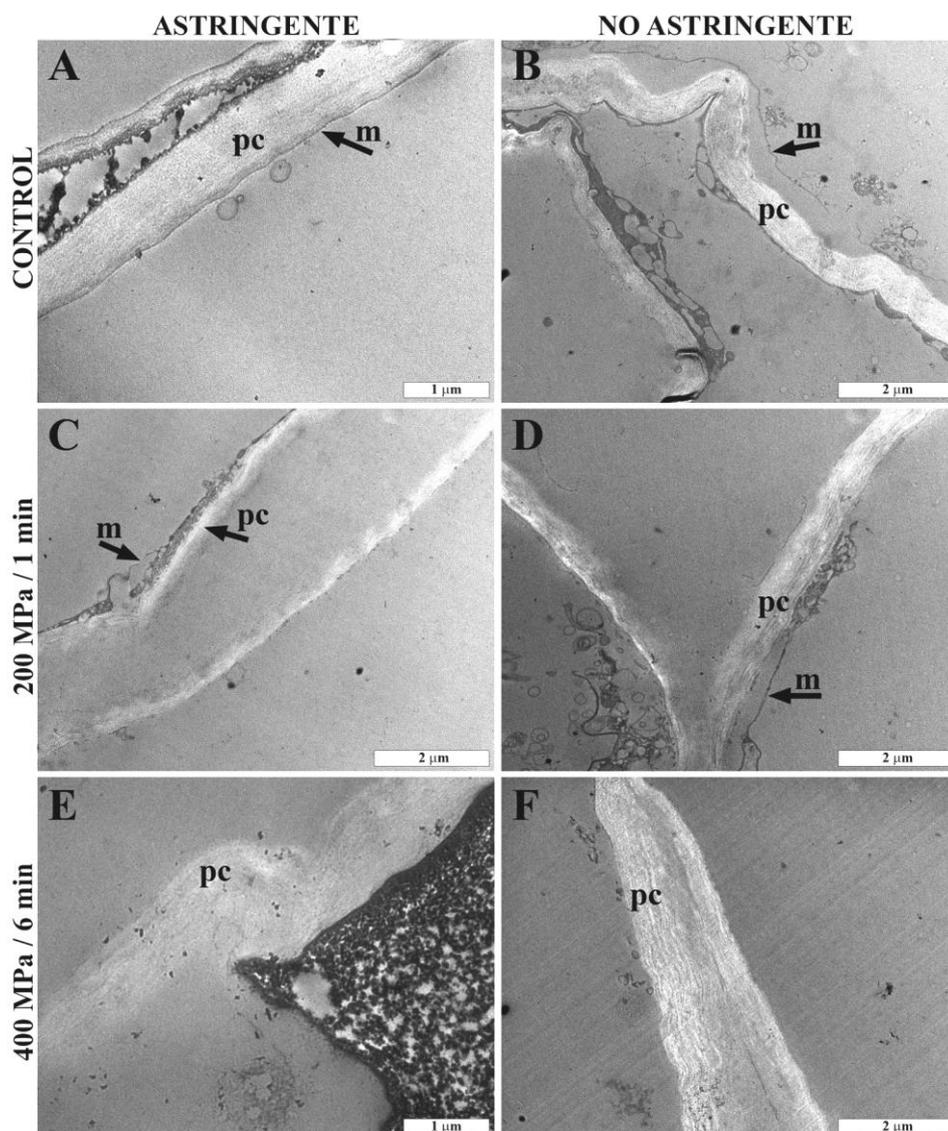


Figura IV.1.10. Microscopía electrónica de transmisión. Caqui 'Rojo Brillante' astringente y no astringente en estado de maduración M2. Control y tratado con altas presiones. pc: pared celular; m: membrana celular (plasmalema);.

IV.1.1.4. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL DE BARRIDO

La observación de secciones criostato de caqui en el microscopio láser confocal de barrido (CLSM) permite distinguir una serie de cuerpos autofluorescentes en las muestras de caqui que tal y como se ha comentado en el Apartado III.3.4 de Material y Métodos, se atribuyen a compuestos carotenoides.

En la Figura IV.1.11 se presentan las imágenes obtenidas por CLSM de caqui astringente en estado de maduración M1. En la Figura IV.1.11 A se observa que las paredes celulares del tejido de caqui control son autofluorescentes, pero se distinguen de manera muy tenue. Distribuidos por el tejido se aprecian, con un verde más intenso, cuerpos de forma más o menos redondeada también autofluorescentes, que se identifican con sustancias carotenoides. Para poder distinguir de forma más clara las paredes celulares de las sustancias carotenoides se emplea calcofluor, un agente de tinción específico para paredes celulares. De esta manera se comprueba que las sustancias carotenoides (en verde) se encuentran asociadas a las paredes, de color azul (Figura IV.1.11 B). Si se observan por microscopía óptica secciones a mano alzada sin teñir de estas muestras, se aprecian los carotenoides con su color amarillo-anaranjado característico distribuidos homogéneamente por todo el tejido celular (Figura IV.1.11 C y D). Las sustancias carotenoides se pueden observar agrupadas de dos formas distintas. Por una parte se encuentran en el interior de los cromoplastos, adoptando una estructura globular de aproximadamente 10 μm de diámetro (Figura IV.1.11 C). Por otra parte, aparecen formando agrupaciones cristalinas tanto en el interior como en la pared celular (Figura IV.1.11 D). Estas agrupaciones también se han detectado en tejido de mango y zanahoria (Vásquez-Caicedo et al. 2006). Lindner (1974) también indicó la presencia de gránulos o cristales de carotenoides en las células parenquimáticas del caqui.

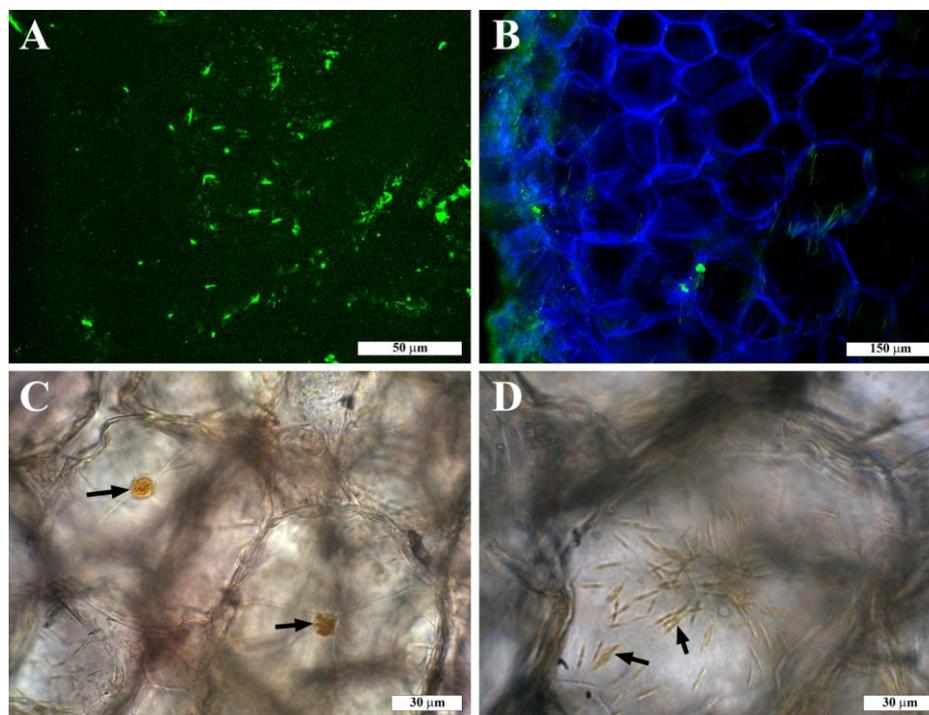


Figura IV.1.11. Microscopía láser confocal de barrido y microscopía óptica. Observación de carotenoides en tejido parenquimático de caqui astringente en estado de maduración M1. Flechas: agrupación de carotenoides.

En la Figura IV.1.12 se presentan las imágenes obtenidas por CLSM del caqui astringente en estado de maduración M1 sometido a APH. La autofluorescencia típica de las paredes celulares se pierde tras el tratamiento con APH por el efecto de la degradación y solubilización de sus componentes (Figura IV.1.12 A), como ya se ha observado por Cryo-SEM, microscopía óptica y TEM. La emisión autofluorescente de las paredes celulares disminuye al aumentar la presión aplicada (Figura IV.1.12 B). Esto 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 IV.1.12 A y B). Al teñir con calcofluor y centrarnos en la emisión autofluorescente de los carotenoides se observan diferencias en la misma dependiendo de la presión aplicada (Figura IV.1.12 C y D). Al tratar con 200 MPa, los carotenoides parecen seguir asociados a las paredes celulares en los cromoplastos (Figura IV.1.12 C y E). A 400 MPa se favorece la difusión de las sustancias carotenoides desde los cromoplastos, cuya membrana debe estar más dañada por el tratamiento con APH, hacia el exterior celular (Figura IV.1.12 D). Además los carotenoides forman estructuras de mayor tamaño y de un color más pardo (Figura IV.1.12 E y F).

Los tratamientos de APH tienen un efecto análogo sobre las sustancias carotenoides en las muestras no astringentes y en las muestras en estado de maduración M2 (imágenes no mostradas).

El tratamiento con APH en condiciones intensas en cuanto a presión y tiempo (400 MPa y 3 min) parece favorecer la difusión y la extractabilidad de los carotenoides en el caqui.

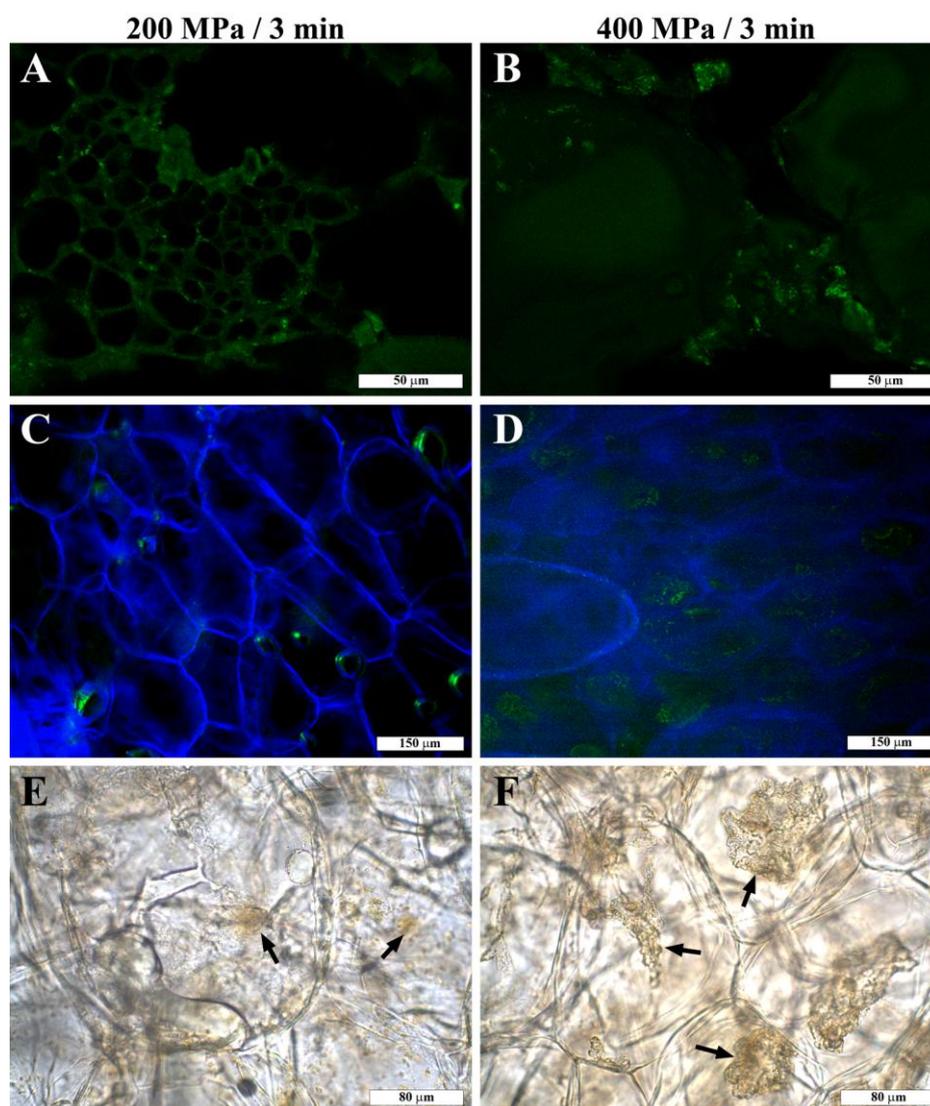


Figura IV.1.12. Microscopía láser confocal de barrido y microscopía óptica Observación de carotenoides en tejido parenquimático de caqui astringente en estado de maduración M1 tratado durante 3 minutos con 200 y 400 MPa. Flechas: agrupación de carotenoides.

IV.1.2. ESTUDIO FISICOQUÍMICO

IV.1.2.1. CONTENIDO EN TANINOS SOLUBLES

En la Figura IV.1.13 se presentan los valores de contenido en taninos solubles (TS) obtenidos para el caqui astringente y no astringente tratado por APH en ambos estados de maduración. Las muestras control astringentes en estado de maduración M1 (Figura IV.1.13 A) muestran valores muy elevados de TS en comparación con las no astringentes, ya que estas últimas han sido sometidas a un tratamiento con CO₂ para precipitar los taninos y eliminar la astringencia. Esta diferencia, aunque aún elevada, se reduce cuando la fruta está en estado de maduración M2 (Figura VI.1.13 B), ya que la muestra astringente contiene una menor cantidad de TS debido al proceso intrínseco de maduración. Al procesar con APH se produce un descenso significativo ($P < 0.05$) del contenido en TS en las muestras astringentes para todos los tratamientos. De esta manera, el contenido en TS en las muestras astringentes en estado de maduración M1 disminuye a niveles similares a los de las muestras no astringentes cuando se procesa con 200 MPa durante 1 y 3 minutos y con 400 MPa durante 1 minuto de tratamiento. Al aumentar la presión hasta 400 MPa y la duración del tratamiento a 3 y 6 minutos aparecen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el caqui astringente y el no astringente, presentando los mayores valores de contenido en TS el caqui astringente. Estos valores son mayores conforme el tiempo de tratamiento aumenta. Esto podría deberse a que cuanto más tiempo se mantiene una presión tan elevada (400 MPa), más se favorece la dispersión de los taninos por el tejido, mejorando su extractabilidad y dificultando que se asocien entre sí y precipiten. El mismo fenómeno tiene lugar en el estado de maduración M2 (Figura IV.1.13 B), aunque hay diferencias significativas en el contenido en TS entre el caqui astringente y no astringente para todos los tratamientos con APH. El caqui control astringente en estado de maduración M2 presenta menor contenido en TS que en estado de maduración M1 porque un porcentaje de los taninos ya están precipitados antes del procesado con APH debido al proceso de maduración, tal y como se ha constatado en el estudio microestructural (Figuras IV.1.3, 6 y 8).

En las muestras no astringentes no hay tanta diferencia en el contenido en TS entre la muestra control y las tratadas con APH. En estado de maduración M1 (Figura IV.1.13 A), el contenido en TS disminuye significativamente ($P < 0.05$) al aplicar 400 MPa. En estado de maduración M2 (Figura IV.1.13 B) el descenso más significativo ($P < 0.05$) en los valores del contenido en TS se produce al aplicar baja presión (200 MPa) durante periodos cortos de tiempo (1 y 3 minutos). Esto indica que las condiciones de tratamiento de APH (presión y tiempo) afectan al contenido en taninos solubles.

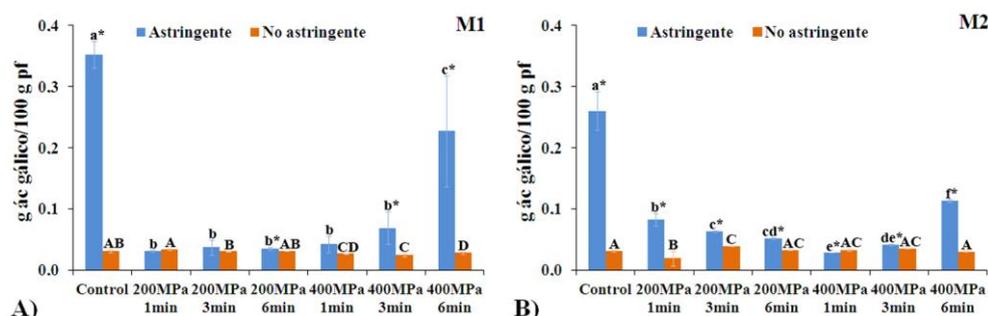


Figura IV.1.13. Contenido en taninos solubles totales de caqui 'Rojo Brillante' astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 (A) y M2 (B). Promedio de cuatro determinaciones con su desviación estándar. Los valores de un mismo tipo de caqui sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$). El asterisco indica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la muestra astringente y la no astringente.

A fin de saber qué factores o qué interacciones entre dichos factores son estadísticamente significativos en el valor del contenido en TS, se realiza un diseño multifactorial categórico con cuatro factores (astringencia, estado de maduración, presión aplicada y duración del tratamiento) y se aplica un análisis de la varianza de los datos.

El análisis estadístico para el contenido en TS permite concluir que tanto los efectos simples de los factores considerados como cuatro de las interacciones son significativas ($P < 0.05$) 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. De esta manera, existe interacción significativa ($P < 0.05$) entre el tipo de caqui (astringente o no astringente) y la presión aplicada (200 MPa o 400 MPa), ya que al aumentar la presión aumenta el contenido en TS en los caquis astringentes pero la presión no afecta al contenido en TS en las muestras no astringentes (Figura IV.1.14 A).

La interacción entre tipo de caqui y tiempo de tratamiento también resulta significativa ($P < 0.05$), ya que en el caqui astringente se obtiene, en general, mayor contenido en TS al aumentar el tiempo de tratamiento pero en las muestras no astringentes no varía (Figura IV.1.14 B).

El contenido en TS según el estado de maduración depende de la presión aplicada, ya que en estado de maduración M1 un aumento de la presión aplicada hace aumentar considerablemente el contenido en TS pero en el estado de maduración M2 este efecto no es significativo (Figura IV.1.14 C).

Por último, el efecto del tiempo de tratamiento en el contenido en TS depende de la presión aplicada. A 200 MPa un aumento del tiempo de tratamiento no es significativo ($P < 0.05$), mientras que a 400 MPa hace aumentar el contenido en TS (Figura IV.1.14 D).

IV. Resultados y Discusión

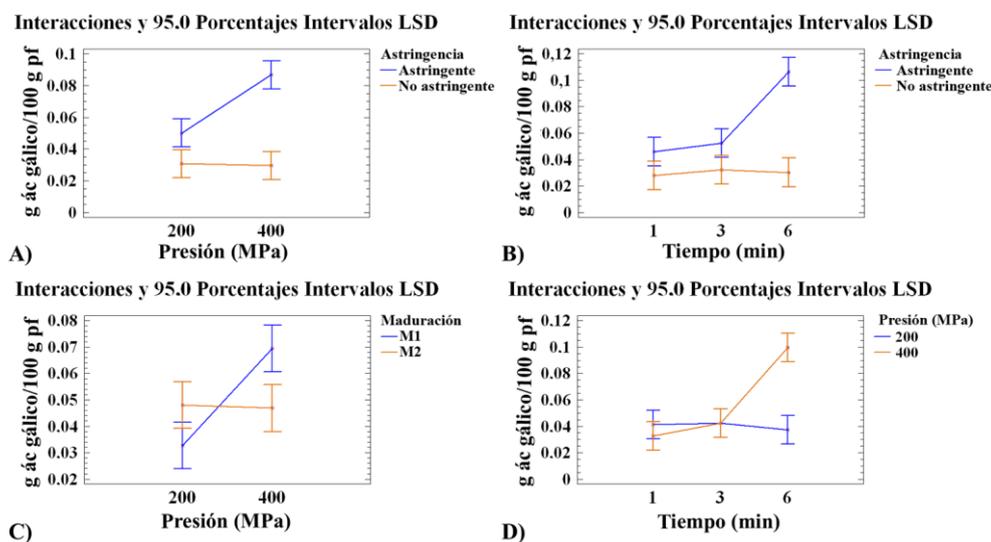


Figura IV.1.14. Gráficos de interacción significativa para la variable respuesta contenido en taninos solubles considerando intervalos LSD. A) Astringencia y presión aplicada. B) Astringencia y duración del tratamiento. C) Estado de maduración y presión aplicada. D) Presión aplicada y duración del tratamiento.

IV.1.2.2. CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES Y PH

En la Figura IV.1.15 se presentan las medias de los valores de sólidos solubles totales (SST) obtenidos para el caqui 'Rojo Brillante' astringente y no astringente tratado con APH en ambos estados de maduración. En los frutos control, tanto para el estado de maduración M1 (Figura IV.1.15 A) como M2 (Figura IV.1.15 B), el contenido en SST es, aproximadamente de 17 °Brix en las muestras astringentes y de 15-16 °Brix en las no astringentes. En ambos estados de maduración se observa un descenso significativo ($P < 0.05$) en el contenido de SST tras el tratamiento con CO_2 , lo que se relaciona con la insolubilización de los taninos y la consecuente pérdida de astringencia en el fruto (Arnal y Del Río, 2003; Salvador et al., 2007; Besada et al., 2008; Del Bubba et al., 2009).

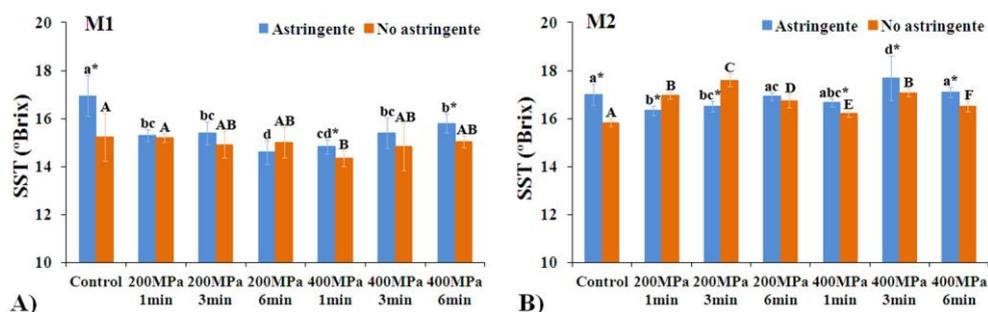


Figura IV.1.15. Contenido en sólidos solubles totales (SST) de caqui 'Rojo Brillante' astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 (A) y M2 (B). Promedio de seis determinaciones con su desviación estándar. Los valores de un mismo tipo de caqui sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$). El asterisco indica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la muestra astringente y la no astringente.

La aplicación de APH en frutos en estado de maduración M1 provoca un descenso significativo ($P < 0.05$) de SST en las muestras astringentes hasta alcanzar valores similares a los de las muestras control no astringentes, excepto cuando el tratamiento es a 400 MPa durante 1 y 6 minutos. Esto podría atribuirse al efecto de las altas presiones (200 o 400 MPa) sobre la precipitación de los taninos solubles, tal y como se ha observado en el estudio microestructural y en el análisis de taninos solubles (Figuras IV.1.1 y 13). Cuando el tratamiento de APH es a elevadas presiones y tiempos largos (400 MPa, 6 minutos), el contenido en SST no disminuye tanto con respecto al control. Probablemente como ya se ha comentado en el Apartado IV.1.2.1, bajo estas condiciones se produce una mayor dispersión de los taninos, lo que dificulta su interacción y precipitación. Las muestras no astringentes no experimentaron variación en el contenido en SST, a excepción de la muestra tratada con 400 MPa durante 1 minuto. Así, en general, 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 CO_2 .

En frutos en estado de maduración M2 (Figura IV.1.15 B), 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 (Apartado IV.1.1), 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 estadístico permite comprobar que tres de las interacciones entre los factores afectan significativamente ($P < 0.05$) a la variable respuesta contenido en SST.

En primer lugar, la presión afecta al contenido en SST de manera distinta según el caqui sea astringente o no astringente. Al aumentar la presión, el contenido en SST disminuye en las muestras no astringentes, mientras que aumenta significativamente en las astringentes (Figura IV.1.16 A). Además, el contenido en SST también varía según

IV. Resultados y Discusión

la presión aplicada en función del estado de maduración del caqui, ya que el contenido en SST no varía al aumentar la presión en el estado de maduración M1 pero aumenta significativamente ($P < 0.05$) en el estado de maduración M2 (Figura IV.1.16 B).

La influencia de la presión aplicada depende de la duración del tratamiento (Figura IV.1.16 C). 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 mayor difusión de solutos a altas presiones.

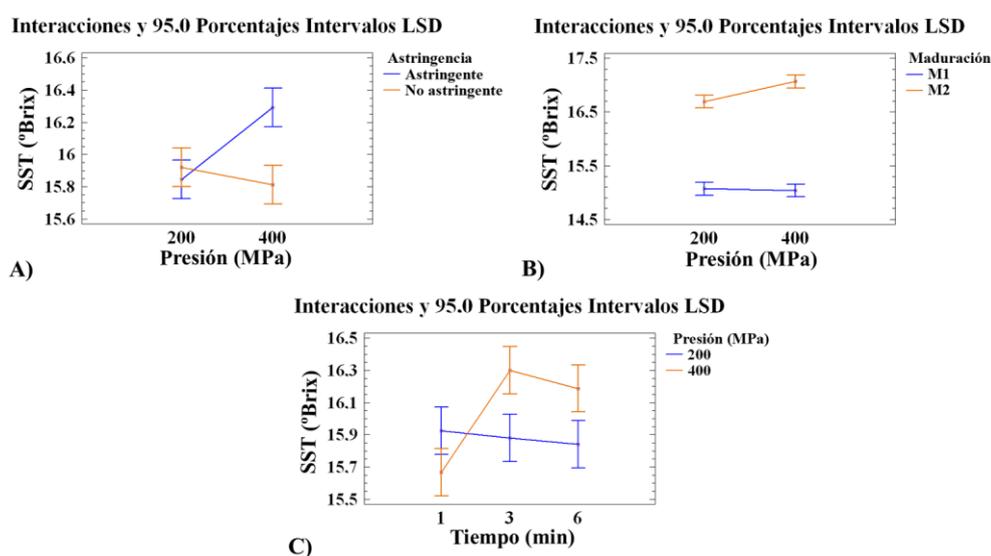


Figura IV.1.16. Gráficos de interacción significativa para la variable respuesta contenido en sólidos solubles totales considerando intervalos LSD. A) Astringencia y presión aplicada. B) Estado de maduración y presión aplicada. C) Presión aplicada y duración del tratamiento.

Los valores de pH del caqui astringente y no astringente en los dos estados de maduración se muestran en la Figura IV.1.17. Las muestras control astringentes en estado de maduración M1 presentan menor pH que las no astringentes (Figura IV.1.17 A). Esto podría deberse a la insolubilización de taninos, de carácter ácido, durante el tratamiento de desastringencia, tal y como ha sido indicado por Salvador et al. (2007) en un estudio sobre los cambios fisiológicos y estructurales del caqui 'Rojo Brillante' durante la maduración y el tratamiento de desastringencia. Las diferencias entre muestras astringentes y no astringentes desaparecen tras los tratamientos de APH. El pH aumenta tanto en muestras astringentes como no astringentes cuando se aplica 200 MPa. Este incremento podría deberse a la insolubilización de los taninos tras el tratamiento de APH ya observado en el estudio microestructural (Apartado IV.1.1). En el caso de las muestras no astringentes, el aumento de pH podría deberse a la insolubilización de taninos solubles aún presentes en el fruto, ya que no todos polimerizan tras el tratamiento de desastringencia. La degradación del tejido podría

explicar que el pH disminuya tanto en muestras astringentes como no astringentes cuando se aplican presiones mayores (400 MPa). Cuando se aplican elevadas presiones (400 MPa), el pH es similar o menor al de las muestras control, lo que podría atribuirse a una mejor difusión y extractabilidad de compuestos ácidos en un tejido más degradado.

Las muestras en estado de maduración M2 siguen, en general, la misma tendencia que las del estado de maduración M1, de manera que al aumentar la presión aplicada, disminuye el pH (Figura IV.1.17 B). No obstante, en este caso no hay diferencias significativas entre los caquis control astringente y no astringente, probablemente debido a que en el caqui astringente hay un porcentaje de taninos precipitados a causa del proceso de maduración.

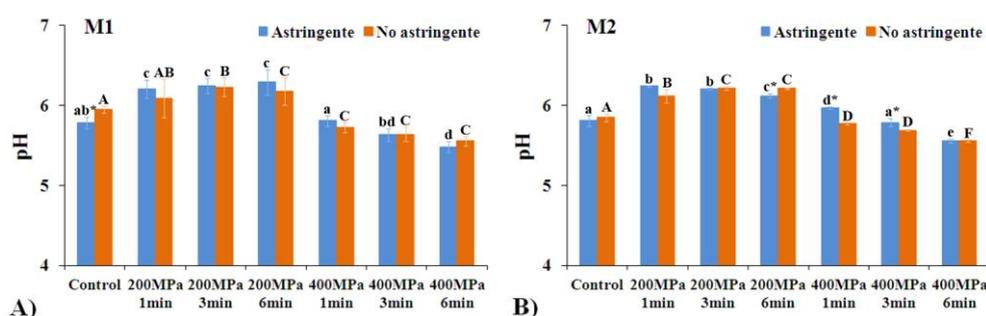


Figura IV.1.17. pH de caqui 'Rojo Brillante' astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 (A) y M2 (B). Promedio de seis determinaciones con su desviación estándar. Los valores de un mismo tipo de caqui sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$). El asterisco indica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la muestra astringente y la no astringente.

El análisis estadístico indica que existe interacción significativa ($P < 0.05$) entre el estado de maduración y la presión aplicada, ya que al tratar con 200 MPa no hay diferencias significativas de pH ($P > 0.05$) entre ambos estados de maduración pero sí que hay diferencias significativas ($P < 0.05$) al tratar con 400 MPa (Figura IV.1.18 A).

También hay interacción entre la astringencia y la duración del tratamiento, ya que al tratar durante un minuto el caqui astringente tiene un pH significativamente más elevado ($P < 0.05$) que el no astringente pero las diferencias desaparecen al prolongar la duración del tratamiento (Figura IV.1.18 B).

Por último, la influencia de la duración del tratamiento en el pH también depende de la presión aplicada, ya que al tratar con 200 MPa el pH no varía significativamente ($P < 0.05$) independientemente del tiempo de tratamiento pero al tratar con 400 MPa el pH va disminuyendo significativamente ($P < 0.05$) al ir aumentando la duración del tratamiento (Figura IV.1.18 C).

IV. Resultados y Discusión

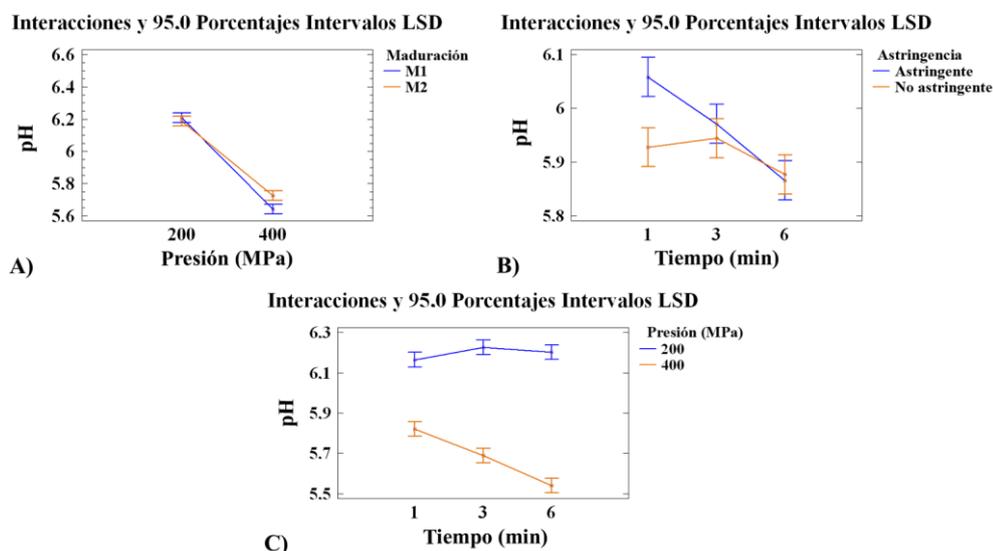


Figura IV.1.18. Gráficos de interacción significativa para la variable respuesta pH considerando intervalos LSD. A) Estado de maduración y presión aplicada. B) Astringencia y duración del tratamiento. C) Presión aplicada y duración del tratamiento.

IV.1.2.3. COLOR

En general, los parámetros de color estudiados, luminosidad (L^*), saturación (C^*) y tono (h) no difieren entre las muestras control astringentes y no astringentes (Figura IV.1.19).

El procesado por APH provoca en las muestras en estado de maduración M1 un descenso en los valores de L^* , C^* y h . Dicho descenso es más acusado cuando se tratan con 200 MPa que con 400 MPa. Por otra parte, el descenso en los valores de estos parámetros es menos acusado en las muestras astringentes que en las no astringentes. A nivel macroscópico se observa que el tratamiento con APH provoca un oscurecimiento y pérdida de color en las muestras.

Estos cambios en los valores de los parámetros de color y en las propiedades ópticas del caqui tratado, podrían indicar que se produce una mayor actividad de enzimas responsables del pardeamiento enzimático, tales como la polifenoloxidas (PPO), debido al tratamiento de APH. Las alteraciones en la permeabilidad de las membranas y los daños ocasionados en éstas y en las paredes celulares a causa del tratamiento de APH favorecerían el contacto entre la enzima y sus sustratos, que previamente se encontraban separados en distintos compartimentos en las células no dañadas (Rastogi et al., 2007). Este contacto podría favorecer, por tanto, las reacciones de pardeamiento.

Similares efectos se observan en el caqui en estado de maduración M2 (Figura IV.1.19), aunque en este caso el descenso en los valores de los parámetros no es tan acusado como en el estado de maduración M1. Además, en el estado de maduración

M2 los valores de C* de las muestras no astringentes son superiores a las astringentes cuando se trata con 400 MPa.

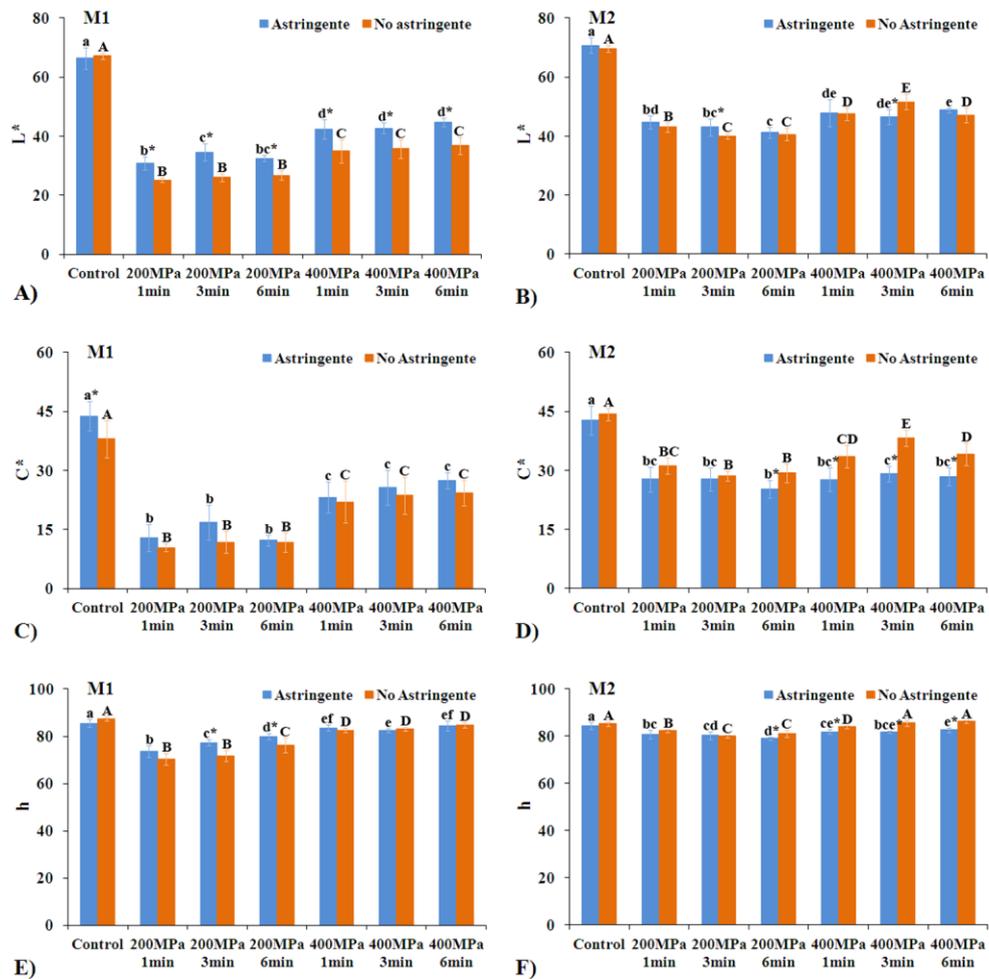


Figura IV.1.19. Valores de L*, C* y h de caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 (A, C y E) y M2 (B, D y F). Promedio de diez determinaciones con su desviación estándar. Los valores de un mismo tipo de caqui sin letra en común tienen diferencias significativas (P < 0.05). El asterisco indica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, hay diferencias significativas (P < 0.05) entre la muestra astringente y la no astringente.

Corroborando lo anteriormente comentado, el análisis estadístico indica que hay interacciones significativas (P < 0.05) en los tres parámetros entre astringencia y estado de maduración y entre estado de maduración y presión aplicada (Figura IV.1.20).

IV. Resultados y Discusión

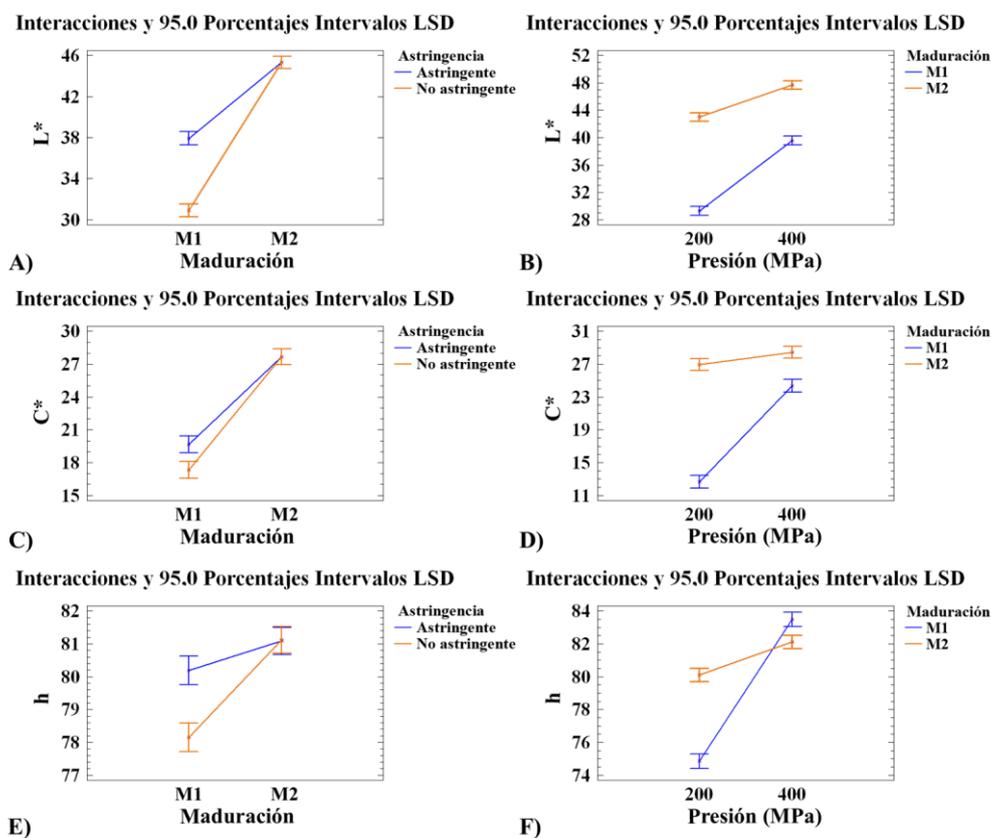


Figura IV.1.20. Gráficos de interacción significativa para las variables respuesta L^* , C^* y h considerando intervalos LSD. Astringencia y estado de maduración (A, C y E) y estado de maduración y presión aplicada (B, D y F).

IV.1.2.4. PROPIEDADES TEXTURALES

a) Firmeza

En estudios previos (Arnal y del Río, 2004; Salvador et al., 2004), se consideran aptas para el consumo aquellas muestras de caqui que proporcionan valores de firmeza superiores a 10 N al ser evaluada con una sonda cilíndrica de 8 mm. Debido a que al evaluar propiedades texturales de fruta, los resultados de un mismo tipo de test dependen del operador, del modo de preparación de la muestra, del instrumento de medición y del diámetro de sonda empleados (Harker et al., 1996; DeLong et al. 2000; Milczarek y McHugh, 2011), en el presente estudio se podrían considerar aptas para el consumo aquellas muestras de caqui con valores de firmeza superiores a 2.5 N, evaluando ésta con una sonda cilíndrica de 4 mm de diámetro. Las muestras en estado de maduración M1 tienen una firmeza en torno a 10.8 N, mientras que en estado de maduración M2 los valores oscilan entre 3 y 4 N (Figura IV.1.21). Estos valores

coinciden con los obtenidos por Salvador et al. (2004, 2005 y 2007), Besada et al. (2008) e Igual et al. (2008). El ablandamiento que se produce durante la maduración está asociado a la hidrólisis y solubilización de las sustancias pécticas de la pared celular debido a la actividad de enzimas pécticas tales como la pectinametiltransferasa (PME) y poligalacturonasa (PG) (Artés et al., 1996; Brummell y Labavitch, 1997).

Si se compara con las muestras control, los tratamientos de APH, en general provocan una disminución de la firmeza, tanto en las muestras astringentes como en las no astringentes en ambos estados de maduración (Figura IV.1.21). Como se ha comprobado en el estudio microestructural (Apartado IV.1.1), el tratamiento con APH produce la degradación de paredes y membranas celulares. En los frutos en estado de maduración M1 (Figura IV.1.21 A), al aplicar 200 MPa durante tiempos cortos (1 y 3 minutos) y 400 MPa durante 1 minuto, las muestras astringentes presentan valores de firmeza significativamente inferiores ($P < 0.05$) a las tratadas con CO_2 . Esto podría deberse a que al aplicar presión se produce rotura de membranas y paredes celulares, lo que provoca pérdida del turgor celular y la consecuente liberación del contenido celular hacia el apoplasto. Como consecuencia, los espacios intercelulares se llenan de líquido procedente del interior de las células. Esto ocurre en mayor medida en las muestras no astringentes, que son las más degradadas y por ello la difusión del contenido celular por todo el tejido es más homogénea. Probablemente la resistencia que opone el tejido con los intersticios completamente anegados (como ocurre en las muestras no astringentes) es superior al de aquel que aún conserva espacios rellenos de aire (como en las muestras astringentes). Sin embargo, llega un momento en que los tejidos están tan degradados que este efecto ya no es significativo. Además, las pectinas procedentes de las paredes celulares degradadas tienen la capacidad de formar redes con iones divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} (Basak y Ramaswamy, 1998). El caqui contiene en su composición 6.5 y 9 mg de Ca^{2+} y Mg^{2+} respectivamente por cada 100 gramos de fruta fresca (Park et al., 2006). El caqui no astringente presenta, debido al tratamiento de desastringencia, una mayor degradación celular y consecuentemente una mayor disolución de sustancias procedentes de la pared celular capaces de formar redes, que podrían aumentar los valores de firmeza. Esto también explicaría los valores de firmeza superiores del caqui no astringente frente al astringente.

Cuando las muestras se encuentran en el estado de maduración M2 se comprueba que, en general, el tratamiento con APH también produce un descenso en los valores de firmeza, tanto en los frutos astringentes como en los no astringentes (Figura IV.1.21 B). Sin embargo, las diferencias entre los valores son menores, probablemente por el alto grado de degradación del tejido, propio de este estado de maduración.

IV. Resultados y Discusión

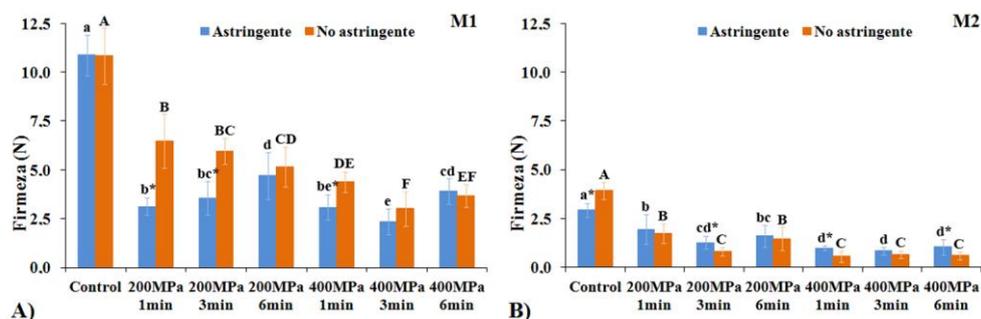


Figura IV.1.21. Valores de firmeza de caqui ‘Rojo Brillante’ astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 y M2. Promedio de ocho determinaciones con su desviación estándar. Los valores de un mismo tipo de caqui sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$). El asterisco indica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la muestra astringente y la no astringente.

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. 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 en estado de maduración M1 (Figura IV.1.22 A).

Además, el estado de maduración determina qué influencia tiene el tratamiento de desastringencia sobre la firmeza, de forma que únicamente en el estado de maduración M1, las muestras no astringentes tienen significativamente más firmeza que las astringentes (Figura IV.1.22 B).

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 IV.1.22 C).

Por último, la duración del tratamiento de APH también influye sobre el efecto de la astringencia en la firmeza (Figura IV.1.22 D). Así, cuando el tiempo de aplicación de APH es largo (6 minutos), el efecto sobre la firmeza es similar en caquis astringentes y no astringentes, independiente de la presión aplicada.

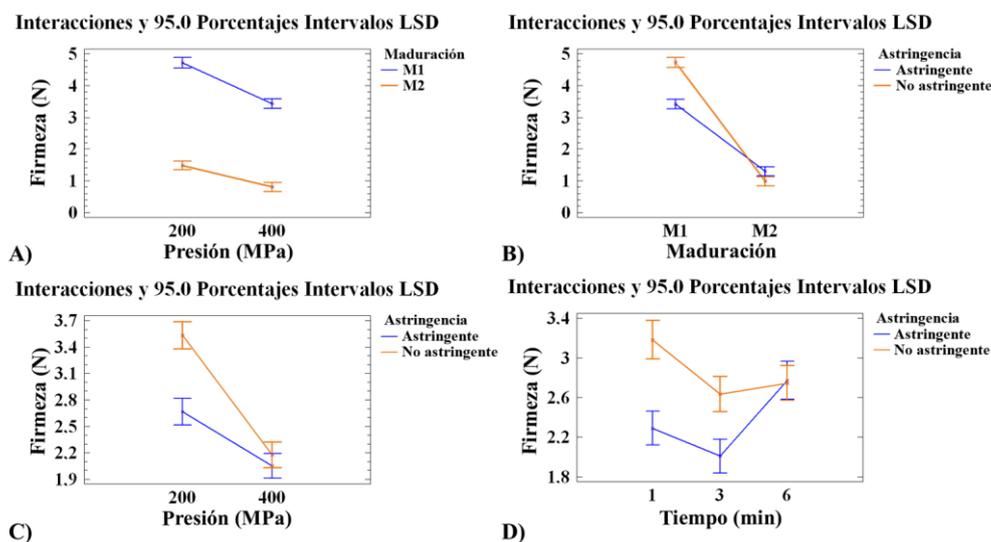


Figura IV.1.22. Gráficos de interacción significativa para la variable respuesta firmeza considerando intervalos LSD. A) Estado de maduración y presión aplicada. B) Estado de maduración y astringencia. C) Astringencia y presión aplicada. D) Astringencia y duración del tratamiento.

b) Cohesividad

En general, las muestras control en estado de maduración M1 (Figura IV.1.23 A) presentan valores de cohesividad superiores a los de las muestras en estado de maduración M2 (Figura IV.1.23 B). Además, las muestras control astringentes tienen una cohesividad significativamente mayor ($P < 0.05$) que las no astringentes en los dos estados de maduración (Figura IV.1.23 A y B). El tratamiento de desastringencia con CO_2 produce un descenso significativo ($P < 0.05$) en los valores de cohesividad.

Al aplicar altas presiones, hay dos fenómenos que influyen en la cohesividad. Por una parte, y de forma generalizada, tiene lugar la rotura de paredes y membranas celulares y la separación entre células vecinas, lo que contribuye a la pérdida de cohesividad. Por otra parte, y como consecuencia de la rotura de paredes y membranas, la enzima PME, que se encuentra en la fracción soluble del caqui (Ciardiello et al., 2004), entra en contacto con las sustancias pécticas de las paredes celulares produciéndose su consecuente desesterificación. Como ya se ha explicado anteriormente, la pectina desesterificada tiene la capacidad de formar redes con iones divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} , contribuyendo a un reforzamiento de la estructura (Basak y Ramaswamy, 1998). Estos dos fenómenos coexisten y dependiendo de las condiciones de aplicación del tratamiento de APH, la variación en los valores de cohesividad respecto a los valores de las muestras control son más o menos acusados.

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

IV. Resultados y Discusión

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. En las muestras no astringentes se produce también un incremento generalizado de la cohesividad, que resulta especialmente elevado al aplicar 400 MPa. Esto puede atribuirse al hecho de que en este estado de maduración, la fruta ya contaba con un deterioro considerable de partida y por tanto, el tratamiento de APH tiene fundamentalmente un efecto positivo sobre la cohesividad mejorando el contacto entre enzima y sustrato y facilitando la dispersión y posterior interacción de los componentes estructurales disueltos.

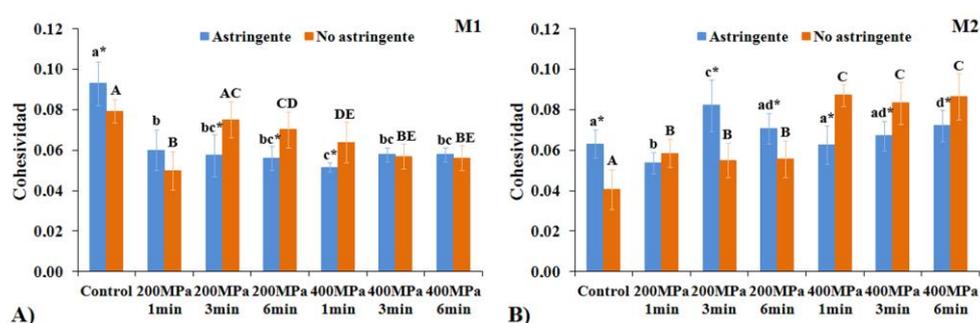


Figura IV.1.23. Valores de cohesividad de muestras de caqui astringente y no astringente con distintos tratamientos de APH en estado de maduración M1 y M2. Promedio de ocho determinaciones con su desviación estándar. Los valores de un mismo tipo de caqui sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$). El asterisco indica que, para un mismo tratamiento y estado de maduración, hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la muestra astringente y la no astringente.

Al realizar el análisis de la varianza para la cohesividad se observa que hay una interacción significativa ($P < 0.05$) entre el estado de maduración y la presión aplicada. Al aplicar 200 MPa los valores medios de cohesividad son similares en ambos estados de maduración. Sin embargo, al aplicar 400 MPa la media de los datos del estado de maduración M1 disminuye ligeramente, mientras que la de estado de maduración M2 sufre un incremento notable. Esto puede deberse a que, como ya se ha comentado, en el estado de maduración M2, el tejido está deteriorado por el propio proceso de maduración y la aplicación de presión mejora el contacto entre enzima y sustrato. Esta mejora sería más notable conforme la presión aplicada es mayor, repercutiendo así en el valor de la cohesividad.

Por otra parte, el efecto de la presión aplicada varía según las muestras sean astringentes o no. A 200 MPa no hay diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las medias de cohesividad de las muestras astringentes y no astringentes. No obstante, a 400 MPa las medias sí tienen diferencias significativas ($P < 0.05$), ya que la cohesividad de las muestras astringentes disminuye ligeramente y la de las muestras no astringentes experimenta un incremento notable, probablemente debido al efecto que tiene el tratamiento de desastringencia con CO_2 sobre la estructura y a que se favorece el contacto enzima-sustrato.

Por último, el efecto de la duración del tratamiento también depende de la presión que se aplique. A 200 MPa la cohesividad aumenta con 3 y 6 minutos de tratamiento porque a 1 minuto la difusión de líquido aún no debe ser relevante a efectos de cohesividad. En cambio, a 400 MPa no hay cambios en los valores de cohesividad independientemente de la duración del tratamiento porque a esa presión es suficiente un minuto para alcanzar la difusión adecuada.

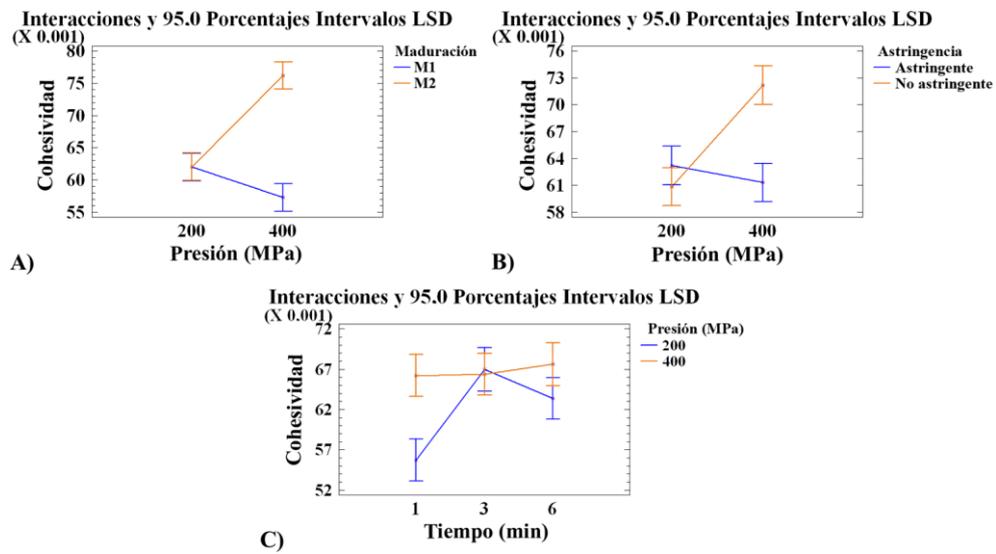


Figura IV.1.24. Gráficos de interacción significativa para la variable respuesta cohesividad considerando intervalos LSD. A) Estado de maduración y presión aplicada. B) Astringencia y presión aplicada. C) Presión aplicada y duración del tratamiento.

IV.1.3. SELECCIÓN DEL ESTADO DE MADURACIÓN, GRADO DE ASTRINGENCIA Y CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRESIÓN Y TIEMPO PARA EL TRATAMIENTO DE CAQUI 'ROJO BRILLANTE' CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

En este apartado se pretende determinar las condiciones más adecuadas de maduración y grado de astringencia del caqui, así como las condiciones de presión y temperatura más adecuadas a fin de obtener caqui tratado por APH con atributos de calidad atractivos y propiedades nutricionales mejoradas.

Desde el punto de vista microestructural, se ha observado en el Apartado IV.1.1 que el tratamiento de APH ejerce un importante efecto sobre la estructura del caqui, afectando a la integridad de las paredes y membranas celulares. Como consecuencia, parece producirse la difusión del contenido celular desde el interior hacia el apoplasto celular, lo que mejoraría la extractabilidad de algunos compuestos bioactivos. Así, gran parte de los taninos solubles difunden fuera de las vacuolas, las sustancias carotenoides son liberadas desde los cromoplastos y la degradación de las paredes celulares tiene como consecuencia el aumento del componente de fibra dietética soluble. Todos estos fenómenos parecen darse en mayor grado conforme aumenta la duración del tratamiento.

Por otra parte, en el Apartado IV.1.2 se ha observado que el 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. Los taninos son capaces de combinarse con enzimas, proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, saponinas, y formar complejos con el hierro del alimento, dificultando la digestión de estos nutrientes (Smithard, 2002; de Lange et al., 2000; Caldas y Blair, 2004). Es por ello que consumidos en dosis elevadas se consideran compuestos con propiedades antinutricionales. No obstante, el consumo en pequeñas cantidades del tipo adecuado de taninos puede resultar beneficioso para la salud (Chung et al., 1998a). Aunque el caqui no astringente tiene baja concentración de taninos solubles, lo cual resulta adecuado, el caqui astringente tratado por APH tiene niveles de contenido en taninos solubles similares a los del no astringente y los taninos solubles difunden en mayor proporción a los espacios intercelulares, mejorando su extractabilidad, tal y como se ha observado mediante Cryo-SEM y microscopía óptica (Figuras IV.1.1., 4 y 7). Es por esto que, cuando se aplican 200 MPa / 6 min y 400 MPa / 3 y 6 min el contenido en taninos solubles es significativamente superior ($P < 0.05$) en las muestras astringentes en estado de maduración M1, aunque se traten de valores bajos en comparación con la muestra control (Figura IV.1.13 A). Por este motivo, parece más adecuado el caqui astringente para el tratamiento con APH que el no astringente.

En vista al estudio microestructural y fisicoquímico realizado (Apartados IV.1.1 y IV.1.2), el caqui en estado de maduración M2, ya sea astringente o no astringente, resulta inadecuado para la aplicación de APH y su posterior comercialización. En el estado de maduración M2 el tejido está demasiado deteriorado ya de partida y no tolera los tratamientos de APH aplicados sin perder integridad. De este modo, el tejido de

caqui en estado de maduración M1 sería más adecuado para el tratamiento con APH que en el estado de maduración M2.

Por todo lo expuesto, se consideran los tratamientos de 200 MPa a 3 y 6 minutos como los más adecuados, ya que una presión mayor degrada demasiado el tejido y un tiempo inferior a 3 minutos resulta insuficiente a esta presión para la difusión del material soluble, además del ahorro energético que supone a aplicación de 200 MPa en vez de 400 MPa (Figura IV.1.25).

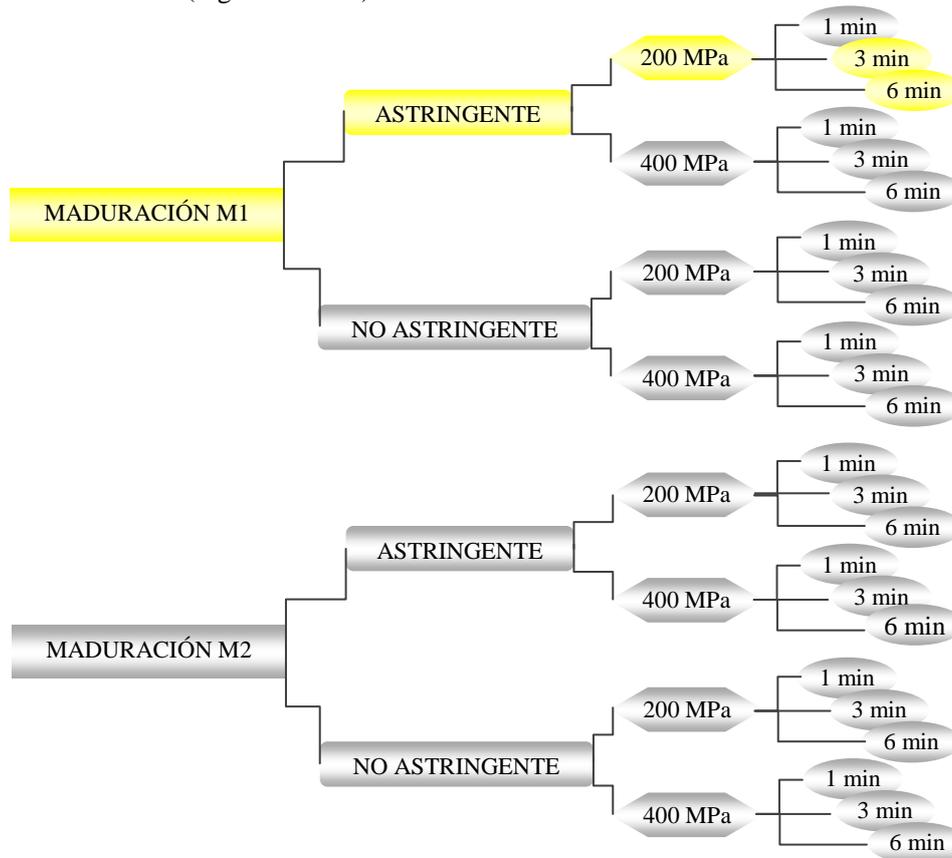


Figura IV.1.25. Muestras de caqui elegidas y tratamientos de altas presiones seleccionados (amarillo) de entre todos los estudiados.

IV.1.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE TRATAMIENTO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN EL CAQUI ‘ROJO BRILLANTE’ ASTRINGENTE EN ESTADO DE MADURACIÓN M1

Es sabido que la integridad y funcionalidad de las membranas pueden verse afectadas por los cambios de temperatura; un incremento en la temperatura puede alterar las estructuras ternaria y cuaternaria de las proteínas de las membranas, aumentando la permeabilidad de las mismas e incrementando la difusión de los electrolitos hacia el apoplasto (Wahid et al., 2007). Para comprobar si un incremento en la temperatura de aplicación de las APH tiene efecto en la mejora de la extractabilidad de compuestos bioactivos del caqui, en el presente capítulo se estudia la microestructura y las propiedades fisicoquímicas del caqui astringente en estado de maduración M1 tratado por APH (200 MPa durante 3 y 6 minutos) a 25°C y a 37,5 °C.

IV.1.4.1. EFECTO SOBRE LA MICROESTRUCTURA

En la Figura IV.1.26 se presentan las imágenes obtenidas por Cryo-SEM del caqui astringente en estado de maduración M1 sometido a diferentes condiciones de tratamiento con APH. Si se compara el tejido tratado a 25°C (Figura IV.1.26 A y C) y a 37.5 °C (Figura IV.1.26 C y D) se puede observar que a 37.5°C los sólidos solubles del interior de la célula difunden hacia los espacios intercelulares en mayor grado que en las muestras tratadas a 25 °C, lo que se traduce en una menor presencia de aire en los espacios intercelulares de las muestras tratadas a 37.5 °C. Tanto una mayor temperatura como un mayor tiempo de tratamiento favorecen la difusión del material soluble.

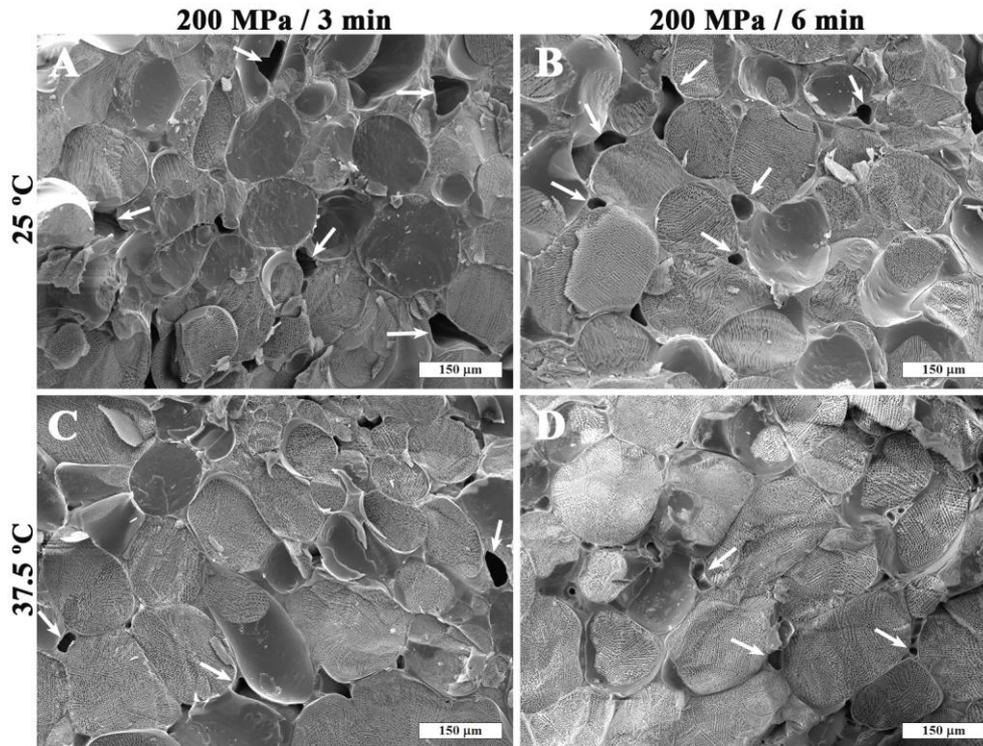


Figura IV.1.26. Cryo-SEM. Tejido parenquimático de caqui ‘Rojo Brillante’ tratado por altas presiones (200 MPa durante 3 y 6 minutos a 25 y 37.5 °C). Flecha: espacio intercelular.

En la Figura IV.1.27 se presentan las imágenes obtenidas por LM del caqui astringente en estado de maduración M1 sometido a diferentes condiciones de tratamiento con APH. Si se compara el caqui astringente en estado de maduración M1 control (Figura IV.1.4 A) y el tratado con APH a 25 °C (Figura IV.1.27 A y B) se puede observar que a 25°C las células pierden adhesión intercelular, las paredes celulares son más irregulares (menos homogéneamente teñidas) y los espacios intercelulares son de mayor tamaño que en el caqui control. En el caqui tratado con APH a 25 °C se aprecian taninos precipitados tanto en el interior como en el exterior de las células. La dispersión de los taninos parece aumentar al incrementarse la duración del tratamiento (Figura IV.1.27 B). Al tratar el caqui a 37.5 °C (Figura IV.1.27 C y D) no se aprecian grandes diferencias a nivel microestructural con el caqui tratado a 25 °C. En las muestras tratadas a 37.5 °C, las paredes celulares aparecen homogéneamente teñidas y se separan de las contiguas dejando espacios. En algunas células el tonoplasto está retraído hacia el centro de la célula. Las estructuras tánicas observadas en las muestras tratadas a 37.5 °C (Figura IV.1.27 C y D) se encuentran mayoritariamente en los espacios intercelulares, sobre todo al tratar durante 6 minutos, y no son tan densas como en las muestras tratadas a 25 °C (Figura IV.1.27 A y B). Probablemente esto se deba a que al aumentar la temperatura haya mayor difusión de taninos por el apoplasto.

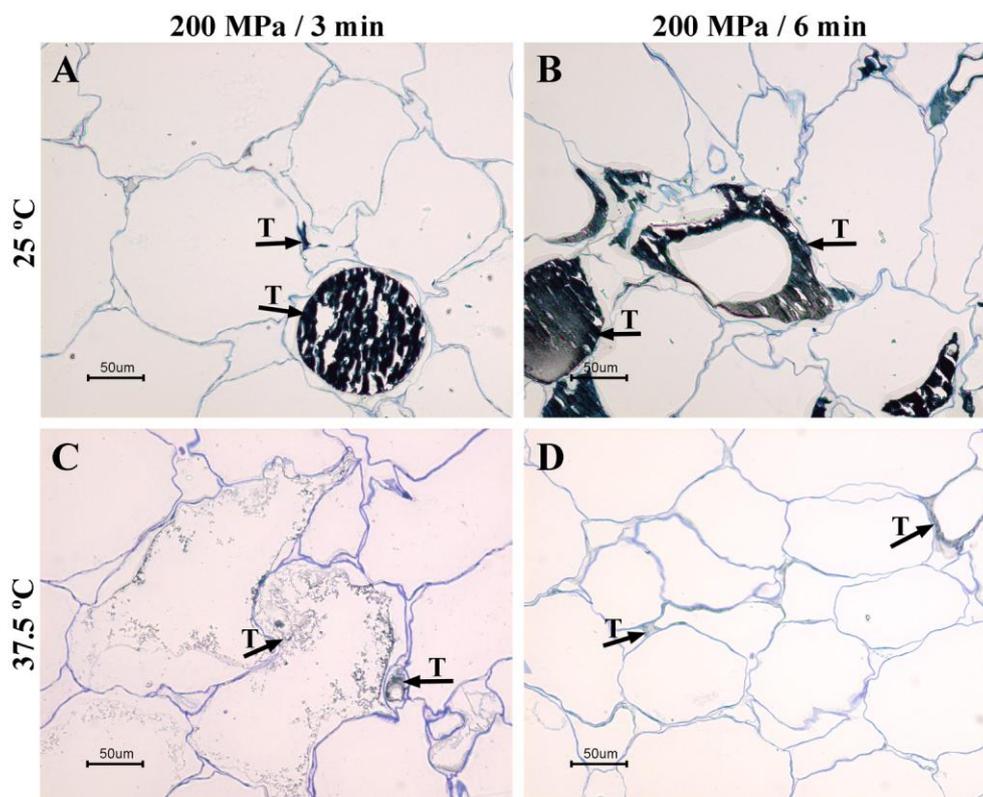


Figura IV.1.27. Microscopía óptica. Tejido parenquimático de caqui ‘Rojo Brillante’ tratado por altas presiones. T: taninos.

IV.1.4.2. EFECTO SOBRE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

En general, el tratamiento con APH produce una disminución significativa ($P < 0.05$) en el contenido en TS (Figura IV.1.28 A). Al tratar a 37.5 °C, el descenso en TS no es tan acusado. Esto puede ser debido a que el aumento de temperatura favorece y aumenta la dispersión de los taninos por los espacios intercelulares, lo que dificulta la interacción de los taninos entre sí y con otros componentes y su polimerización. Por otra parte, la temperatura del tratamiento también tiene una marcada influencia en la cantidad de SST. Al aplicar APH a 25 °C se produce una disminución en SST, probablemente debida al descenso en taninos solubles. Sin embargo, al tratar a 37.5 °C el contenido en SST se mantiene en valores similares a los de la muestra control o incluso aumenta (Figura IV.1.28 B), lo que podría indicar una mejora en la extractabilidad de los compuestos solubles del caqui debido a la difusión del contenido celular hacia los espacios intercelulares tal y como se ha observado a nivel microestructural (Figuras IV.1.20 y 21).

En general, el pH aumenta al aplicar altas presiones, probablemente debido a la precipitación de los taninos, de carácter ácido (Figura IV.1.28 C). Por otra parte, la luminosidad disminuye con los tratamientos de APH debido al pardeamiento de la muestra (Figura IV.1.28 D). No obstante, al tratar a 37.5 °C la variación de estos parámetros con respecto al control no es tan acusada como en las muestras tratadas a 25 °C, lo cual se puede considerar una ventaja con respecto a los tratamientos a 25 °C.

En lo que respecta a las propiedades texturales, la firmeza disminuye tratando tanto a 25 °C como a 37.5 °C debido a la degradación del tejido celular ocasionados por la aplicación de APH. No obstante, la disminución de firmeza es menor en el caso de los tratamientos a 37.5 °C y podría verse compensada por los valores superiores de cohesividad que se obtienen con el tratamiento a 37.5°C (Figura IV.1.28 E y F). Tal y como se ha comentado en el Apartado IV.1.2.4, en términos de firmeza, los daños en el tejido ocasionados al aplicar presión podrían verse compensados por una mayor compactación del tejido y una mayor actividad de la enzima PME. Alonso et al. (1997) registraron un progresivo incremento en la actividad de PME en caqui al aumentar la temperatura, alcanzando su máximo a 50 °C. Alegaron que el incremento moderado de temperatura podría inducir pérdida en la selectividad del plasmalema, lo que incrementaría la difusión de cationes a la pared celular. El incremento en cationes podría aumentar la actividad de la PME, facilitando la formación de puentes entre cadenas pécticas y contribuyendo así a la firmeza del tejido. El aumento de temperatura junto con el descenso de pH debido a una mayor actividad de la PME podría explicar la disminución de la actividad de la PPO y con ello la menor diferencia de luminosidad de las muestras tratadas a 37.5 °C.

A raíz del análisis realizado en el presente apartado se concluye que la temperatura de tratamiento tiene una influencia significativa ($P < 0.05$) en los parámetros fisicoquímicos estudiados, que implica una mejora con respecto a la aplicación de APH a 25 °C. Por lo tanto, el aumento de la temperatura en el tratamiento con APH de 25 °C a 37.5 °C parece aconsejable para una mejora en el mantenimiento de las propiedades fisicoquímicas estudiadas y la extractabilidad de compuestos bioactivos solubles del caqui.

IV. Resultados y Discusión

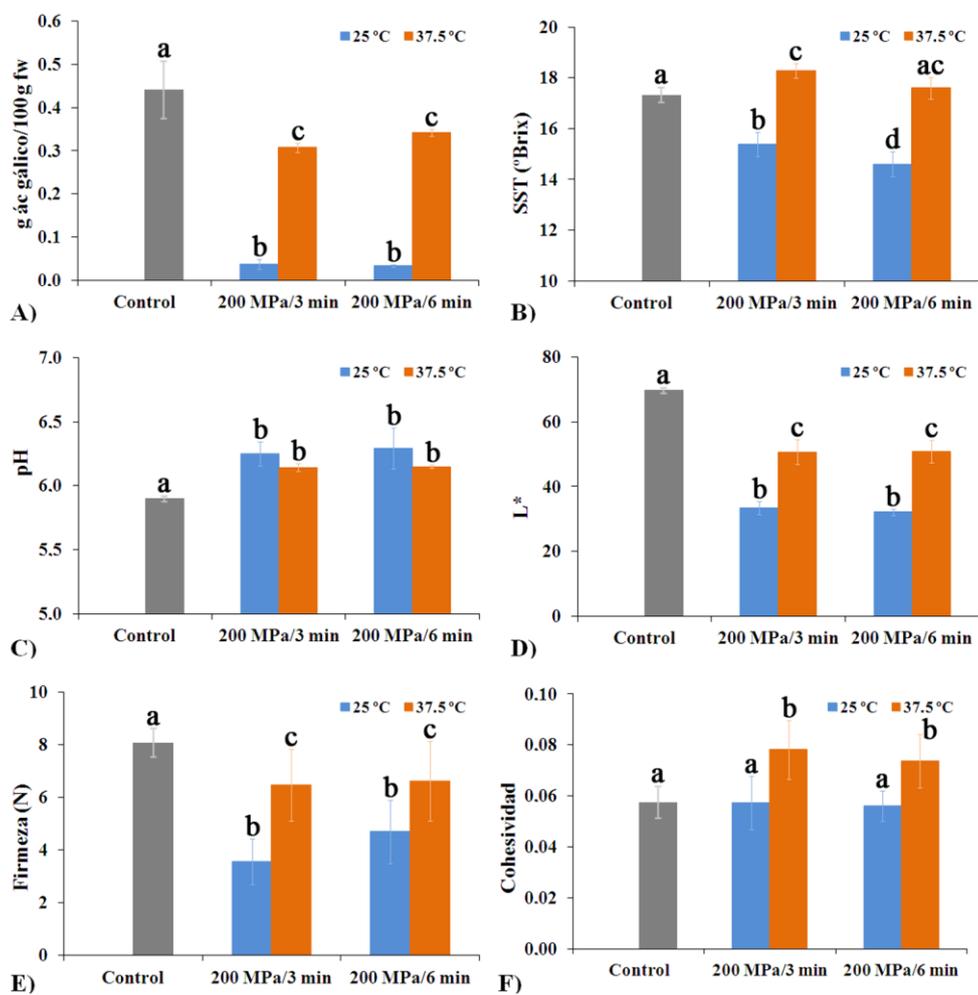


Figura IV.1.28. Caqui ‘Rojo Brillante’ tratado por altas presiones. A) Contenido en taninos solubles. B) Contenido en sólidos solubles totales. C) pH. D) Luminosidad. E) Firmeza. F) Cohesividad. Los segmentos verticales representan la desviación estándar. Diferentes letras entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

IV.2. EVALUACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE CAQUI ‘ROJO BRILLANTE’ TRATADO CON ALTAS PRESIONES

En base los resultados obtenidos en el Apartado IV.1, el estudio de la vida útil se realiza en caqui ‘Rojo Brillante’ en estado de maduración M1 sin tratamiento de desastringencia previo. En la Tabla IV.2.1 se muestra las características del caqui utilizado como materia prima para su tratamiento de APH.

Tabla IV.2.1. Características fisicoquímicas del caqui astringente en estado de maduración M1 empleado para el estudio de vida útil. Media \pm desviación estándar. SST: sólidos solubles totales.

Maduración M1 / Astringente	
Taninos solubles (g ác. gál./100 g pf)	0.44 \pm 0.07
SST (°Brix)	17.33 \pm 0.29
pH	5.9 \pm 0.02
L*	69.83 \pm 0.85
C*	43.03 \pm 3.07
h	85.77 \pm 1.16
Firmeza (N)	8.10 \pm 0.55
Cohesividad	0.06 \pm 0.01

En cuanto a las condiciones de tratamiento con APH, como se ha comprobado en el Apartado IV.1.4, un aumento en la temperatura de tratamiento de de 25 °C a 37.5 °C favorece la difusión de material soluble y mejora las propiedades fisicoquímicas del caqui tratado por APH. Por esta razón se opta por aplicar los tratamientos de APH a 37.5 °C para el estudio de la vida útil. Las condiciones de presión y tiempo seleccionadas son 200 MPa durante 3 y 6 minutos, tal y como se ha justificado en el Apartado IV.1.3. En la Tabla IV.2.2 se especifican las condiciones de los dos tratamientos (T1 y T2) de APH aplicados para el estudio de la vida útil.

Tabla IV.2.2. Condiciones de los tratamientos de altas presiones aplicados para el estudio de vida útil.

Tratamiento	Presión (MPa)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
T1	200	3	37.5 °C
T2	200	6	37.5 °C

IV.2.1. ESTUDIO MICROESTRUCTURAL

IV.2.1.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJAS TEMPERATURAS

En la Figura IV.2.1 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (Cryo-SEM) del caqui tratado con APH a 37.5°C durante el periodo de almacenamiento. En las muestras de caqui recién tratadas (D0) con 200 MPa a 37.5 °C durante 3 minutos, se puede comprobar que comienza a difundir material soluble hacia algunos espacios intercelulares que aparecen con artefacto eutéctico. Se observa, además, cierta pérdida de adhesión entre células contiguas (Figura IV.2.1 A). Al tratar durante 6 minutos, la cantidad de líquido difundido a los espacios parece ser mayor y se observa una ligera retracción del tonoplasto hacia el centro de la célula (Figura IV.2.1 B).

Transcurridos 7 días de almacenamiento (D7) los espacios intercelulares están completamente anegados de contenido celular en ambos tratamientos (Figura IV.2.1 C y D). En las muestras tratadas durante 3 minutos empieza a observarse la retracción de algunas membranas y del tonoplasto y cierta deformación celular (Figura IV.2.1 C). También se observa precipitación de taninos dentro y fuera de las células tánicas indicando difusión de los taninos solubles desde el interior celular al apoplasto. Este hecho es más notable en las muestras tratadas durante 6 minutos (Figura IV.2.1 D).

Tras 14 días de almacenamiento (D14), la pérdida de turgencia en las células debido a la difusión del líquido intracelular al exterior es más evidente (Figura IV.2.1 E). El tonoplasto de las células tánicas está más separado de la membrana celular, probablemente porque ha habido difusión de los taninos solubles al apoplasto y posteriormente precipitación de los mismos (Figura IV.2.1 F).

El tonoplasto se observa todavía más retraído tras 21 días de almacenamiento (D21) en las muestras tratadas durante 3 y 6 minutos (Figura IV.2.1 G y H). Las células están altamente deformadas y se observa gran cantidad de taninos precipitados en los espacios intercelulares.

Después de 28 días de almacenamiento (D28), las células parecen estar separadas por espacios intercelulares mayores, fruto de la degradación celular y las paredes de las células vecinas aparecen separadas unas de otras, observándose material soluble entre ambas (Figura IV.2.1 I y J).

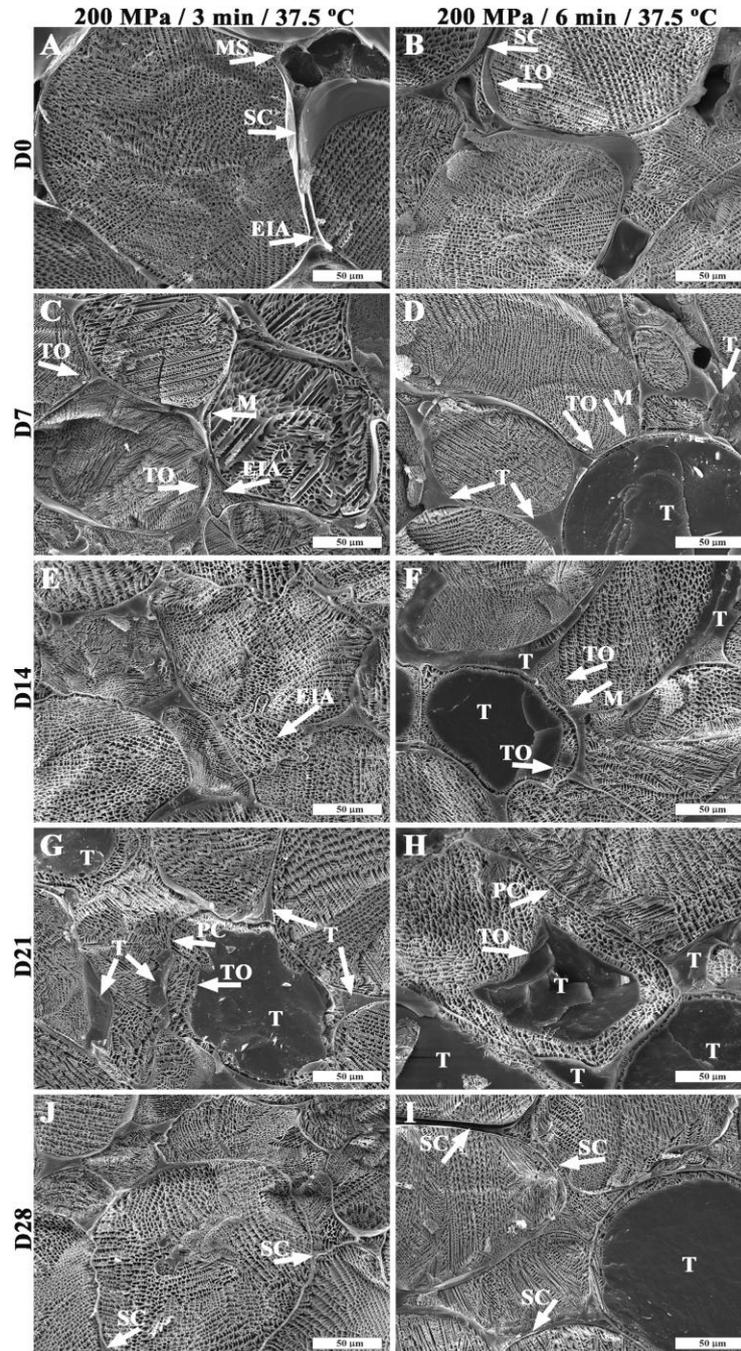


Figura IV.2.1. Cryo-SEM. Caqui astringente en estado de maduración M1 tratado por altas presiones. MS: material soluble; EIA: espacio intercelular anegado; SC: separación celular; TO: tonoplasto; M: membrana; T: taninos; PC: pared celular.

IV.2.1.2. MICROSCOPIA ÓPTICA

La estructura del caqui tratado con APH a 37.5 °C (Figura IV.2.2) inmediatamente después del tratamiento (D0) es diferente a la del caqui no tratado (Figura IV.1.7 A). Las paredes celulares de las células vecinas, aunque aparecen homogéneamente teñidas, empiezan a separarse unas de otras dejando espacios intercelulares de mayor tamaño. También se observan paredes celulares degradadas y presencia de taninos fuera de las células (Figura IV.2.2 A), tal y como ya se ha observado con los tratamientos de APH a 25 °C (Apartado IV.1.1.2). La degradación estructural y la dispersión de las sustancias tánicas parece ser mayor al aumentar el tiempo de tratamiento a 6 minutos (Figura IV.2.2 B).

Tras 14 días de almacenamiento (D14), la separación celular es más acusada, aumentando así el tamaño de los espacios intercelulares (Figura IV.2.2 C). Además, la degradación de los componentes de la pared celular es más notable, ya que las paredes aparecen menos homogéneamente teñidas y con disrupciones (Figura IV.2.2 D).

Transcurridos 28 días de almacenamiento (D28), la degradación del tejido es mayor. En las muestras tratadas durante 3 minutos (T1) se observan taninos precipitados en el interior de las vacuolas de las células tánicas, en el espacio entre la membrana y la pared celular y en los espacios intercelulares. En general, las paredes celulares aparecen muy degradadas, incluso en las células tánicas (Figura IV.2.2 E). Probablemente el efecto mecánico que supone la precipitación de los taninos en el interior de las células tánicas ocasiona daños en la pared celular de las mismas potenciando la degradación, tal y como ocurre en el caqui sometido a tratamiento de desastringencia con CO₂ (Salvador et al., 2007). En las muestras tratadas durante 6 minutos (T2), la cantidad de taninos dispersos en los espacios intercelulares es mayor. Además, la paulatina difusión del líquido intracelular hacia el apoplasto durante el periodo de almacenamiento produce la retracción del tonoplasto hacia el interior celular, la separación entre la membrana celular y la pared celular y la separación entre las paredes celulares de las células vecinas (Figura IV.2.2 F).

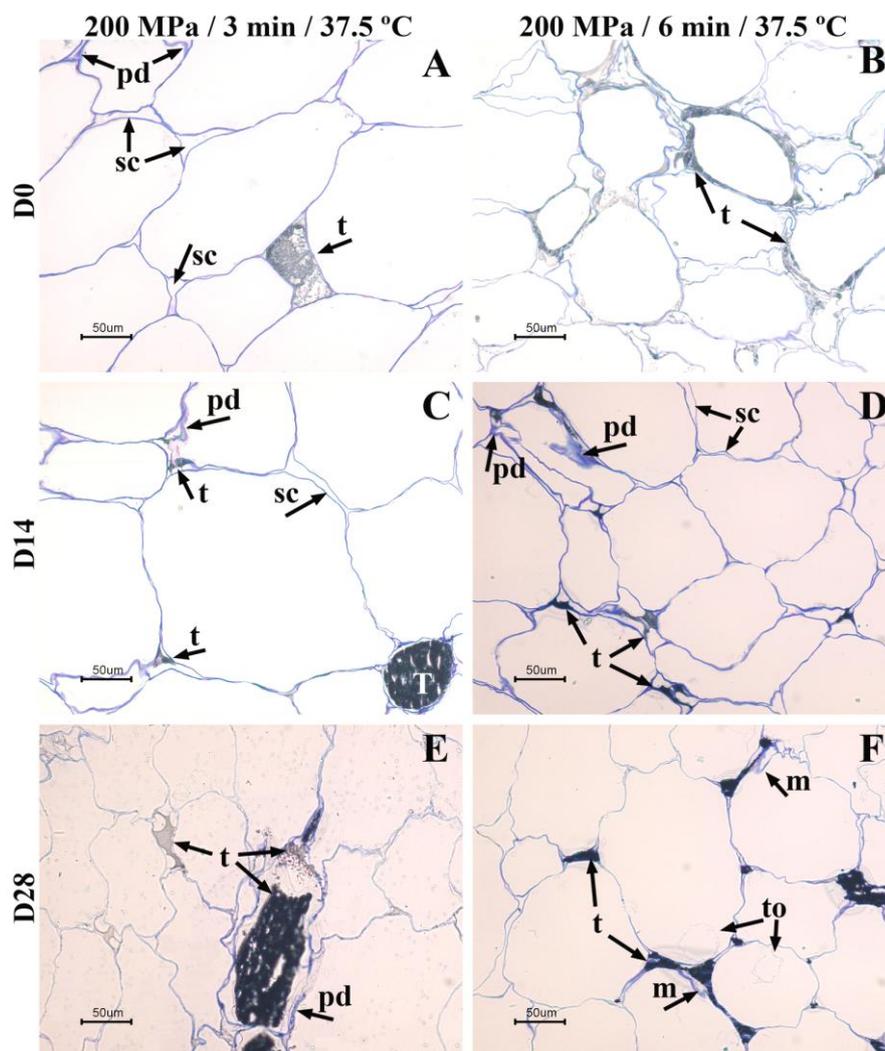


Figura IV.2.2. Microscopía óptica. Caqui astringente en estado de maduración M1 tratado por altas presiones. t: taninos; sc: separación celular; pd: pared degradada; to: tonoplasto; m: membrana.

IV.2.1.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La Figura IV.2.3 muestra las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) del caqui tratado con APH a 37.5°C a lo largo del periodo de almacenamiento. Inmediatamente después del tratamiento (D0) (Figura IV.2.3 A), en algunas zonas se observa que el tonoplasto está degradado, totalmente separado del plasmalema y alejado de la pared celular.

Al tratar el caqui con APH durante 6 minutos (T2), las paredes celulares aparecen más anchas, lo que indica disolución de sus componentes. En algunas zonas la lámina media se observa más intensamente teñida; es posible que por efecto de la temperatura aumente la permeabilidad de las paredes, de forma que parte del material soluble del interior de las células difunda a través de las paredes y se acumule en la lámina media, propiciando la separación de las paredes de las células contiguas (Figura IV.2.3 B). Esto a su vez favorecería la aparición de espacios intercelulares cada vez más grandes como se ha observado en el estudio por LM (Apartado IV.2.1.2)

Transcurridas dos semanas de almacenamiento (D14), en las muestras tratadas durante 3 minutos (T1) se observan paredes celulares de espesor muy irregular debido a la presión aplicada durante el tratamiento de APH. Las paredes celulares de las células contiguas aparecen separadas en muchos tramos, observándose material soluble en el espacio entre ambas. En algunas zonas, la compactación de las fibras celulósicas se pierde, por disolución de cementos celulósicos, aumentando mucho el espesor de las paredes. En otras zonas sin embargo, la degradación de las paredes es tal que disminuye mucho su espesor. El tonoplasto se encuentra separado de la membrana celular y roto en muchos tramos (Figura IV.2.3 C). Todas estas modificaciones estructurales se aprecian magnificadas al incrementar el tiempo de tratamiento a 6 minutos (Figura IV.2.3 D).

Tras 28 días de almacenamiento (D28) las paredes celulares se observan muy difuminadas por disolución del material de constitución de las mismas (Figura IV.2.3 E), lo que explica la mayor difusión del líquido intracelular hacia el apoplasto, tal y como se ha observado mediante LM (Figura IV.2.2). Al incrementar el tiempo de tratamiento a 6 minutos (Figura IV.2.3 F) se observan estas modificaciones estructurales magnificadas.

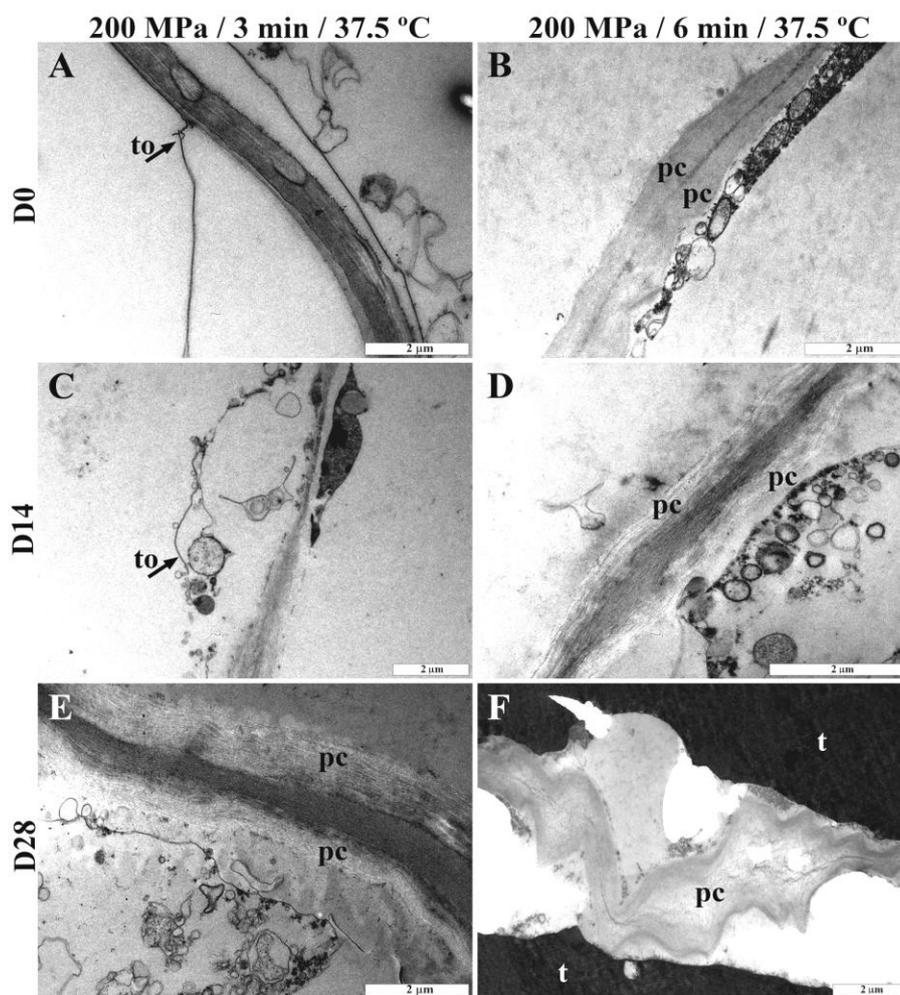


Figura IV.2.3. Microscopía electrónica de transmisión. Caqui astringente en estado de maduración M1 tratado por altas presiones. to: tonoplasto; pc: pared celular; t: taninos.

IV.2.2. ESTUDIO FISICOQUÍMICO

En este apartado se procede a analizar los parámetros fisicoquímicos de caqui ‘Rojo Brillante’ tratado con APH y almacenado durante 28 días a 4 °C. Para el análisis estadístico de los datos experimentales, se realiza un diseño multifactorial categórico con los factores tipo de tratamiento y tiempo de almacenamiento y se aplica un análisis de la varianza ANOVA para cada parámetro estudiado a fin de saber si son significativos los efectos simples del tipo de tratamiento y del tiempo de almacenamiento, o la interacción entre ambos factores.

IV.2.2.1. CONTENIDO EN TANINOS SOLUBLES

Al realizar el análisis estadístico del parámetro contenido en taninos solubles (TS), tanto los efectos simples del tipo de tratamiento y del periodo de almacenamiento como la interacción entre ambos factores son significativos ($P < 0.05$). Al ser la interacción significativa ($P < 0.05$) es más adecuado analizar ésta en vez de los efectos simples por separado.

En la Figura IV.2.84 se presenta el gráfico de interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para el contenido en TS. El contenido en TS de las muestras control se mantiene sin variaciones durante el almacenamiento, salvo en la etapa final del mismo, en la que tiene lugar un descenso drástico. Es probable que dicho descenso sea debido a la precipitación de los taninos potenciada por el propio proceso natural de maduración del fruto. Los tratamientos de APH aplicados (T1 y T2) hacen disminuir significativamente ($P < 0.05$) el contenido en TS inmediatamente después del tratamiento (D0), lo que indica que las APH provocan la precipitación de los taninos solubles, tal y como ya se ha comentado en el Apartado IV.1.2.1. Tras 7 días de almacenamiento (D7) el descenso en el contenido en TS es mucho más acusado. A partir del día 7 de almacenamiento los valores en el contenido en TS se mantienen sin variaciones hasta el final del almacenamiento (D28). Existen diferencias significativas ($P < 0.05$) en el contenido en TS entre ambos tratamientos inmediatamente después del procesado (D0). Sin embargo, la duración del tratamiento (3 o 6 minutos) deja de ser significativa conforme aumenta el tiempo de almacenamiento.

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD

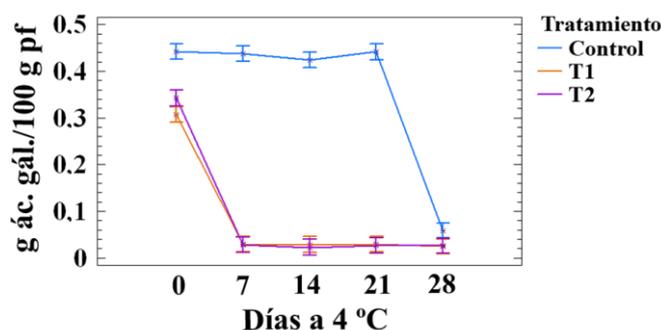


Figura IV.2.4. Gráfico de interacción significativa entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para el contenido en taninos solubles de caqui 'Rojo Brillante' considerando intervalos LSD. T1: 200 MPa / 3 min / 37.5 °C. T2: 200 MPa / 6 min / 37.5 °C.

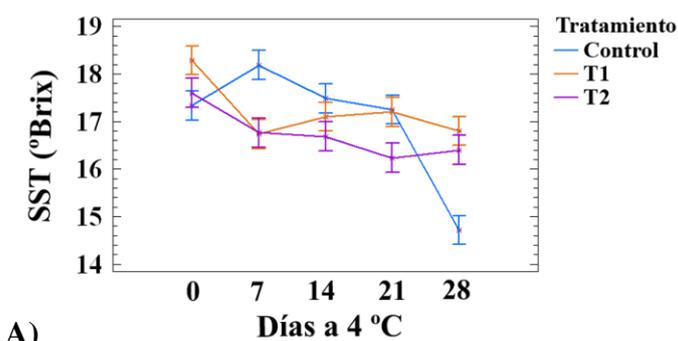
IV.2.2.2. CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES Y PH

El análisis estadístico de los parámetros contenido en sólidos solubles totales (SST) y pH, indica que la interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento es estadísticamente significativa ($P < 0.05$) para ambos parámetros. (Figura IV.2.85) La evolución del contenido en SST y del pH durante el almacenamiento depende de que la muestra haya sido tratada o no y del tratamiento aplicado (200 MPa a 37.5 °C durante 3 o 6 minutos) ya que, por ejemplo, las muestras tratadas durante 3 minutos (T1) tienen valores de SST superiores a los de las muestras tratadas durante 6 minutos (T2) en algunos tramos del periodo de almacenamiento (Figura IV.2.5 A) y la diferencia de pH entre el control y las muestras tratadas es mayor o menor dependiendo del tiempo de almacenamiento (Figura IV.2.5 B).

El contenido en sólidos solubles totales (SST) del caqui control sufre una disminución significativa ($P < 0.05$) al final del periodo de almacenamiento (Figura IV.2.5 A). Esto podría corresponderse con la precipitación de taninos que tiene lugar tras 28 días de almacenamiento, ya comentada en el Apartado IV.2.2.1. Esto también explicaría el aumento de pH para ese mismo periodo ya que los taninos solubles tienen carácter ácido (Figura IV.2.5 B).

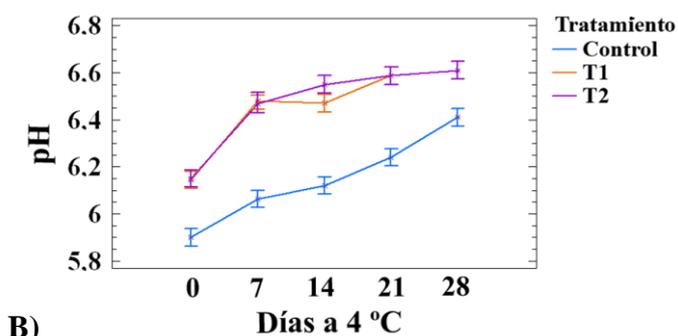
Inmediatamente después (D0) de los tratamientos con APH (T1 y T2) se produce un aumento del contenido en SST y del pH con respecto a la muestra control, que en el caso del pH es significativo ($P < 0.05$). Tras 7 días de almacenamiento (D7), en las muestras tratadas disminuye el contenido en SST y aumenta el pH, en ambos casos de manera significativa ($P < 0.05$), coincidiendo con el descenso drástico del contenido en taninos solubles que experimentan estas muestras (Figura IV.2.4). A partir de los 7 días y hasta el final del periodo de almacenamiento (D28), el contenido en SST de las muestras tratadas no experimenta cambios importantes. En cambio, el pH sufre un progresivo aumento durante el almacenamiento tanto en las muestras tratadas como en las no tratadas, que podría estar relacionado con la degradación de ácidos orgánicos durante el almacenamiento.

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



A)

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



B)

Figura IV.2.5. Gráficos de interacción significativa entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para el contenido en sólidos solubles totales (SST) y pH de caqui 'Rojo Brillante' considerando intervalos LSD. T1: 200 MPa / 3 min / 37.5 °C. T2: 200 MPa / 6 min / 37.5 °C.

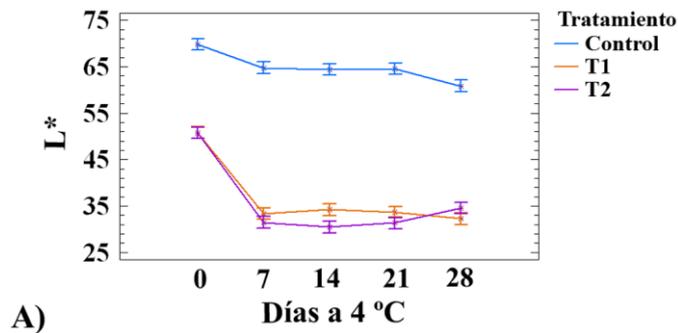
IV.2.2.3. COLOR

De acuerdo con el análisis estadístico para los parámetros luminosidad (L^*), saturación (C^*) y tono (h), la interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento es significativa ($P < 0.05$). En la Figura IV.2.86 se presenta los gráficos de interacción correspondientes a dichos parámetros.

La luminosidad y la saturación de las muestras control disminuyen significativamente ($P < 0.05$) a partir de la primera semana de almacenamiento (D7), mientras que el tono se mantiene apenas sin variaciones durante todo el periodo de almacenamiento. En general, el procesado con APH provoca un descenso en los valores de L^* , C^* y h durante todo el almacenamiento con respecto al de las muestras no tratadas (Figura IV.2.86). Tras 7 días de almacenamiento (D7), los valores de L^* , C^* y h en las muestras tratadas sufren un descenso acusado si se comparan con las tratadas pero no almacenadas (D0). Este descenso se corresponde con un oscurecimiento de las muestras que se observa a simple vista (Figura IV.2.7). A partir de ese momento, los valores de los parámetros L^* , C^* y h se mantienen prácticamente

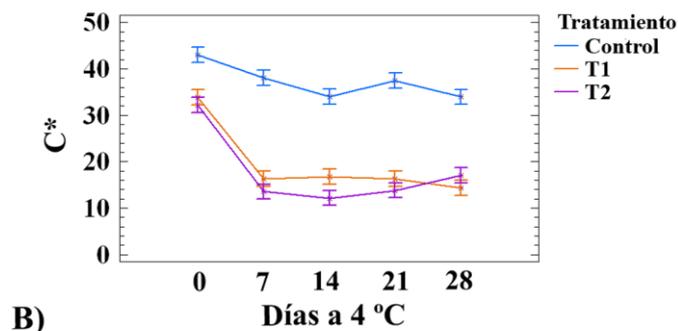
constantes hasta el final del periodo de almacenamiento. Únicamente aparecen diferencias significativas ($P < 0.05$) en los valores de L^* , C^* entre los dos tratamientos a los 14 días de almacenamiento (Figura IV.2.6 A y B). En el tono, las diferencias significativas aparecen a los 7 días de almacenamiento y se mantienen a los 14 y 21 días de almacenamiento (Figura IV.2.6 C).

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



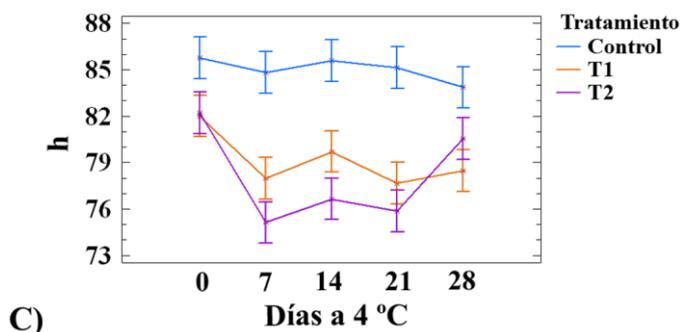
A)

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



B)

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



C)

Figura IV.2.6. Gráficos de interacción significativa entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para la luminosidad (L^*), la saturación (C^*) y el tono (h) de caqui 'Rojo Brillante' considerando intervalos LSD. T1: 200 MPa / 3 min / 37.5 °C. T2: 200 MPa / 6 min / 37.5 °C.

IV. Resultados y Discusión

El descenso de los parámetros de color de las muestras tratadas con APH podría indicar que el tratamiento con APH produce una activación de enzimas responsables del pardeamiento enzimático, tales como la polifenoloxidasas (PPO). La degradación de las paredes y membranas celulares a causa del tratamiento de APH favorecerían además el contacto entre enzima y sustrato, estimulando así el pardeamiento.



Figura IV.2.7. Cubos de caqui 'Rojo Brillante' control y tratados con altas presiones hidrostáticas, almacenados durante 7 días a 4 °C. T1: 200 MPa / 3 min / 37.5 °C. T2: 200 MPa / 6 min / 37.5 °C.

IV.2.2.4. PROPIEDADES TEXTURALES

En la Figura IV.2.8 se presenta el gráfico de interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para el parámetro firmeza; de acuerdo con el análisis estadístico dicha interacción es significativa ($P < 0.05$). El caqui no tratado sufre un descenso de firmeza significativo ($P < 0.05$) tras 7 días de almacenamiento (D7) y a partir de ese momento la firmeza no experimenta cambios significativos ($P > 0.05$). La evolución de la firmeza durante el almacenamiento en las muestras tratadas con APH es distinta. Tal y como se observa en la Figura IV.2.8, inmediatamente después del tratamiento (D0) la firmeza es significativamente menor ($P < 0.05$) en las muestras tratadas que en las control y no hay diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ambos tratamientos (T1 y T2). Sin embargo, tras la primera semana de almacenamiento (D7) las muestras tratadas durante 3 minutos (T1) aumentan su firmeza considerablemente, manteniéndose superior a la de las otras muestras durante el resto del periodo de almacenamiento. En las muestras tratadas durante 6 minutos (T2), hay un ligero descenso de la firmeza los primeros 14 días de almacenamiento para después aumentar ligeramente, pero ninguna de las variaciones es significativa ($P > 0.05$) con respecto al valor de firmeza registrado inmediatamente después de tratar (D0). Los valores de firmeza de las muestras tratadas durante 6 minutos (T2) se mantienen similares a las del control a partir de los 7 días de almacenamiento.

Es posible que debido al tratamiento con APH, durante el almacenamiento se produzca una estimulación de la actividad de la enzima PME que favorezca la formación de pectatos cálcicos que contribuyen a fortalecer la textura. Sin embargo este aumento en los valores de firmeza solo se produce en las muestras sometidas al tratamiento T1. En las muestras tratadas durante 6 minutos (T2), el deterioro estructural es mayor que en las muestras tratadas durante 3 minutos (T1); puede que la

acción de la enzima PME no sea suficiente para hacer aumentar la firmeza, lo que explicaría los menores valores firmeza de estas muestras con respecto a las tratadas durante 3 minutos durante el almacenamiento.

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD

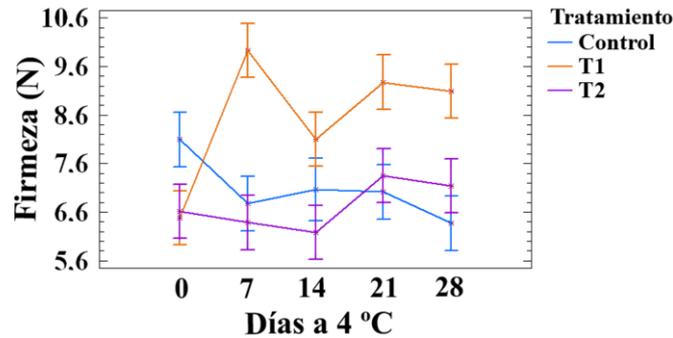


Figura IV.2.8. Gráfico de interacción significativa entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para la firmeza de caqui 'Rojo Brillante' considerando intervalos LSD. T1: 200 MPa / 3 min / 37.5 °C. T2: 200 MPa / 6 min / 37.5 °C.

Por lo que respecta a la cohesividad (Figura IV.2.9), el análisis multifactorial indica que únicamente el efecto simple del tratamiento es significativo ($P < 0.05$) ya que los valores de cohesividad de las muestras tratadas son significativamente superiores ($P < 0.05$) a los de las muestras control (Figura IV.2.9).

Medias y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD

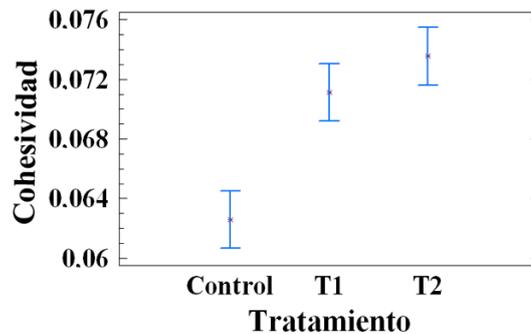


Figura IV.2.9. Gráfico de medias según el tipo de tratamiento para la cohesividad de caqui 'Rojo Brillante' considerando intervalos LSD. T1: 200 MPa / 3 min / 37.5 °C. T2: 200 MPa / 6 min / 37.5 °C.

En la Figura IV.2.10 se presenta el gráfico de interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento ya que, a pesar de no ser significativa ($P > 0.05$), su P-valor es muy próximo a 0.05 ($P = 0.055$) y además proporciona una mejor comprensión de la evolución de la cohesividad durante el almacenamiento en las distintas muestras. De esta manera se comprueba que las muestras tratadas mantienen

valores de cohesividad similares o superiores a los de las muestras control durante todo el periodo de almacenamiento, siendo las diferencias más acusadas en las etapas iniciales y finales del mismo.

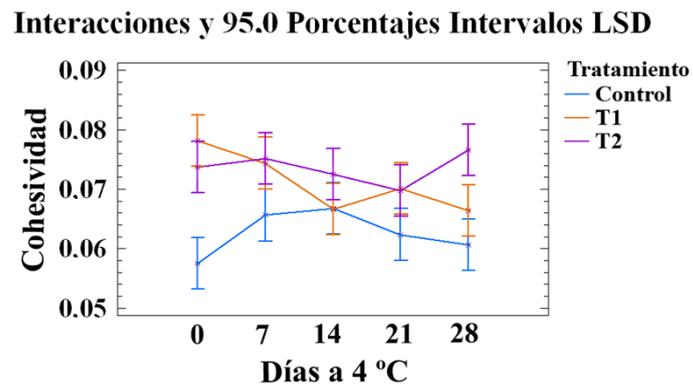


Figura IV.2.10. Gráfico de interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento (B) para la cohesividad de caqui 'Rojo Brillante' considerando intervalos LSD. T1: 200 MPa / 3 min / 37.5 °C. T2: 200 MPa / 6 min / 37.5 °C.

IV.3. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN CEBOLLA

IV.3.1. SELECCIÓN DE LA VARIEDAD DE CEBOLLA

Antes de iniciar el estudio de la aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH) en cebolla, se caracterizan tres variedades distintas a fin de seleccionar la más adecuada para el mismo. Concretamente, se estudia la microestructura y propiedades texturales de las variedades ‘Figueres’, ‘Recas’ y ‘Doux’, que corresponden a variedades comunes en España del tipo morada, amarilla y blanca, respectivamente (Figura IV.3.1).



Figura IV.3.1. Cebollas variedad ‘Figueres’, ‘Recas’ y ‘Doux’ (de izquierda a derecha).

IV.3.1.1. CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURAL

a) Cebolla ‘Recas’

El tejido de la cebolla consiste en diversas capas celulósicas que rodean capas de almacenamiento carnosas, las cuales constan de una epidermis superior, un tejido parénquimático intermedio y una epidermis inferior (Ng, et al., 2000). Para conocer la microestructura de la cebolla en general, se elige la variedad ‘Recas’ y se estudia por distintas técnicas microscópicas. En la Figura IV.3.2 se presenta las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (Cryo-SEM) y por microscopía electrónica de barrido (SEM) de cebollas ‘Recas’. Los cortes transversales de la segunda capa externa de almacenamiento, presentan un tejido compacto, con células parenquimáticas de forma redondeada (100-200 μm de diámetro) y escasos espacios intercelulares donde las paredes de las células contiguas aparecen íntimamente unidas (Figura IV.3.3 A y B). El interior de las células está casi totalmente ocupado por una gran vacuola repleta de gran cantidad de sólidos solubles (Figura IV.3.3 C), por ello se observa un artefacto eutéctico muy denso. En la cebolla, este artefacto aparece como una red de celdillas, de diferentes tamaños dependiendo de la cantidad de solutos, de manera que cuanto más pequeñas son las celdillas mayor cantidad de solutos hay (Neri et al., 2011). La epidermis (superior o inferior), de las capas de almacenamiento muestra una sola capa de células alargadas y algo cóncavas, de tamaño uniforme (Figura IV.3.3 D).

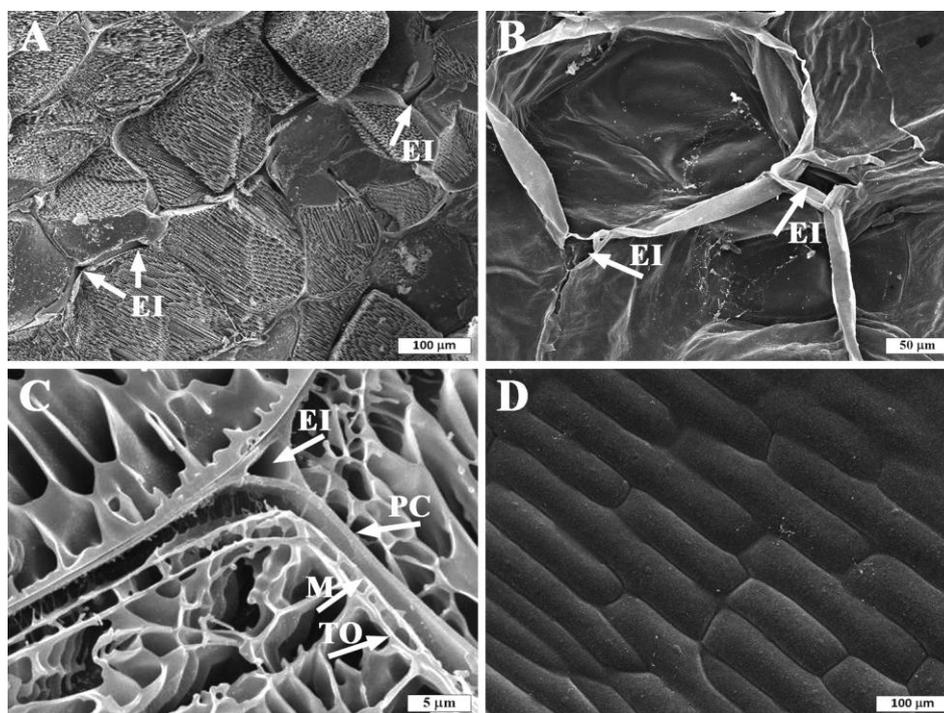


Figura IV.3.3. Cryo-SEM y SEM. Microestructura de capa externa de cebolla ‘Recas’. A) y C) Capa externa mediante Cryo-SEM; B) Capa externa mediante SEM; D) Epidermis de capa externa mediante Cryo-SEM. EI: espacio intercelular; PC: pared celular; M: membrana; TO: tonoplasto.

A fin de localizar los compuestos fenólicos en el tejido de cebolla, se observan secciones criostato de la segunda capa externa de cebolla mediante microscopía óptica (LM) empleando distintos agentes de tinción específicos (Figura IV.3.4). La tinción con azul de toluidina permite teñir en la cebolla las paredes y membranas celulares (Figura IV.3.4 A). Al teñir con permanganato potásico o con cloruro férrico, ambos agentes de tinción específicos para compuestos fenólicos, las paredes se tiñen uniformemente (Figura IV.3.4 B y C). Al teñir con vainillina-HCl no se observan concentraciones de color rojo en el tejido (Figura IV.3.4 D). Esto podría indicar que los compuestos fenólicos se encuentran mayoritariamente dispersos en las paredes celulares en el tejido parenquimático de la cebolla. Tal y como expone Harbaum (2007), los compuestos fenólicos aparecen en cantidades importantes en las paredes celulares del tejido vegetal y se encuentran esterificados con sus componentes

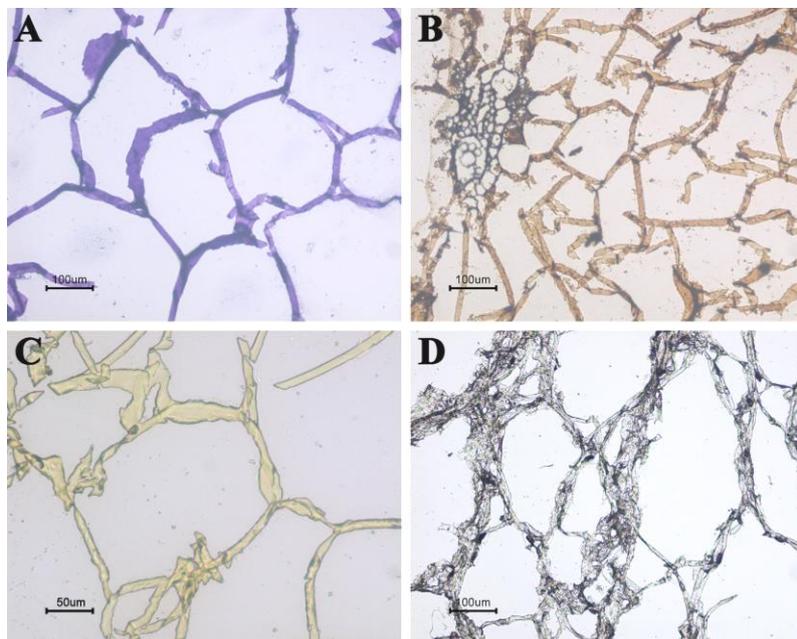


Figura IV.3.4. Secciones criostato de capa externa de cebolla 'Recas' observada por microscopía óptica con distintos agentes de tinción. A) Azul de toluidina. B) Permanganato potásico. C) Cloruro férrico. D) Vainillina-HCl.

Para comprobar la existencia de polifenoles en el interior celular, se someten muestras de cebolla a una atmósfera saturada de etanol. Como ya se ha explicado en capítulos anteriores, la aplicación de vapor de etanol es uno de los métodos de eliminación de astringencia del caqui (Kazuhiro y Kluge, 2009). Este método se basa en la activación de la enzima alcohol deshidrogenasa, que transforma el etanol en acetaldehído una vez éste ha penetrado en el tejido (Oshida et al., 1996). El acetaldehído formado puede reaccionar con los taninos solubles, conduciendo a su polimerización y, en consecuencia, insolubilizándolos (Ito, 1971). Teniendo esto en cuenta, resulta interesante comprobar si una atmósfera saturada de etanol promueve la precipitación de los compuestos fenólicos de la cebolla de manera análoga a la de los taninos en el caqui.

La Figura IV.3.4 presenta las imágenes obtenidas por Cryo-SEM y SEM de láminas longitudinales de 1 mm de espesor de cebollas 'Recas' sometidas a una atmósfera de etanol durante 24 horas. Al comparar la microestructura de la quinta capa carnosa (capa interna) de cebolla 'Recas' fresca (control) (Figura IV.3.5 A y B) con la misma capa sometida a una atmósfera de etanol durante 24 horas, se observa que el tratamiento con etanol genera una estructura en la que las células aparecen repletas de material insoluble (Figura IV.3.5 C y D). Esto mismo pero magnificado se puede apreciar en la segunda capa carnosa (capa externa) (Figura IV.3.5 E y F).

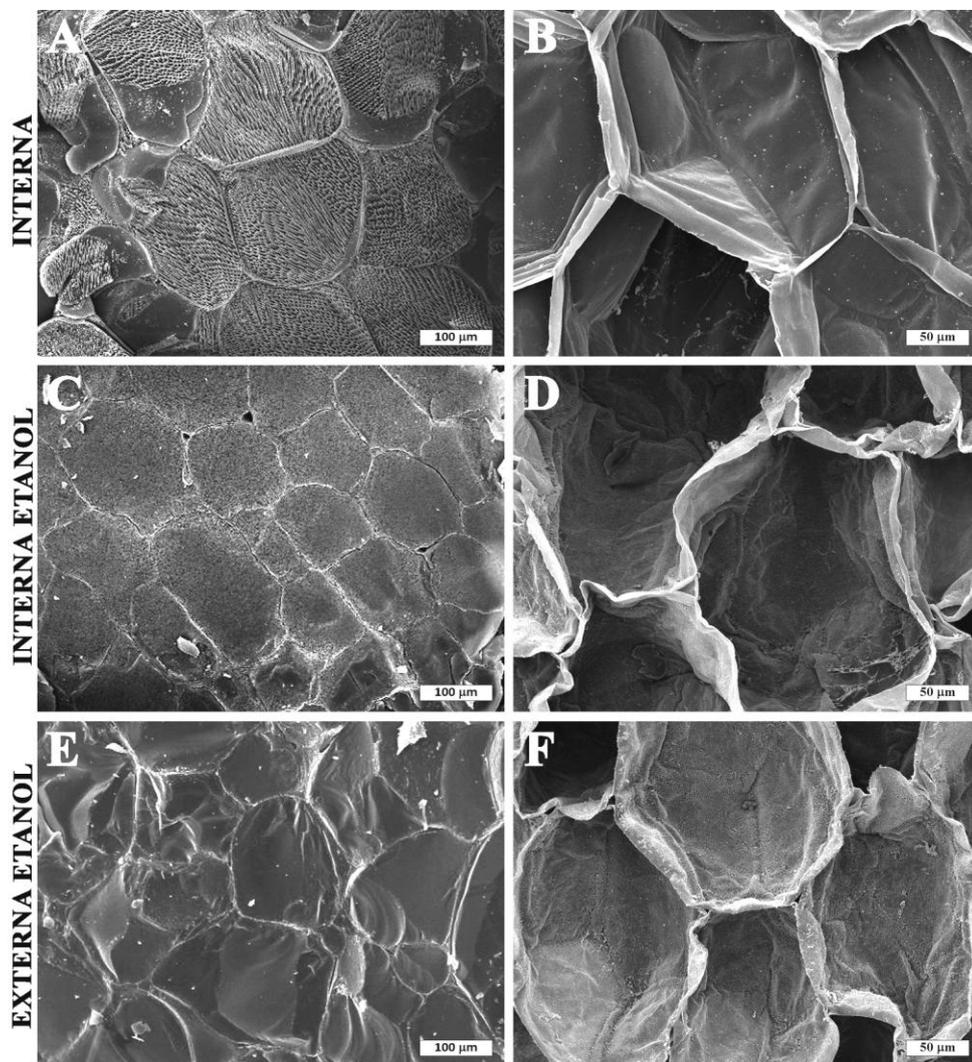


Figura IV.3.5. Cryo-SEM (A, C y E) y SEM (B, D y F). Microestructura de cebolla 'Recas'. A y B: Capa interna control, C y D: Capa interna con atmósfera de etanol y E y F: Capa externa con atmósfera de etanol.

De acuerdo con Shon et al. (2004), el contenido en fenoles totales en diversas variedades de cebolla está entre el 10.7 y el 13.3% en peso seco, lo que constituye un porcentaje importante del mismo. Por otra parte, numerosos estudios afirman que la distribución de los diferentes compuestos fenólicos en la cebolla no es uniforme. La quercetina constituye el 88% de los flavonoles de la cebolla (Lombard et al., 2005) y el 90% de la misma se encuentra en las dos primeras capas externas de la cebolla (Mizuno et al., 1992). El kaempferol, segundo compuesto fenólico en importancia también se encuentra mayoritariamente en las capas externas (Bilyk et al., 1984). Es

posible que estos compuestos fenólicos precipiten en el tejido de cebolla debido al tratamiento bajo atmósfera saturada de etanol, lo que podría explicar la mayor cantidad de precipitados, observados mediante Cryo-SEM, en las capas externas respecto a las capas internas. El tratamiento con etanol resultaría un método cualitativo de localización de compuestos fenólicos en cebolla.

b) Comparación entre variedades

A continuación se compara la microestructura y las propiedades texturales de una variedad de cebolla morada ('Figueres'), una amarilla ('Recas') y una blanca ('Doux') a fin de determinar la más adecuada para el posterior estudio con altas presiones hidrostáticas.

Las células epidérmicas observadas por SEM (Figura IV. 3.5) no muestran grandes diferencias entre las tres variedades, aunque en el caso de la variedad 'Figueres', estas parecen tener un borde más irregular y ser menos alargadas que en las variedades 'Recas' y 'Doux' (Figura IV.3.6 A, B y C). Al observar mediante Cryo-SEM (Figura IV.3.6 D, E y F) cortes transversales del tejido, las paredes celulares de las células epidérmicas muestran distinto espesor dependiendo de la variedad. De esta manera, el espesor en las variedades 'Figueres' y 'Recas' es similar (aproximadamente de 4.1 y 4.0 μm , respectivamente), mientras que en la variedad 'Doux' el espesor es menor (de aproximadamente 3.0 μm). En cuanto al parénquima, en la variedad 'Doux' se aprecian células de mayor tamaño y con mayores espacios intercelulares (Figura IV.3.6 G, H e I).

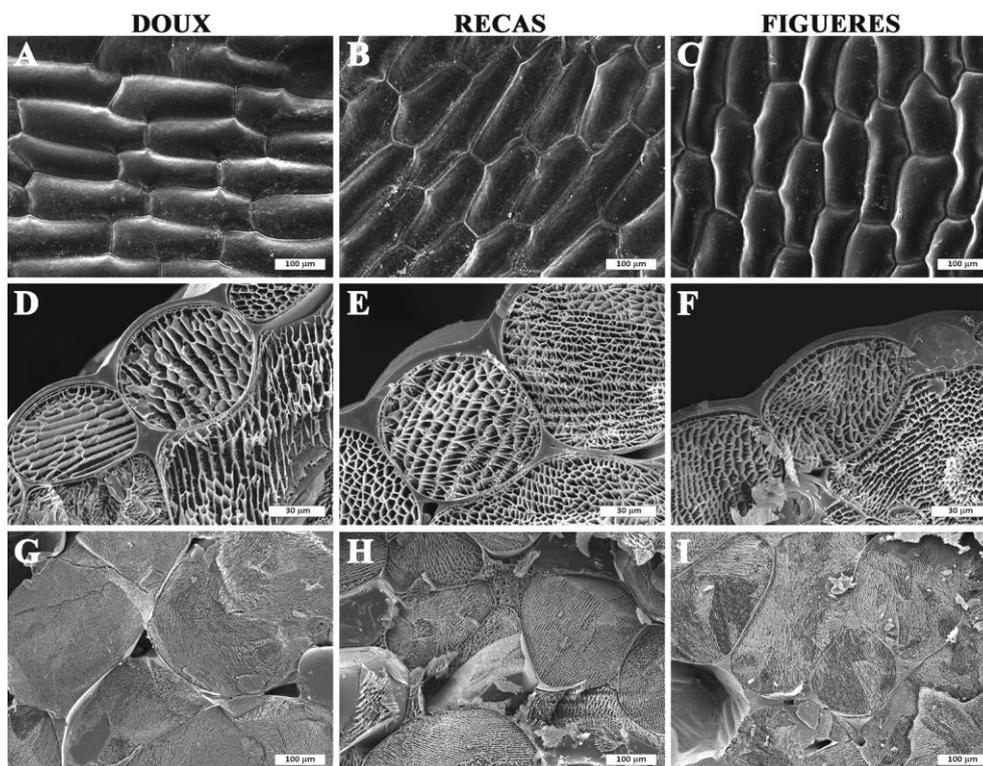


Figura IV.3.6. SEM y Cryo-SEM. Microestructura de cebolla ‘Doux’, ‘Recas’ y ‘Figueres’. Superficie de epidermis externa por SEM (A, B y C), corte transversal de epidermis externa por Cryo-SEM (D, E y F) y corte transversal de tejido parenquimático por Cryo-SEM (G, H e I).

Al tratar con atmósfera saturada de etanol distintas secciones longitudinales de capas externas e internas de las distintas variedades y observar posteriormente cortes transversales de dichas secciones mediante Cryo-SEM (Figura IV.3.7), se constata una presencia generalizada de precipitados en todos los tejidos. Tal y como ya se había observado anteriormente (Figura IV.3.5), se aprecia una mayor cantidad de material insoluble en las capas externas que en las internas. También se observan diferencias entre las variedades, ya que en la cebolla ‘Figueres’ hay una menor diferenciación celular y una mayor cantidad de precipitados que en las otras dos variedades.

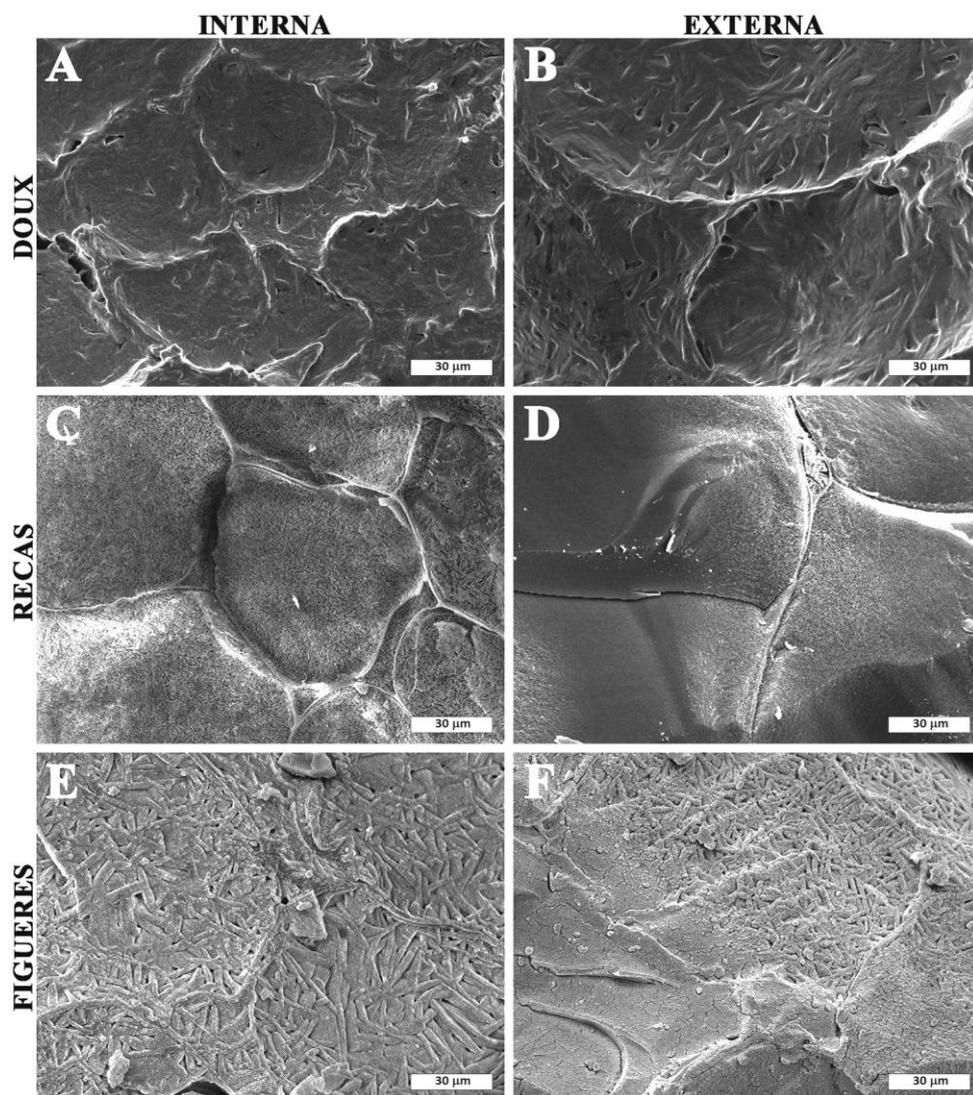


Figura IV.3.7. Cryo-SEM. Microestructura de capas interna y externa de cebolla ‘Doux’, ‘Recas’ y ‘Figueres’ con tratamiento en atmósfera saturada de etanol.

Diversos estudios realizados en distintas variedades de cebolla muestran diferencias en el contenido fenólico dependiendo de la variedad.. Prakash et al. (2007) compararon el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de variedades de cebolla verde, blanca, roja y violeta y sugirieron que las variedades rojas tenían los contenidos en quercetina y kaempferol más altos. Gorinstein et al. (2009) obtuvieron resultados similares, ya que concluyeron que las variedades rojas tenían el mayor contenido de compuestos bioactivos y la mayor actividad antioxidante. Gökçe et al. (2010) estudiaron la influencia del color en la capacidad antioxidante y en el contenido en

fenoles totales de nueve variedades comerciales y concluyeron que las variedades amarillas tenía el mayor contenido en fenoles totales pero que el grupo de variedades rojas tenía la mayor actividad antioxidante. No obstante, también concluyeron que es posible obtener actividades antioxidantes elevadas en variedades blancas y amarillas debido a su elevado contenido en quercetina y kaempferol.

Estos resultados podrían estar en concordancia con lo observado al tratar con atmósferas saturadas de etanol, ya que se observa una mayor concentración de precipitados en las variedades 'Figueres' y 'Recas' con respecto a la variedad 'Doux'.

IV.3.1.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES TEXTURALES

Para comparar las propiedades texturales de las distintas variedades de cebolla, se efectúa un ensayo de punción sobre distintas capas de la cebolla a fin de ver si existen diferencias de firmeza entre unas capas y otras. Las capas evaluadas son las capas primera, segunda y tercera (capas externas) y las capas quinta, sexta y séptima (capas internas). Al representar los resultados de firmeza obtenidos para las distintas capas y las tres variedades estudiadas (Figura IV.3.8 A), se observa que la firmeza va disminuyendo desde las capas externas a las internas en todas las variedades. La variedad 'Figueres' presenta la mayor firmeza en todas las capas con respecto a las otras dos variedades. La diferencia de firmeza entre las variedades podría estar relacionada con el grosor de la pared de las células epidérmicas. De acuerdo con la medición del grosor de las paredes de las células epidérmicas observadas por Cryo-SEM, en las variedades 'Figueres' y 'Recas' dicho espesor es similar (4.1 y 4.0 μm , respectivamente), mientras que en la variedad 'Doux' el espesor es menor (3.0 μm). Esto estaría en concordancia con los resultados de firmeza observados. En la variedad 'Doux' la diferencia de firmeza entre las capas externas e internas no es tan acusada como en las otras dos variedades. La variedad 'Doux' tiene menor firmeza en las capas externas pero mayor firmeza en las capas internas que la variedad 'Recas'.

Al igual que ocurre en la firmeza, la resistencia al corte en las capas externas es superior a la de las capas internas para todas las variedades (Figura IV.3.8 B). La variedad 'Recas' es la que mayor resistencia al corte presenta en las capas externas y sin embargo, es la de menor resistencia al corte en las capas internas. Por otra parte, la variedad 'Figueres' posee mayor resistencia al corte que la variedad 'Doux', tanto en las capas externas como en las internas.

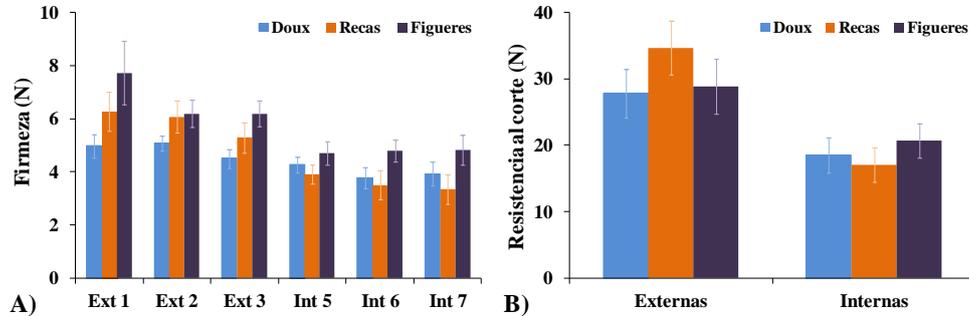
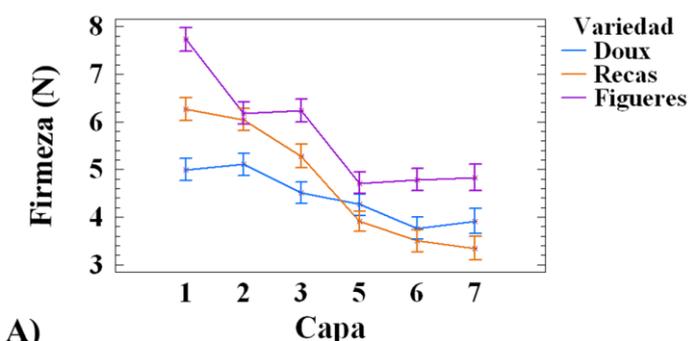


Figura IV.3.8. Propiedades texturales de cebolla 'Doux', 'Recas' y 'Figueres'. A) Firmeza. B) Resistencia al corte. Promedio de diez determinaciones con su desviación estándar.

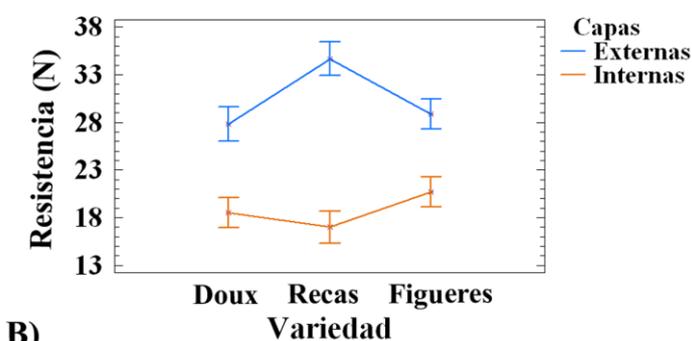
Se realiza un diseño de experimentos multifactorial categórico y un posterior análisis de la varianza para las variables firmeza y resistencia al corte. En ambos casos la interacción entre la variedad y las capas resulta significativa, es decir, la evolución de las propiedades texturales según la capa depende de la variedad estudiada. La firmeza de la variedad 'Doux' no varía tanto según la capa como en las otras dos variedades (Figura IV.3.9 A). En lo referente a la resistencia al corte, no hay diferencias significativas entre las variedades 'Doux' y 'Figueres' pero sí que existen entre estas variedades y la cebolla 'Recas' en las capas externas (Figura IV.3.9 B).

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



A)

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



B)

Figura IV.3.9. Gráficos de interacción significativa entre las capas y la variedad para la firmeza (A) y resistencia al corte (B) de cebolla considerando intervalos LSD.

Tras la caracterización de las distintas variedades, y debido a que a nivel estructural no se aprecian diferencias determinantes, se opta por realizar el estudio de APH con la cebolla ‘Recas’ debido a sus propiedades texturales (elevada firmeza y resistencia al corte) y su elevado contenido fenólico. Además, la cebolla ‘Recas’ se trata de una variedad de elevado consumo en España.

En la Tabla IV.3.1 se presentan las principales características fisicoquímicas de la cebolla ‘Recas’.

Tabla IV.3.1. Características fisicoquímicas de cebolla 'Recas'. Media \pm desviación estándar. SST: sólidos solubles totales.

	Cebolla 'Recas'
SST (°Brix)	7.40 \pm 0.53
L*	77.59 \pm 2.65
C*	15.67 \pm 2.43
h	-67.61 \pm 2.51
Firmeza (N)	6.29 \pm 0.63

Tal y como se ha comentado en el Apartado III.2, los tratamientos de APH que se aplican a la cebolla 'Recas' son 100, 250 y 400 MPa de presión durante 5 minutos a 25, 37.5 y 50 °C de temperatura. Estos tratamientos se presentan en la Tabla IV.3.2.

Tabla IV.3.2. Combinaciones de presión, temperatura y tiempo utilizadas en los tratamientos de APH para cebolla 'Recas'.

Tratamiento	Presión (MPa)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
T1	100	25	5
T2		37.5	
T3		50	
T4	250	25	
T5		37.5	
T6		50	
T7	400	25	
T8		37.5	
T9		50	

IV.3.2. ESTUDIO MICROESTRUCTURAL DE CEBOLLA ‘RECAS’ TRATADA CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

Para estudiar el efecto de las APH sobre la microestructura de cebolla variedad ‘Recas’ se analiza la segunda capa externa mediante diversas técnicas microscópicas.

IV.3.2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJAS TEMPERATURAS

Al aplicar un tratamiento de 100 MPa durante 5 minutos a 25 °C (Figura IV.3.10 A), no se observan cambios notables con respecto a la cebolla control (Figura IV.3.2). Sin embargo, al someter la cebolla a la misma presión pero a 37.5 °C (Figura IV.3.9 B), en el tejido celular se aprecian modificaciones, las paredes celulares se deforman y aparecen degradadas en algunas zonas, y las membranas celulares que comienzan a separarse de la pared celular presentan una especie de picaduras, probablemente porque empiezan a disolverse (Figura IV.3.10 B). Al aumentar la temperatura de tratamiento hasta 50 °C, la permeabilidad de las membranas y paredes celulares se ve afectada y algunos espacios intercelulares que estaban llenos de aire, son ocupados por material soluble procedente del interior celular (Figura IV.3.10 C).

Al tratar las muestras a 250 MPa y 25 °C (Figura IV.3.9 D) las células pierden turgencia, las paredes celulares se deforman por efecto de la presión, no se distinguen plasmalema y tonoplasto, y algunos espacios intercelulares aparecen llenos de material soluble. Al aplicar al tejido la misma presión a 37.5 °C (Figura IV.3.10 E), aumentan los espacios intercelulares anegados por material soluble. Cuando la presión se aplica a 50 °C (Figura IV.3.10 F), aparecen nuevas cavidades por efecto de la compresión/descompresión. Préstamo y Arroyo (1998) también describen la formación de nuevas cavidades en hojas de espinaca tratadas con 400 MPa durante 30 minutos a 5 °C. Al aumentar la temperatura de tratamiento con APH, se favorece la difusión de solutos desde el interior al exterior de las células, por lo que el artefacto eutéctico en el interior celular tiene menor densidad.

Al someter las muestras a 400 MPa (Figura IV.3.10 G, H y I), las modificaciones estructurales se aprecian magnificadas, la deformación celular y la separación entre células contiguas debido al efecto de la elevada presión es mayor. Además, los espacios intercelulares aparecen totalmente anegados de material soluble. La influencia de la temperatura de tratamiento es menos notable debido a la elevada presión aplicada.

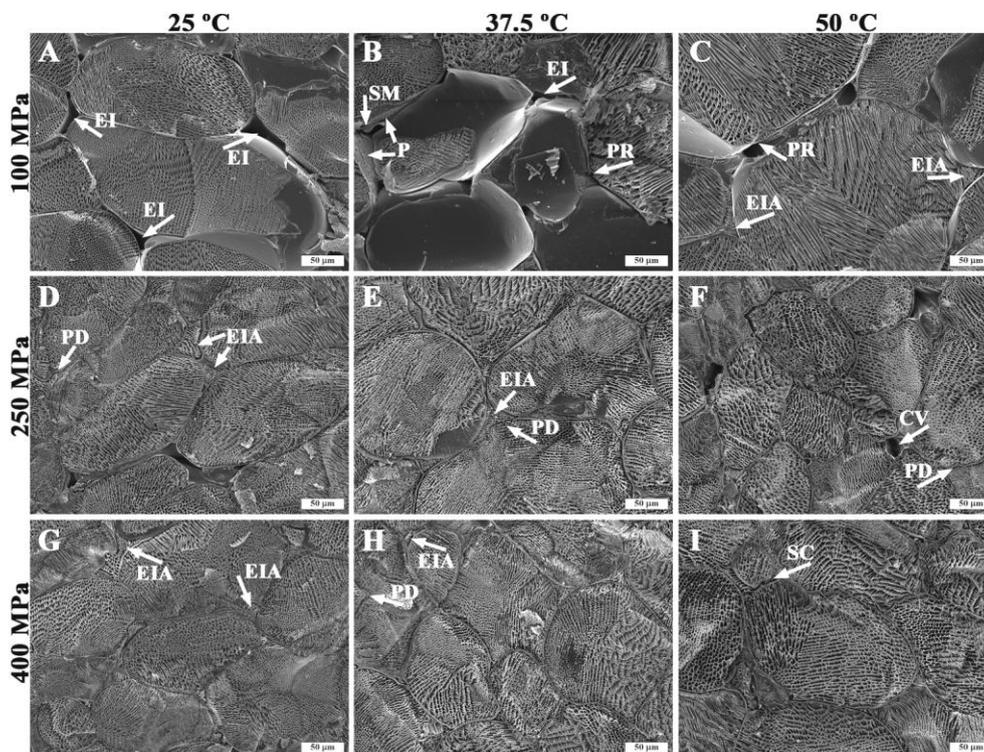


Figura IV.3.10. Cryo-SEM. Microestructura de cebolla tratada con altas presiones hidrostáticas durante 5 minutos (100, 250 y 400 MPa a 25, 37.5 y 50 °C). EI: espacio intercelular; SM: separación de membrana; PR: pared celular rota; P: picaduras; EIA: espacio intercelular anegado; PD: pared celular deformada; CV: nueva cavidad; SC: separación entre células.

Por lo tanto, parece que el tratamiento de la cebolla con APH facilita la difusión de material soluble desde el interior al exterior de las células, tal y como también se observa en el caqui (Apartados IV.1 y IV.2).

IV.3.2.2. MICROSCOPIA ÓPTICA

Al observar las muestras mediante microscopía óptica o LM (Figura IV.3.10), las células del tejido de las muestras control aparecen redondeadas, íntimamente unidas y homogéneamente teñidas (Figura IV.3.11 A). Las células de la epidermis y las capas contiguas se ven llenas de material soluble (Figura IV.3.11 B).

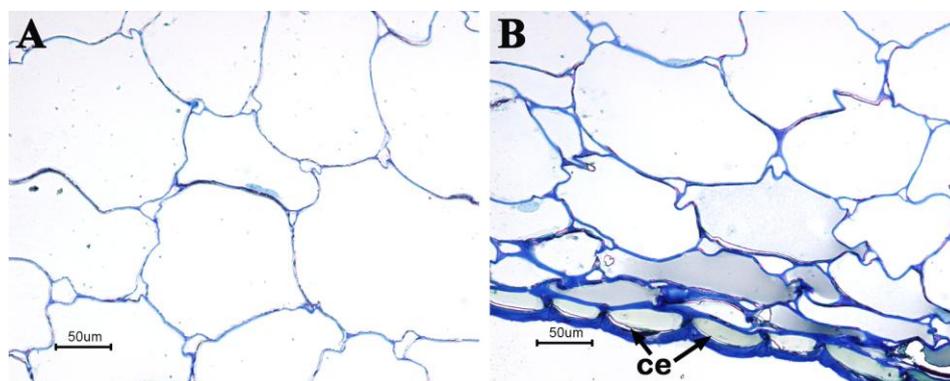


Figura IV.3.11. Microscopía óptica. Microestructura de cebolla no tratada. ce: célula epidérmica.

En la Figura IV.3.11 se muestran las imágenes obtenidas por LM de cebolla variedad ‘Recas’ tratada con APH durante 5 minutos. En las muestras tratadas a 100 MPa (Figura IV.3.12 A, B y C), las células aparecen más deformadas y alargadas que en el tejido no tratado (Figura IV.3.11). En algunas zonas, donde la tinción con azul de toluidina es más tenue, se observa degradación de las paredes celulares. A 100 MPa y 50 °C se produce la pérdida parcial del contenido celular de las células epidérmicas y las células parenquimáticas más cercanas a la epidermis por el efecto combinado de la compresión y del aumento de difusividad de los solutos al aumentar la temperatura.

En las muestras tratadas a 250 MPa y 25 °C (Figura IV.3.12 D), se puede apreciar como algunas membranas se separan de la pared celular o aparecen rotas, debido al efecto de la presión. Al tratar a 37.5 °C (Figura IV.3.12 E) las células aparecen más deformadas. Al aumentar la temperatura de tratamiento a 50 °C (Figura IV.3.12 F) las membranas ya aparecen muy degradadas. A esta presión de tratamiento (250 MPa), las células epidérmicas pierden su contenido conforme aumenta la temperatura de tratamiento.

Al tratar las muestras a 400 MPa (Figura IV.3.12 G, H y I), ya no se observa material soluble en el interior de las células epidérmicas a ninguna de las temperaturas de tratamiento. Las células están deformadas, con las paredes celulares sinuosas debido al efecto de la presión, sobre todo a altas temperaturas de tratamiento (Figura IV.3.12 H y I). Las paredes aparecen menos teñidas que en los tratamientos anteriores, indicando solubilización del material constituyente de las mismas. Las paredes y membranas celulares tienden a separarse y romperse conforme aumenta la temperatura de tratamiento.

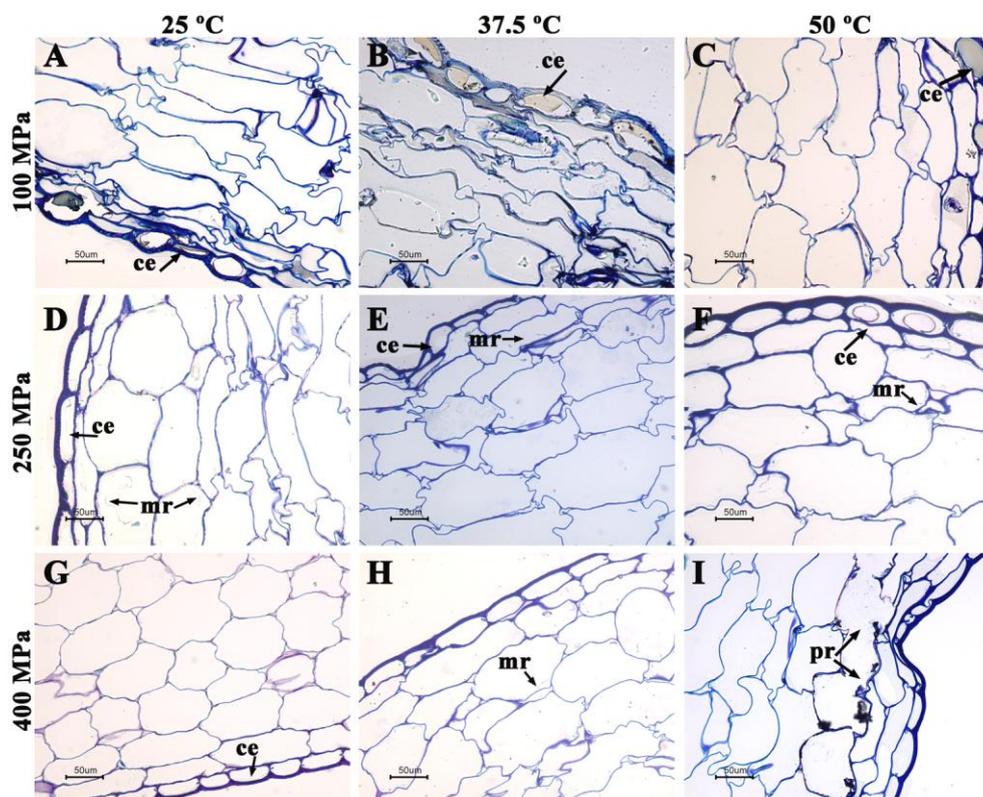


Figura IV.3.12. Microscopía óptica. Microestructura de cebolla tratada con altas presiones hidrostáticas durante 5 minutos (100, 250 y 400 MPa a 25, 37.5 y 50 °C). ce: célula epidérmica; mr: membrana rota; pr: pared celular rota.

Las imágenes obtenidas por LM de cebolla control y tratada con APH a 100 y 400 MPa y 50 °C durante 5 minutos se observan en la Figura IV.3.12. Al teñir con cloruro férrico, un agente de tinción específico para compuestos fenólicos, las células epidérmicas, del tejido de cebolla sin tratar o control (Figura IV.3.12 A) aparecen repletas de material soluble, lo que parece indicar que tienen un elevado contenido en polifenoles. Al aplicar 100 MPa a 50 °C (Figura IV.3.13 B), una gran proporción de las células epidérmicas aparecen vacías, probablemente porque se produce difusión del material soluble hacia el apoplasto, fenómeno que se acentúa al incrementar la presión del tratamiento con APH (Figura IV.3.13 C).

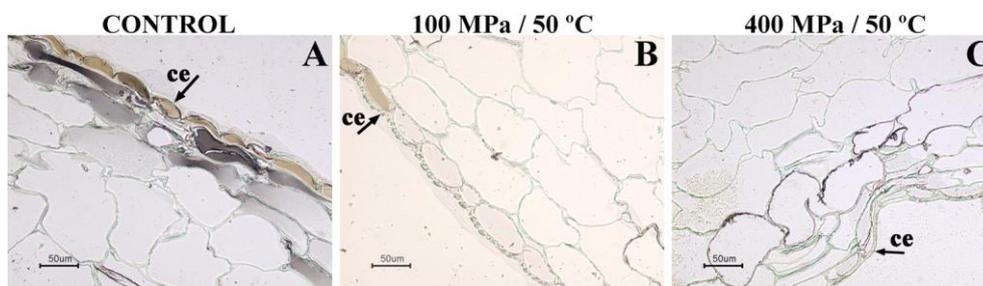


Figura IV.3.13. Microscopía óptica. Microestructura de cebolla fresca y cebolla tratada con 100 y 400 MPa a 50 °C durante 5 minutos. ce: célula epidérmica.

IV.3.2.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para un estudio más detallado del efecto de las APH sobre las paredes y membranas celulares del tejido de cebolla se emplea la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes obtenidas se muestran en las Figuras IV.3.13 y 14.

La cebolla no tratada (control) (Figura IV.3.13 A y B) presenta paredes celulares homogéneamente teñidas con un buen empaquetamiento de las fibrillas de celulosa (Figura IV.3.14 A). El plasmalema o membrana celular se observa íntimamente unido a la pared celular y el tonoplasto muy próximo al plasmalema (Figura IV.3.14 B).

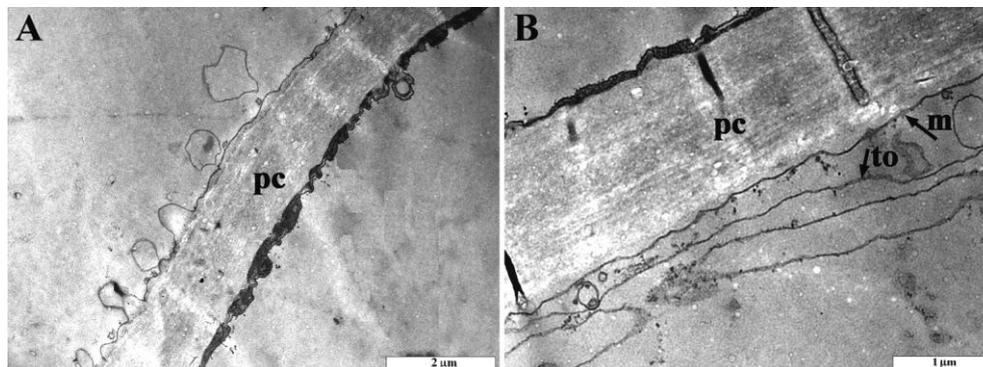


Figura IV.3.14. Microscopía electrónica de transmisión. Microestructura de cebolla no tratada. pc: pared celular; m: membrana celular (plasmalema); to: tonoplasto.

Al procesar con 100 MPa y 25 °C (Figura IV.3.15 A), se puede observar como las paredes celulares se mantienen en buen estado, tal y como se ha comprobado por Cryo-SEM y LM (Figura IV.3.10 y 11). No obstante, al aumentar la temperatura de tratamiento (100 MPa y 50 °C) (Figura IV.3.15 B), el plasmalema o membrana celular aparece separado de la pared celular y roto en algunas zonas, lo que favorecería la difusión de material soluble desde el interior celular hacia el apoplasto. Al aumentar la presión de tratamiento el daño en las paredes celulares se hace más evidente. Así, al tratar con 400 MPa a 25 °C (Figura IV.3.13 C) se observan paredes celulares con

bordes deformados y difuminados, y la membrana celular totalmente rota. Las paredes celulares aparecen más tenuemente teñidas, indicando disolución del material que constituye la pared celular. A esta presión, el material de las paredes se va disolviendo conforme la temperatura de tratamiento es mayor. De esta manera, con 400 MPa a 50 °C (Figura IV.3.13 D), las paredes están totalmente disueltas permitiendo el paso del contenido celular hacia el apoplasto.

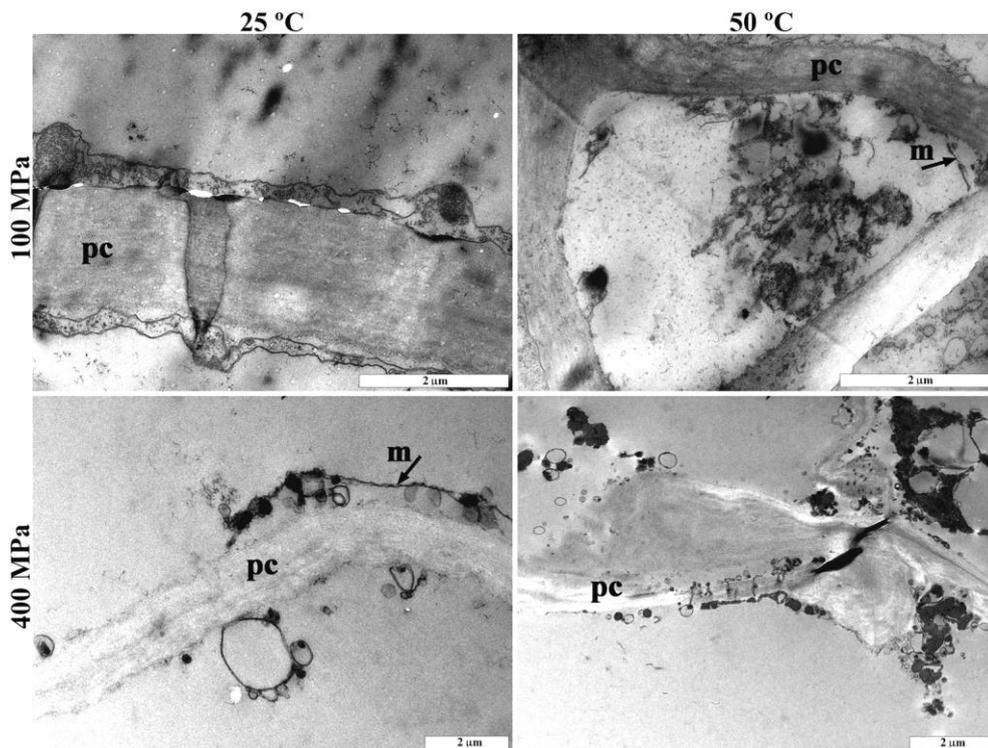


Figura IV.3.15. Microscopía electrónica de transmisión. Microestructura de cebolla tratada con altas presiones hidrostáticas durante 5 minutos (100 y 400 MPa a 25 y 50 °C). pc: pared celular; m: membrana.

IV.3.3. ESTUDIO FÍSICOQUÍMICO DE CEBOLLA 'RECAS' TRATADA CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

IV.3.3.1. CONTENIDO EN FENOLES SOLUBLES TOTALES

El contenido en fenoles solubles totales (FST) se mantiene en valores similares o superiores al de la muestra control tras los tratamientos de APH (Figura IV.3.16). El tratamiento con 100 MPa a 25 o 37.5 °C no afecta significativamente ($P > 0.05$) al contenido en FST. No obstante, al aumentar la temperatura de tratamiento a 50 °C sí que se observa un aumento significativo ($P < 0.05$) en el contenido en FST, probablemente debido a que las elevadas temperaturas favorecen la difusión de solutos.

A medida que aumenta la presión de tratamiento, el contenido en FST aumenta significativamente ($P < 0.05$) para todas las temperaturas estudiadas. Parece que las APH podrían favorecer la extractabilidad de compuestos fenólicos. Esto se atribuye a la rotura de paredes y membranas celulares ocasionada por la aplicación de APH, que facilita la difusión de los compuestos solubles, entre los que se encuentran los compuestos fenólicos libres. Además, tal y como se ha comentado en el Apartado IV.3.1.1, parte del contenido fenólico se localiza en las paredes celulares del tejido vegetal (Harbaum, 2007) y las APH producen disolución de las paredes celulares y difusión de sus constituyentes. Roldán-Marín et al. (2009) en sus estudios de cebolla tratada con APH a 400 MPa y 5 °C sugieren que el aumento en el contenido en fenoles totales y flavonoides puede deberse a que las APH favorecen la extracción de los polifenoles asociados a la pared celular.

El mayor valor de contenido en FST se obtiene al aplicar 400 MPa a 25 °C, por lo que la combinación de baja temperatura (25 °C) y presión alta (400 MPa) parece ser la más indicada para incrementar la extractabilidad de compuestos fenólicos.

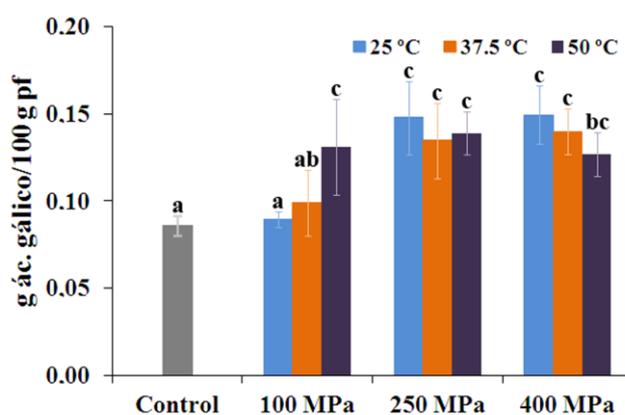


Figura IV.3.16. Contenido en fenoles solubles totales de cebolla 'Recas' con distintos tratamientos de APH. Promedio de seis determinaciones con su desviación estándar. Los valores sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$).

Aunque el parámetro temperatura parece influir más en el contenido en FST cuando se trata a bajas presiones (100 MPa) que cuando se trata a altas presiones (250 y 400 MPa), el análisis multifactorial de la varianza para el contenido en FST indica que la interacción entre los factores presión y temperatura no es estadísticamente significativa ($P > 0.05$). Sí lo es, en cambio, el efecto simple de la presión, ya que se obtienen valores de FST superiores al incrementar la presión del tratamiento (Figura IV.3.17).

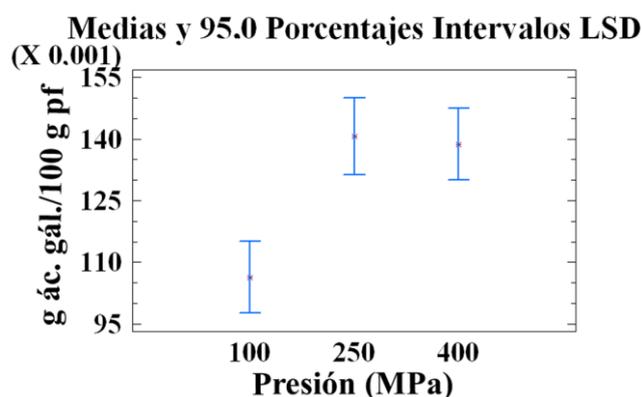


Figura IV.3.17. Gráfico de efecto simple de la presión para el contenido en fenoles solubles totales de cebolla 'Recas' considerando intervalos LSD.

IV.3.3.2. PORCENTAJE DE PROTEÍNA SOLUBLE

Tal y como se muestra en la Figura IV.3.18, los tratamientos con APH a 100 MPa no tienen un efecto estadísticamente significativo ($P > 0.05$) en el porcentaje de proteína soluble (PPS) cuando se trata a 25 °C y 37.5 °C pero sí que lo tienen ($P < 0.05$) cuando se trata a 50 °C. El PPS aumenta al tratar con 250 y 400 MPa. De esta manera, los valores más elevados de PPS se obtienen tratando con 400 MPa a 37.5 °C. La temperatura de tratamiento no tiene efecto significativo ($P > 0.05$) en el PPS cuando se aplican 250 o 400 MPa.

Tal y como ya se ha comentado en apartados anteriores, la presión afecta a la permeabilidad de las membranas y paredes celulares y puede incluso provocar la rotura de las mismas. Estas alteraciones en el tejido podrían favorecer el contacto y las interacciones entre las proteínas de las membranas y las sustancias pécticas de la pared celular. De esta manera debido al tratamiento con APH podrían formarse complejos iónicos solubles (Galazka et al., 1996; Dickinson y James, 2000), que explicarían el aumento del PPS observado.

IV. Resultados y Discusión

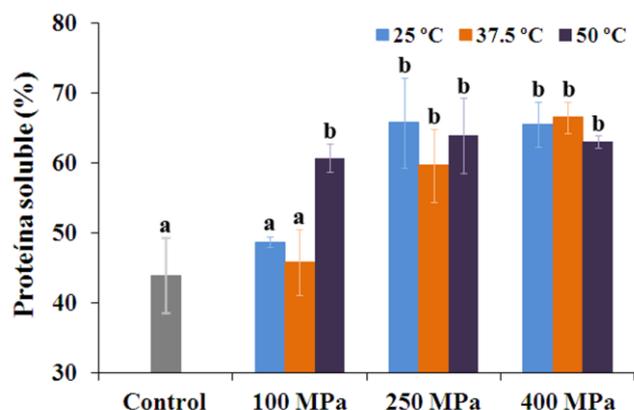


Figura IV.3.18. Porcentaje de proteína soluble de cebolla 'Recas' con distintos tratamientos de APH. Promedio de tres determinaciones con su desviación estándar. Los valores sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$).

El análisis de la varianza del diseño multifactorial categórico para la variable PPS indica que existe una interacción estadísticamente significativa entre la presión y la temperatura aplicadas. Mientras que a 25 y 37.5 °C el PPS aumenta al elevar la presión aplicada, al tratar a 50 °C se obtienen valores elevados independientemente de la presión (Figura IV.3.19).

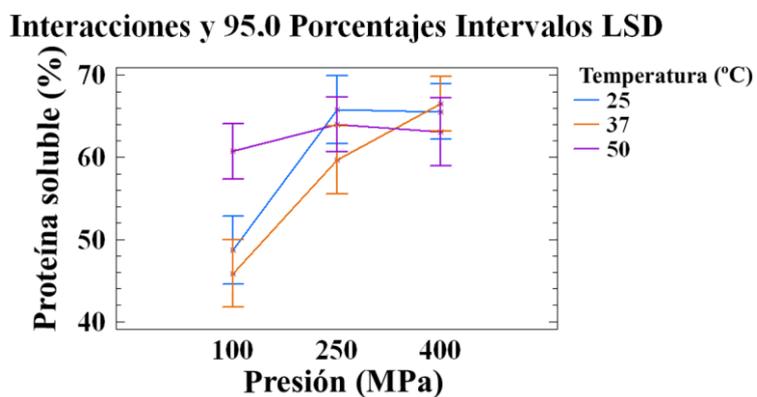


Figura IV.3.19. Gráficos de interacción significativa entre presión y temperatura de tratamiento para el porcentaje de proteína soluble de cebolla 'Recas' considerando intervalos LSD.

IV.3.3.3. COLOR

En la Figura IV.3.19 se presentan los valores de luminosidad (L^*), croma (C^*) y tono (h) de cebollas 'Recas' tratadas con APH durante 5 minutos. En la Figura IV.3.20 A se observa que tratando con 100 MPa los valores de L^* no varían con respecto a la cebolla control, pero al aplicar presiones mayores tiene lugar un descenso significativo ($P < 0.05$) de estos valores. Tal y como ocurría en el caqui (Apartado IV.1.2.3), esto podría deberse a un aumento de la actividad de las enzimas polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD) que son las responsables del pardeamiento y de la pérdida de luminosidad. El daño inducido por la presión en paredes y membranas celulares, facilita el contacto enzima-sustrato (Rastogi et al., 2007), con lo que al aplicar presiones relativamente elevadas (250-400 MPa), se podría favorecer el pardeamiento.

De acuerdo al análisis de la varianza del diseño multifactorial categórico para la variable L^* , la interacción entre la presión y la temperatura de tratamiento es estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Mientras que a 100 y 400 MPa no existen diferencias significativas al variar la temperatura de tratamiento, al tratar con 250 MPa a 37.5 °C se obtiene el valor más bajo de L^* , siendo significativamente menor ($P < 0.05$) a los obtenidos en el resto de tratamientos (Figura IV.3.20 B). Esto podría indicar que al tratar a 250 MPa y 37.5 °C las enzimas responsables del pardeamiento en la cebolla se encontrarían en las condiciones más favorables de entre todas las estudiadas para desencadenar el mecanismo de pardeamiento.

Por lo que respecta al parámetro C^* , indicador de la intensidad y pureza del color, su valor disminuye significativamente ($P < 0.05$) con respecto a la cebolla control al tratar con 250 MPa a 37.5 y 50 °C (Figura IV.3.20 C). El análisis multifactorial categórico para este parámetro indica que la interacción entre la presión y la temperatura es significativa ($P < 0.05$). Mientras que al tratar a 25 o 50 °C el valor de C^* no varía significativamente ($P > 0.05$) independientemente de la presión aplicada, al tratar a 37.5 °C el valor de C^* aumenta al aplicar 100 MPa y disminuye al aplicar 250 MPa con respecto al resto de tratamientos (Figura IV.3.20 D).

El valor de h no varía al tratar a 100 MPa y aumenta significativamente ($P < 0.05$) al tratar a presiones superiores (Figura IV.3.20 E). Esto se debería, principalmente a un descenso del valor del parámetro b^* por una pérdida del componente amarillo al tratar a 250 y 400 MPa. El análisis multifactorial categórico para la variable h indica que únicamente es significativo ($P < 0.05$) el efecto simple de la presión (Figura IV.3.20 F).

IV. Resultados y Discusión

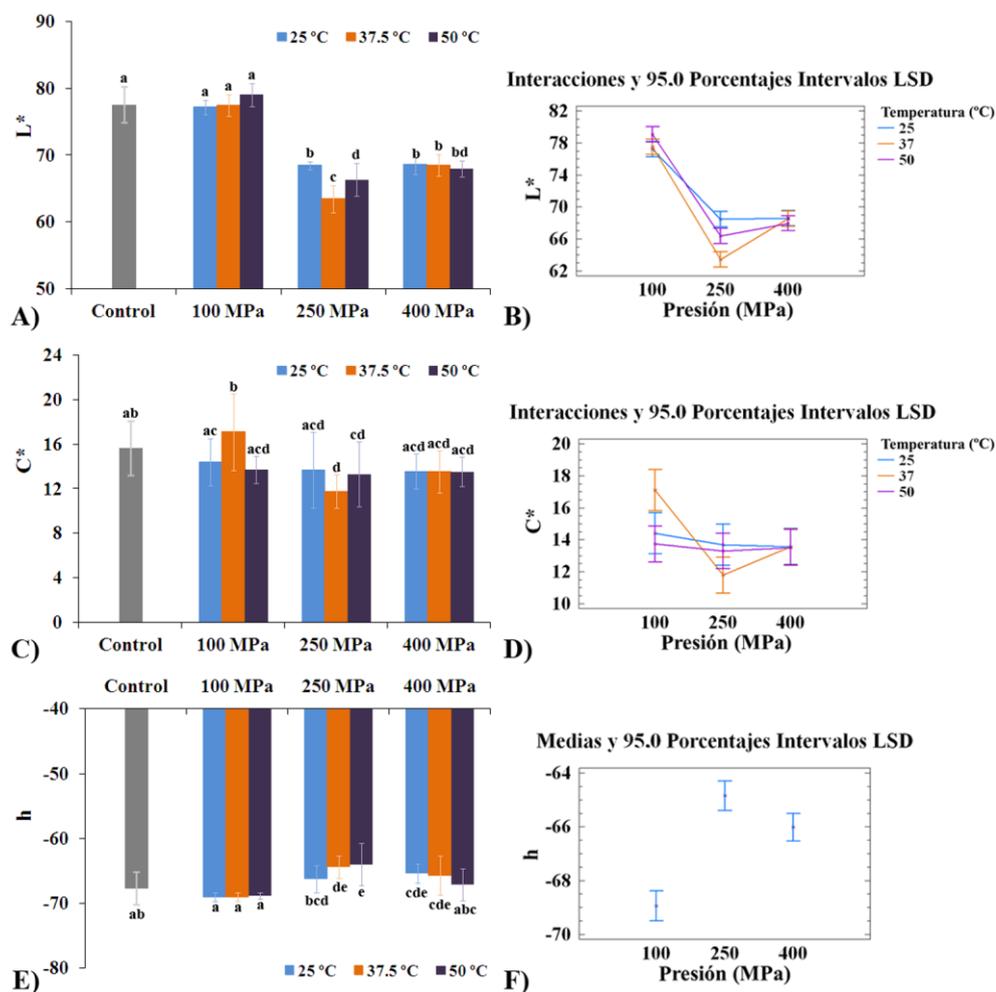


Figura IV.3.20. A), D) y E): Valores de L*, C* y h de cebolla ‘Recas’ con distintos tratamientos de APH. Promedio de diez determinaciones con su desviación estándar. Los valores sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$). B), D) y F): Gráficos de interacciones y de efectos simples significativos para las variables respuesta L*, C* y h considerando intervalos LSD.

En la Figura IV.3.21 se presentan, a modo de ejemplo, una muestra tratada con 100 MPa a 25 °C (T1) y otra muestra tratada con 250 MPa y 37.5 °C (T5), visiblemente más pardeada.



Figura IV.3.21. Cebolla ‘Recas’ tratada con 100 MPa a 25 °C (T1) y con 250 MPa a 37.5 °C (T5).

IV.3.3.4. PROPIEDADES TEXTURALES

En la Figura IV.3.22 se muestra como varía en cebolla variedad ‘Recas’ la firmeza y la resistencia al corte en función de las presiones y temperaturas aplicadas de APH. En general, los valores de firmeza y de resistencia al corte al tratar con 100 MPa no varían con respecto a la cebolla control. No obstante, al tratar con 250 y 400 MPa los valores de firmeza y resistencia al corte aumentan significativamente ($P < 0.05$). Esto puede deberse a que, tal y como indica Knorr (1995) al aplicar presiones superiores a 200 MPa en frutas y vegetales, tiene lugar la rotura de membranas celulares que provocan una pérdida de turgor y la consecuente liberación del contenido celular. Los espacios intercelulares se llenan de líquido y aumenta así la resistencia del tejido degradado. La resistencia que opone el tejido con los intersticios completamente anegados es superior a la 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, de manera similar a los resultados obtenidos por Basak y Ramaswamy (1998) al aplicar presiones entre 100 y 400 MPa en diversas frutas y verduras. A 100 MPa, la firmeza toma valores similares a los de la muestra control, debido a que todavía los espacios intercelulares no se encuentran totalmente anegados. Por otra parte, debido a la ruptura celular provocada por las altas presiones se facilita las reacciones enzimáticas. Sustratos, iones y enzimas que se encuentran en diferentes compartimentos de las células pueden liberarse e interactuar unos con otros como consecuencia del tratamiento con APH (Oey et al., 2008). De acuerdo con Stute et al. (1996), la enzima pectinametiltransferasa (PME), asociada a la pared celular en el tejido intacto, puede ser liberada durante el tratamiento de APH y desmetoxilar las pectinas, dando lugar a ácidos pécticos que tienen la capacidad de formar una red tipo gel con iones divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} , lo cual aumentaría la firmeza del tejido. De acuerdo con Arslan y Özcan (2010), la cebolla fresca contiene aproximadamente 69.54 y 3.3 mg/kg de Ca^{2+} y Mg^{2+} , respectivamente, por lo que también podría atribuirse a este fenómeno el fortalecimiento de la estructura.

IV. Resultados y Discusión

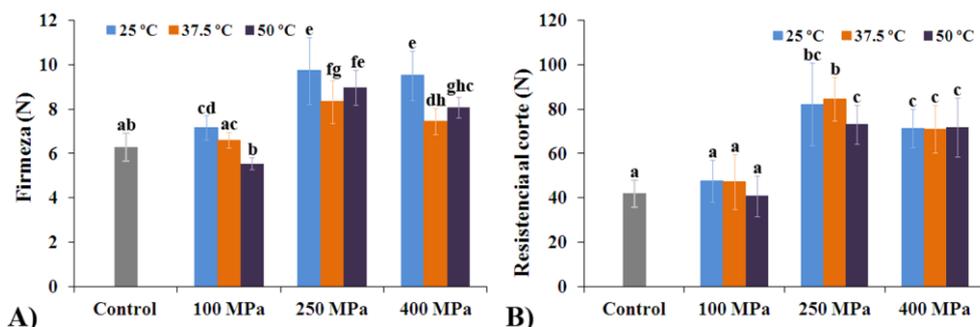
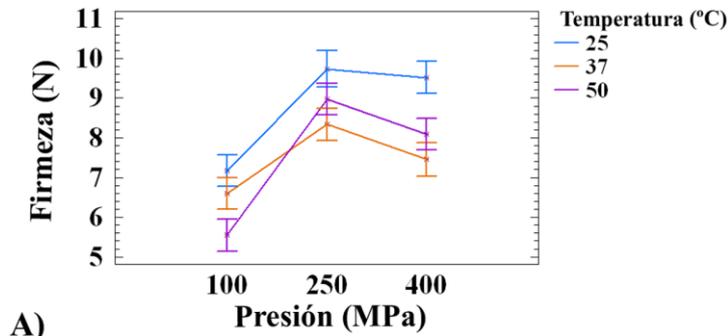
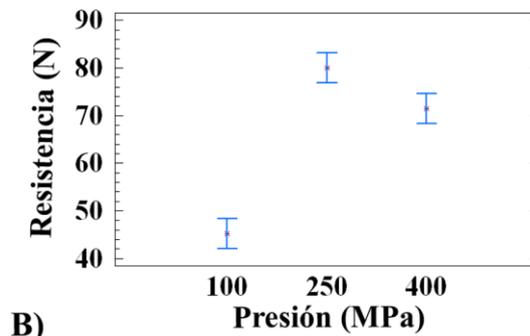


Figura IV.3.22. Valores de firmeza (A) y resistencia al corte (B) de cebolla ‘Recas’ con distintos tratamientos de APH. Promedio de ocho determinaciones con su desviación estándar. Los valores sin letra en común tienen diferencias significativas ($P < 0.05$).

El análisis de la varianza para la firmeza indica que la interacción entre presión y temperatura de tratamiento es significativa ($P < 0.05$). Al tratar a 25 °C se obtienen los valores más altos de firmeza en comparación con las otras temperaturas estudiadas, independientemente de la presión aplicada. Sin embargo, al tratar a 100 MPa, el valor más bajo se obtiene al tratar a 50 °C, mientras que al resto de presiones estudiadas, los valores menores se obtienen tratando a 37.5 °C (Figura IV.3.23 A). En cambio, para la variable de resistencia al corte, el análisis multifactorial de la varianza indica que sólo el efecto simple de la presión es significativo ($P < 0.05$). Ya que tratando con 250 y 400 MPa los valores de resistencia al corte son significativamente superiores ($P < 0.05$) a los que presentan las muestras tratadas con 100 MPa (Figura IV.3.23 B).

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD

A)

Medias y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD

B)

Figura IV.3.23. Gráficos de interacción y de efecto simple significativos para la firmeza (A) y la resistencia al corte (B) de cebolla 'Recas' considerando intervalos LSD.

IV.3.4. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRESIÓN Y TEMPERATURA DEL TRATAMIENTO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS PARA CEBOLLA 'RECAS'

En este apartado se determinan las condiciones de presión y temperatura más adecuadas a fin de obtener cebolla 'Recas' tratada con APH con atributos de calidad atractivos, sin disminuir el contenido de algunos componentes nutricionales de interés. Para ello, se emplea un diseño de experimentos multinivel factorial con tres niveles de presión (100, 250 y 400 MPa) y tres de temperatura (25, 37.5 y 50 °C). El análisis de la varianza de dicho diseño permite obtener las superficies respuesta de las variables analizadas y las condiciones óptimas para cada parámetro. En función de estos resultados se elige el tratamiento o tratamientos más adecuados para realizar el estudio de vida útil de cebolla tratada con APH. Se consideran como parámetros más relevantes el contenido en FST y el PPS, que interesa sean lo más elevados posible, y los parámetros de luminosidad y firmeza que deben ser lo más parecidos posible a la cebolla control. Como la luminosidad disminuye al aplicar APH y la firmeza aumenta,

IV. Resultados y Discusión

interesa encontrar el máximo y el mínimo, respectivamente, de los valores de las muestras tratadas.

En la Figura IV.3.24 se presentan los gráficos de superficie de respuesta obtenidos en el análisis de la varianza de las variables mencionadas.

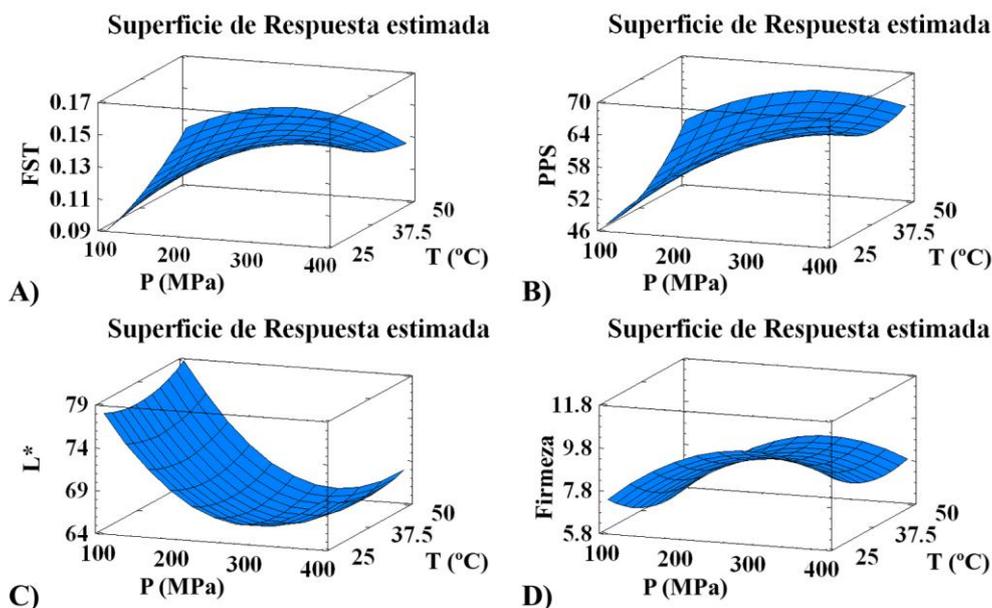


Figura IV.3.24. Gráficos de superficie de respuesta de las variables fenoles solubles totales (A), porcentaje de proteína soluble (B), luminosidad (C) y firmeza (D) en función de la presión y temperatura aplicadas en el tratamiento de APH.

En la Tabla IV.3.3 se presentan los valores óptimos de presión y temperatura para estos parámetros obtenidos a partir del análisis de la varianza.

Tabla IV.3.3. Valores óptimos obtenidos y condiciones de presión y temperatura a las que se obtienen para las principales características fisicoquímicas de cebolla 'Recas' tratada con altas presiones hidrostáticas.

Parámetro	Objetivo	Óptimo	Presión (MPa)	Temperatura (°C)
Fenoles Solubles Totales	Máximo	0.15 (g ác. gálico/100 g pf)	389.97	25.00
Proteína soluble	Máximo	68.29%	400	25.00
L*	Máximo	78.89	100	43.92
Firmeza	Mínimo	5.81 (N)	100	50.00

En función de los resultados obtenidos, se decide aplicar los tratamientos T3 y T7 (100 MPa / 50 °C y 400 MPa / 25 °C, respectivamente) para el posterior estudio de la vida útil de cebolla tratada con APH. El tratamiento con 400 MPa a 25 °C es el que proporciona unos datos más altos de contenido en FST y PPS, lo que interesa de cara a una posible mejora de las propiedades nutricionales de la cebolla. Por otra parte, también se elige el tratamiento con 100 MPa a 50 °C para el estudio de la vida útil ya que es el que mantiene unas propiedades físicas más parecidas a la cebolla control en cuanto a luminosidad y firmeza y además aumenta el contenido en FST y el PPS con respecto al control. A modo de resumen, en el esquema de la Figura IV.3.25 se resalta de amarillo la variedad de cebolla y las condiciones de los tratamientos de APH seleccionados para el estudio de vida útil de cebolla tratada con APH.

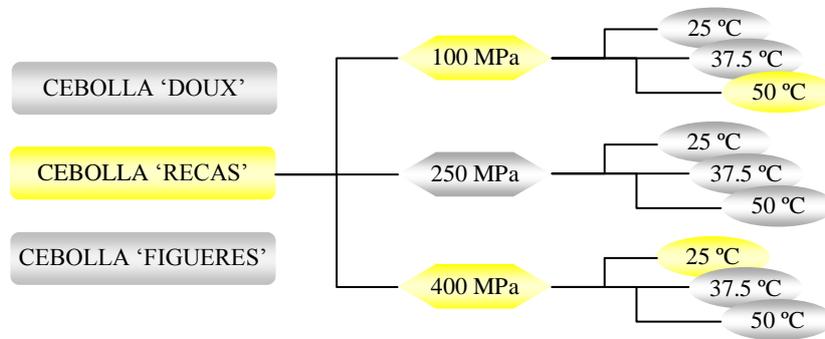


Figura IV.3.25. Variedad de cebolla y tratamientos de altas presiones seleccionados (amarillo) para el estudio de vida útil de cebolla tratada con altas presiones hidrostáticas.

IV. 4. EVALUACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE CEBOLLA ‘RECAS’ TRATADA CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

Tal y como se ha comentado en el Apartado IV.3.4, se realiza el estudio de la vida útil de cebolla variedad ‘Recas’ tratada con APH aplicando dos combinaciones distintas de presión y temperatura. Para ello, las cebollas se almacenan en refrigeración (4 °C) a lo largo de 4 semanas. En las Tablas IV.4.1 y IV.4.2 se muestran las características fisicoquímicas de la cebolla empleada en el estudio y las condiciones de los tratamientos de APH aplicados, respectivamente.

Tabla IV.4.1. Características fisicoquímicas de la cebolla ‘Recas’ empleada para el estudio de la vida útil. Valores promedio con su desviación estándar.

	Cebolla ‘Recas’
SST (°Brix)	7.40 ± 0.53
L*	75.13 ± 1.89
C*	13.07 ± 1.59
h	-70.26 ± 1.01
Firmeza (N)	6.29 ± 0.63

Tabla IV.4.2. Condiciones de los tratamientos de altas presiones aplicados para el estudio de vida útil.

Tratamiento	Presión (MPa)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
T1	100	50 °C	5
T2	400	25 °C	5

IV.4.1. ESTUDIO MICROESTRUCTURAL

IV.4.1.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJAS TEMPERATURAS

La observación de las muestras de cebolla tratada y no tratada mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (Cryo-SEM) permite comprobar que ambos tratamientos de APH (100 MPa a 50 °C y 400 MPa a 25 °C durante 5 minutos) producen diferencias estructurales con respecto a la cebolla no tratada (control) durante todo el periodo de almacenamiento. En la Figura IV.4.1 se presentan las imágenes obtenidas por Cryo-SEM de cebolla control y tratada con APH. Inmediatamente después del tratamiento (D0) con 100 MPa a 50 °C (Figura VI.4.1 B), la cebolla ya presenta sus espacios intercelulares llenos de material soluble. Parece que

a esta temperatura se favorece la difusión del contenido celular, sin embargo en la cebolla sin tratar los espacios intercelulares están llenos de aire (Figura IV.4.1 A). Al tratar la cebolla con 400 MPa a 25 °C (Figura IV.4.1 C) también se observan los espacios intercelulares anegados, y además el tejido está muy dañado debido a la elevada presión aplicada, observándose cierta separación entre las células vecinas (Figura IV.4.1 C). Tras dos semanas de almacenamiento (D14), la cebolla no tratada (Figura IV.4.1 D) presenta algunos espacios intercelulares con líquido, probablemente debido a la degradación que experimenta el tejido durante el almacenamiento, y las cebollas tratadas con APH muestran prácticamente todos los espacios intercelulares anegados. Cuando la cebolla se trata con APH a 100 MPa (Figura IV.4.1 E) se puede apreciar un aumento de la porosidad en la pared y en las membranas celulares, probablemente promovida por la combinación de presión y elevada temperatura, esta porosidad favorecería la difusión de solutos desde el interior al exterior celular. Cuando la cebolla se trata con APH a 400 MPa (Figura IV.4.1 F), las células pierden turgencia y se deforman. Todos estos efectos se pueden observar acentuados y magnificados tras 4 semanas de almacenamiento (Figura IV.4.1 H e I). Por otra parte, mientras que en las muestras tratadas con 400 MPa (Figura IV.4.1 C, F e I) el tonoplasto desaparece tras el tratamiento, en las muestras tratadas con 100 MPa (Figura IV.4.1 B, E y H) éste mantiene su integridad, pero se va retrayendo hacia el centro de la célula, probablemente debido a la migración de líquido intracelular conforme va aumentando el periodo de almacenamiento. En estas muestras, además la membrana celular se separa de la pared en muchas zonas, sobre todo al final del periodo de almacenamiento (Figura IV.4.1 H), hecho que también ocurre en las muestras sin tratar pero en menor grado (Figura IV.4.1 G).

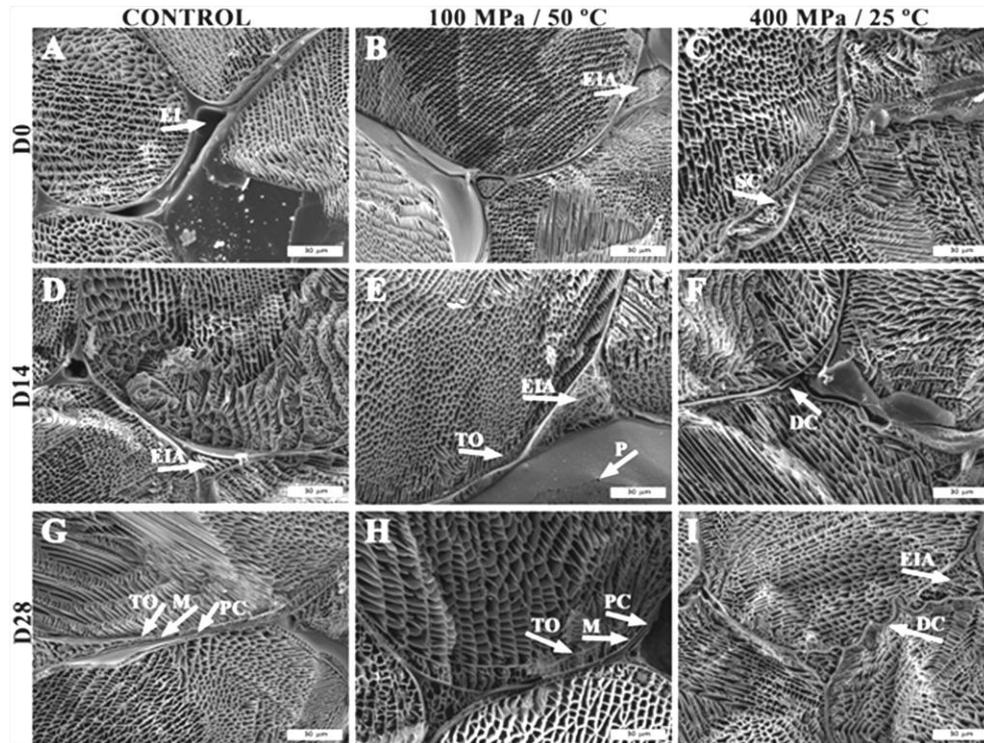


Figura IV.4.1. Cryo-SEM. Tejido de cebolla control y cebolla tratada por altas presiones inmediatamente tras el tratamiento (D0) y tras 14 y 28 días de almacenamiento (D14, D28). EI: espacio intercelular; EIA: espacio intercelular anegado; P: picaduras; PC: pared celular; M: membrana celular; TO: tonoplasto; SC: separación celular; DC: deformación celular.

IV.4.1.2. MICROSCOPIA ÓPTICA

En las imágenes de cebolla ‘Recas’ tratada con APH tomadas por microscopía óptica (LM) (Figura IV.4.2) se confirman los resultados obtenidos por Cryo-SEM. Inmediatamente después del tratamiento (D0) con APH (Figura IV.4.2 A y B), las células muestran una ligera deformación fruto de la compresión, y los espacios intercelulares van aumentando de tamaño. Este efecto se magnifica en ambos tratamientos conforme aumenta el periodo de almacenamiento (Figura IV.4.2 C, D, E y F).

Tras dos semanas de almacenamiento (D14), en el tejido de cebolla tratada con APH (Figura IV.4.2 C y D) se puede observar como las células vecinas pierden adhesión entre sí, y las paredes celulares muestran signos de degradación en algunas zonas, sobre todo en las muestras tratadas con 400 MPa (Figura IV.4.2 D).

Tras cuatro semanas de almacenamiento (D28) en el tejido de cebolla sometida a APH (Figura IV.4.2 E y F), las células aparecen altamente deformadas con paredes y membranas celulares degradadas, disueltas y rotas. Durante este periodo de

almacenamiento, el líquido intracelular migra hacia el apoplasto lo que produce retraimiento de membranas celulares y pérdida de turgencia celular (Figura IV.4.2 E y F). Estos fenómenos se aprecian magnificados a elevadas presiones de tratamiento (Figura IV.4.2 F).

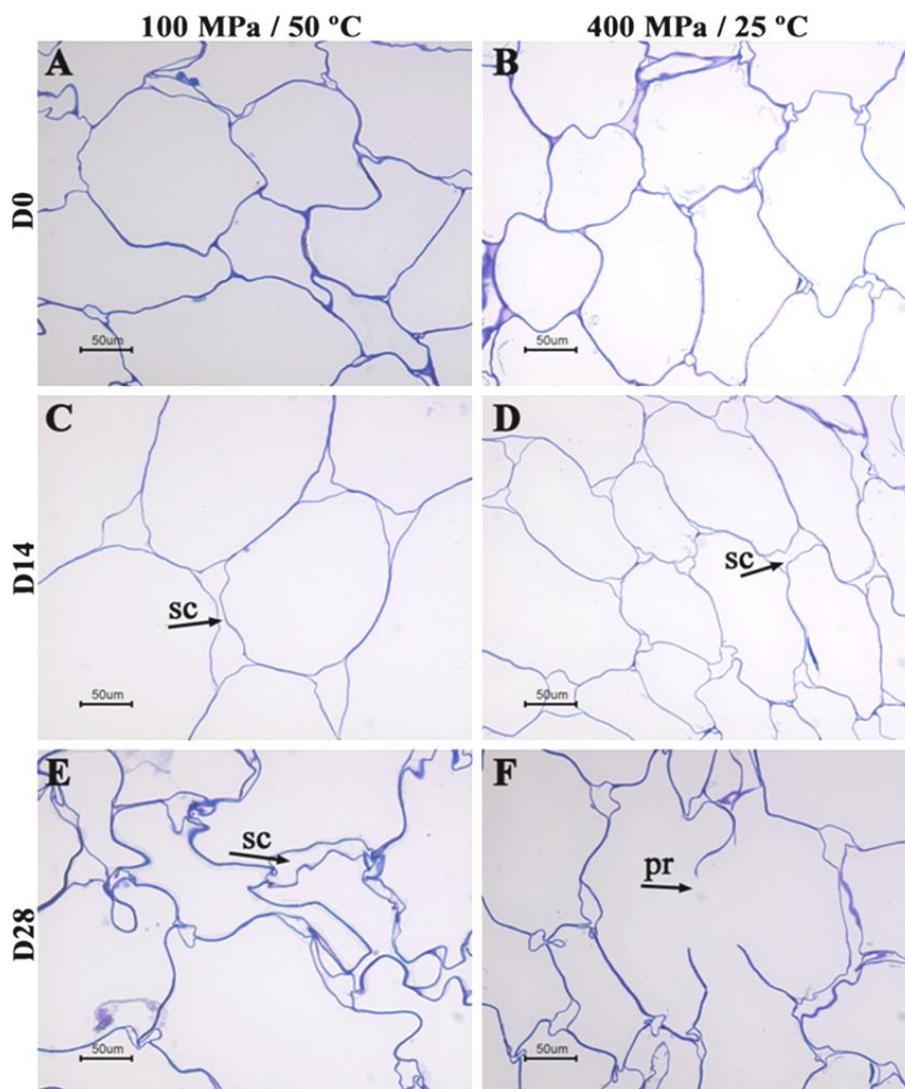


Figura IV.4.2. Microscopía óptica. Tejido de cebolla 'Recas' tratada por altas presiones inmediatamente tras el tratamiento (D0) y tras 14 y 28 días de almacenamiento (D14, D28). sc: separación celular; pr: pared celular rota.

IV.4.1.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de cebolla variedad 'Recas' tratada con APH se muestran en la Figura IV.4.3. Al inicio del periodo de almacenamiento (D0), el tejido de cebolla tratado con 100 MPa a 50 °C (IV.4.3 A) presenta todavía en amplias zonas paredes celulares con fibrillas de celulosa compactas, íntimamente unidas unas a otras, lo que indica que no se produce una gran degradación de los cementos celulósicos. La membrana y el tonoplasto aún se mantienen próximas a la pared celular, aunque se observa cierta retracción de este último hacia el centro de la célula (Figura IV.4.3A). En las muestras tratadas con 400 MPa a 25 °C (IV.4.3 B), las paredes presentan un grosor y un contorno irregular, empiezan a aparecer huecos entre las fibrillas de celulosa, la lámina media se engrosa en algunas zonas y aparece fuertemente teñida, y se genera separación entre las paredes y plasmalema y entre el plasmalema y tonoplasto. Las modificaciones estructurales comentadas se hacen más notables en la muestra tratada con APH a 400 MPa y 25 °C tras dos semanas de almacenamiento (D14) (Figura IV.4.3 D). Las células de muestras tratadas con 100 MPa a 50 °C (Figura IV.4.3 C), en cambio, no se encuentran tan deformadas tras dos semanas de almacenamiento (D14) y las membranas aún se mantienen adheridas a la pared celular (Figura IV.4.3 C). Transcurridos 28 días de almacenamiento (D28), las paredes celulares aparecen disueltas en muchas zonas y la degradación de los cementos celulósicos, con la consecuente separación entre fibrillas de celulosa es notable (Figura IV.4.3 E). Cuando el tejido de cebolla se trata a elevadas presiones (400 MPa y 25 °C) (Figura IV.4.3 F) se observa rotura de las membranas celulares que ya no aparecen en la proximidad de la pared celular.

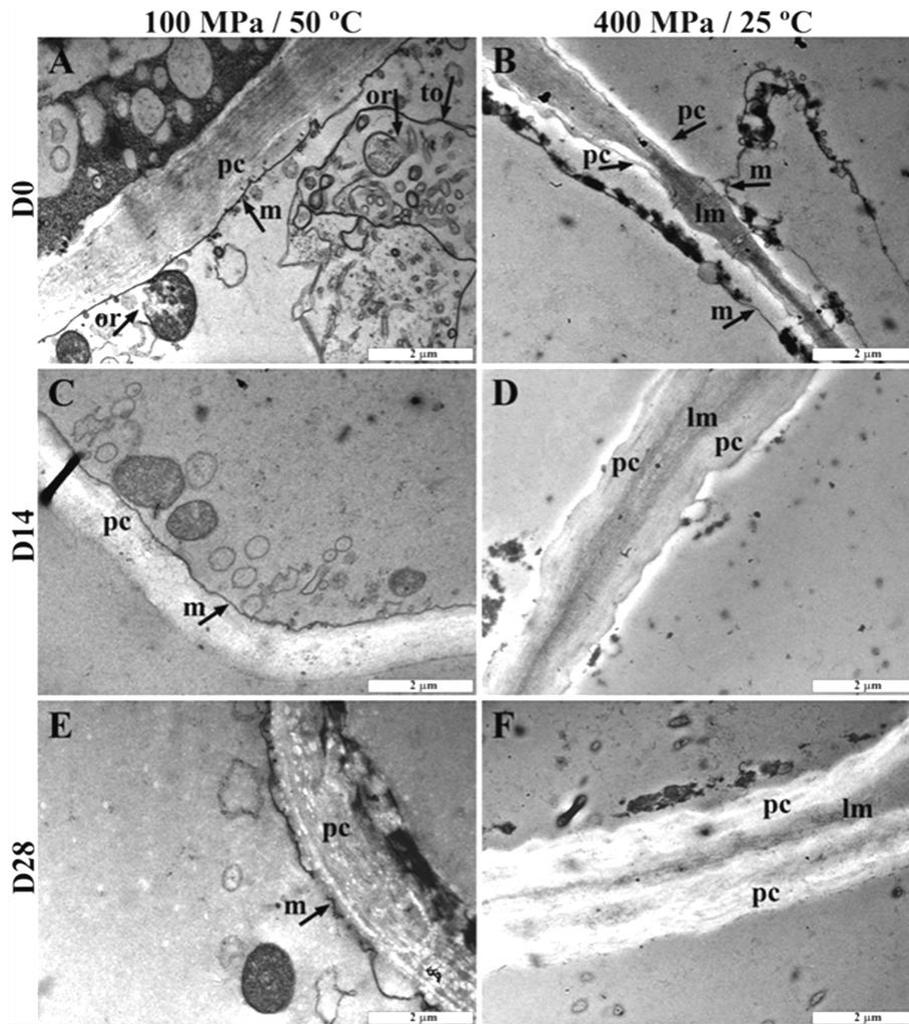


Figura IV.4.3. Microscopía electrónica de transmisión. Tejido de cebolla 'Recas' tratada por altas presiones inmediatamente tras el tratamiento (D0) y tras 14 y 28 días de almacenamiento (D14, D28). pc: pared celular; m: membrana; to: tonoplasto; lm: lámina media.

IV.4.2. ESTUDIO FISICOQUÍMICO

Para estudiar los parámetros fisicoquímicos de cebolla 'Recas' tratada con APH y almacenada durante 4 semanas a 4 °C se realiza un diseño multifactorial categórico con los factores tipo de tratamiento y tiempo de almacenamiento y se aplica un análisis de la varianza ANOVA para cada parámetro estudiado a fin de saber si son significativos el efecto simple del tratamiento, el del tiempo de almacenamiento o la interacción entre ambos factores.

IV.4.2.1. CONTENIDO EN FENOLES SOLUBLES TOTALES

De acuerdo con el análisis estadístico del parámetro contenido en fenoles solubles totales (FST), tanto el efecto simple del tipo de tratamiento como el del tiempo de almacenamiento son significativos ($P < 0.05$), siendo no significativa la interacción entre ambos factores. En la Figura IV.4.4 A se observa que, en las muestras tratadas con 100 MPa a 50 °C (T1) se registran, en promedio, valores de contenido en FST superiores a los de las muestras control y los de las tratadas con 400 MPa a 25 °C (T2). Por otra parte, el contenido en FST aumenta significativamente ($P < 0.05$) tras 7 días de almacenamiento y disminuye significativamente ($P < 0.05$) al final del mismo con respecto a los valores al inicio del mismo (Figura IV.4.4 B).

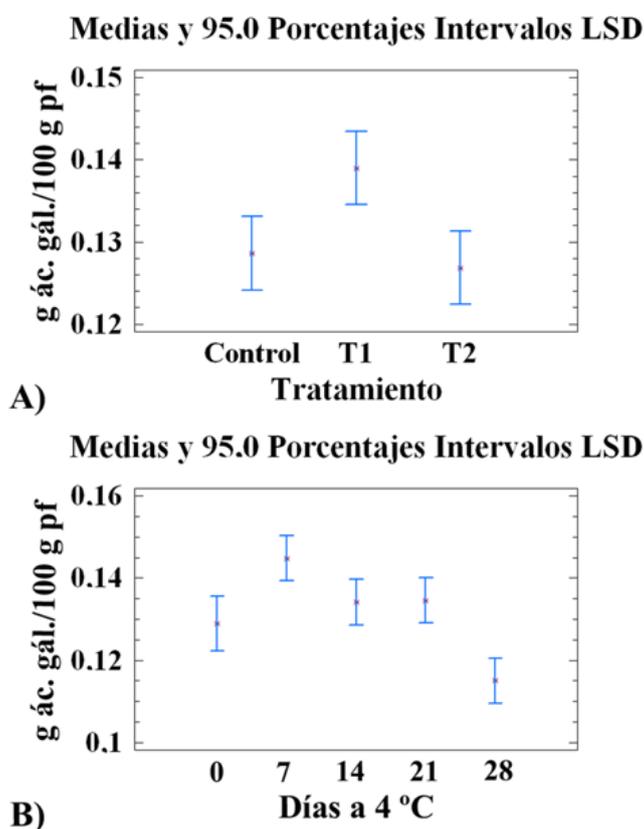


Figura IV.4.4. Gráficos de efecto simple del tipo de tratamiento (A) y del tiempo de almacenamiento (B) para el contenido en fenoles solubles totales de cebolla 'Recas' considerando intervalos LSD. T1: 100 MPa / 50 °C; T2: 400 MPa / 25 °C.

A pesar de no ser significativa ($P > 0.05$) la interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento, en la Figura IV.4.5 se presenta el gráfico de interacción a fin de facilitar una mejor comprensión de como evolucionan los valores de contenido en FST para las muestras control y las tratadas con APH durante el periodo de almacenamiento.

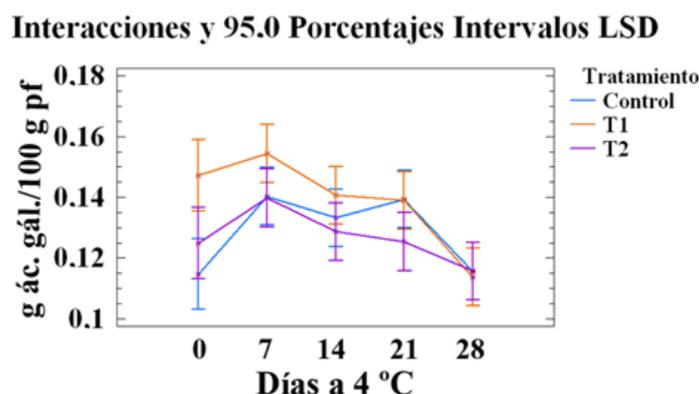


Figura IV.4.5. Gráfico de interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para el contenido en fenoles solubles totales de cebolla 'Recas' considerando intervalos LSD. T1: 100 MPa / 50 °C; T2: 400 MPa / 25 °C.

El contenido en FST de la cebolla control aumenta tras una semana de almacenamiento. En el estudio microestructural se ha comprobado cómo los espacios intercelulares del tejido de la muestra control van llenándose de líquido procedente del interior de las células a medida que avanza el periodo de almacenamiento (Figura IV.4.1 B y 1C). De esta manera, la degradación del tejido durante el almacenamiento favorece la extractabilidad de los compuestos fenólicos. En las semanas sucesivas, el contenido en FST se mantiene sin cambios hasta la cuarta semana de almacenamiento, cuando desciende a valores similares a los registrados al inicio del mismo.

Al inicio del periodo de almacenamiento se detecta una cantidad superior de FST en las muestras tratadas con APH con respecto a las no tratadas, siendo estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en el caso de las muestras tratada con 100 MPa a 50 °C. Las diferencias de contenido en FST entre las muestras tratadas y las muestras control disminuyen conforme avanza el periodo de almacenamiento. Las muestras tratadas con 100 MPa a 50 °C presentan los valores más elevados de FST hasta la segunda semana de almacenamiento. El contenido en FST de las muestras tratadas con 400 MPa a 25 °C, en cambio, sólo resulta superior al del control al inicio del almacenamiento, mientras que muestra valores inferiores al de la cebolla sin tratar en periodos de almacenamiento más largos. Las diferencias iniciales en el contenido en FST entre la muestra control y las tratadas puede deberse a que las APH favorecen la rápida difusión de los compuestos solubles. Conforme el tejido de la cebolla no tratada se va degradando, los compuestos solubles difunden también en estas muestras y por ello las diferencias con las muestras tratadas disminuyen. El hecho de que las muestras tratadas con 400 MPa a 25 °C, a pesar de experimentar una mayor difusión de los

compuestos solubles, tengan un contenido en FST inferior a las muestras no tratadas conforme avanza el periodo de almacenamiento puede deberse a una degradación o insolubilización parcial de los compuestos fenólicos solubles durante el almacenamiento.

IV.4.2.2. PORCENTAJE DE PROTEÍNA SOLUBLE

El análisis estadístico del parámetro porcentaje de proteína soluble (PPS) permite concluir que los efectos simples de los factores considerados (tipo de tratamiento y tiempo de almacenamiento) afectan significativamente a la variable respuesta PPS. El valor de PPS en las muestras tratadas es, en promedio, significativamente superior ($P < 0.05$) al de las muestras no tratadas (Figura IV.4.6 A). Por otra parte, los valores más altos de PPS se obtienen inmediatamente después del almacenamiento (D0) y disminuyen significativamente ($P < 0.05$) a partir de ese momento hasta el final del periodo de almacenamiento (Figura IV.4.6 B).

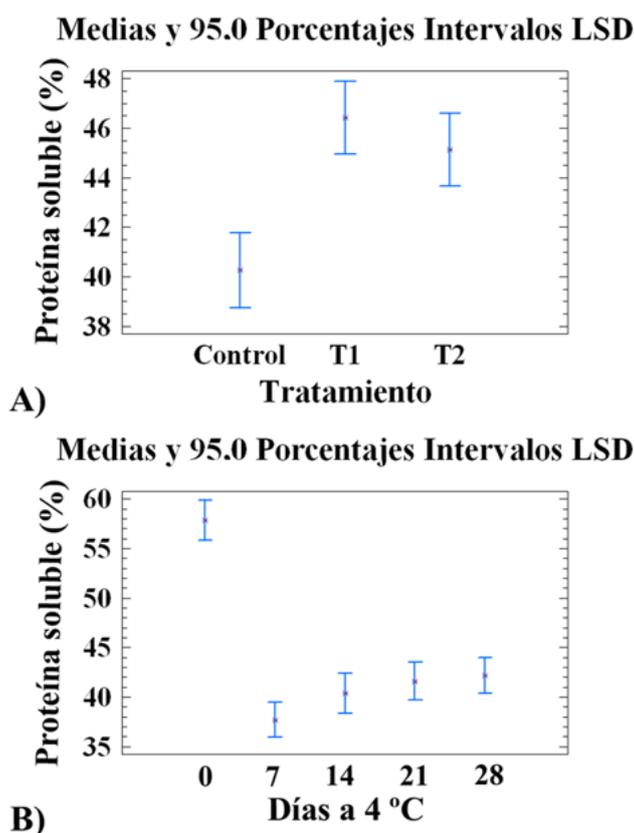


Figura IV.4.6. Gráficos de efecto simple del tipo de tratamiento (A) y del tiempo de almacenamiento (B) para el contenido en fenoles solubles totales de cebolla ‘Recas’ considerando intervalos LSD. T1: 100 MPa / 50 °C; T2: 400 MPa / 25 °C.

Al igual que ocurría con el parámetro de contenido en FST (Apartado IV.4.2.1), es conveniente analizar la interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para el PPS a pesar de que ésta no sea significativa ($P > 0.05$). Esto permite una mejor comprensión de la evolución de este parámetro durante el almacenamiento en las distintas muestras y además de acuerdo al análisis estadístico, esta interacción es próxima a ser significativa ($P = 0.055$). En el gráfico de interacción (Figura IV.4.7) se comprueba que el PPS de la cebolla control disminuye significativamente ($P < 0.05$) a partir del séptimo día de almacenamiento (D7). Inmediatamente tras el tratamiento (D0), las muestras tratadas con APH presentan un PPS significativamente superior ($P < 0.05$) al de la cebolla control. Sin embargo, tras 7 días de almacenamiento (D7) el PPS disminuye para ambos tratamientos hasta valores próximos a los de la cebolla control y se mantienen así hasta el final del periodo de almacenamiento.

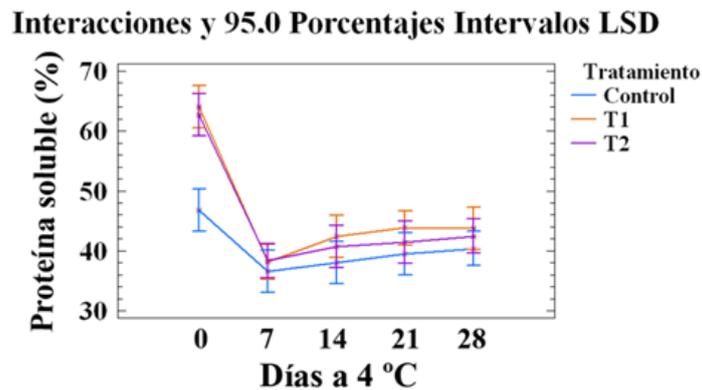


Figura IV.4.7. Gráfico de interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para el porcentaje de proteína soluble (PPS) de cebolla ‘Recas’ considerando intervalos LSD. T1: 100 MPa / 50 °C; T2: 400 MPa / 25 °C.

La disminución generalizada del PPS durante el almacenamiento podría deberse a posibles variaciones del pH durante el mismo que afectarían a la solubilidad de las proteínas. La ausencia de diferencias en los valores de PPS entre las muestras tratadas y la control podría atribuirse al hecho de que la degradación del tejido a lo largo del almacenamiento en todas las muestras, incluyendo la no tratada, podría restar importancia a la influencia del tratamiento de APH, tal y como ocurría en el contenido en FST (Figura IV.4.5).

IV.4.2.3. COLOR

El análisis estadístico para las variables luminosidad (L^*), saturación o croma (C^*) y tono (h) indica que la interacción entre los factores tipo de tratamiento y tiempo de almacenamiento es significativa ($P < 0.05$) para dichas variables (Figura IV.4.8).

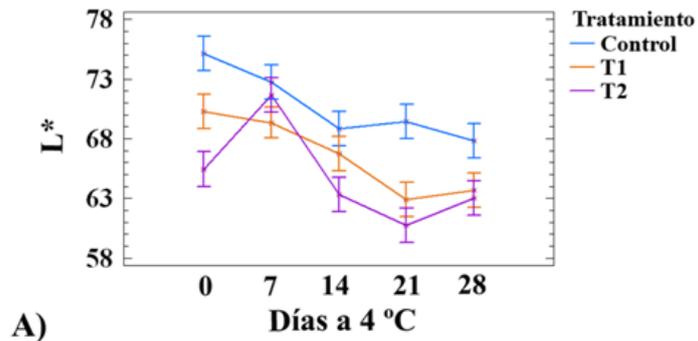
La L^* y el C^* de la cebolla control disminuyen significativamente ($P < 0.05$) a partir de la segunda semana de almacenamiento (D14), mientras que el h lo hace en la cuarta semana (D28).

La L^* disminuye tras los tratamientos de APH y se mantiene igual o inferior a los de la cebolla control durante todo el periodo de almacenamiento (Figura IV.4.8 A). Probablemente el deterioro del tejido por efecto de la presión y temperatura aplicadas en los tratamientos de APH, favorezca la actividad de enzimas responsables del pardeamiento, manifestándose en una pérdida de luminosidad. Arroyo et al. (1999) atribuyeron el pardeamiento observado en cebolla tratada con 400 MPa y 5 °C a la pérdida de compartimentación de la enzima peroxidasa por la disminución de la permeabilidad de la pared celular tras el tratamiento de APH.

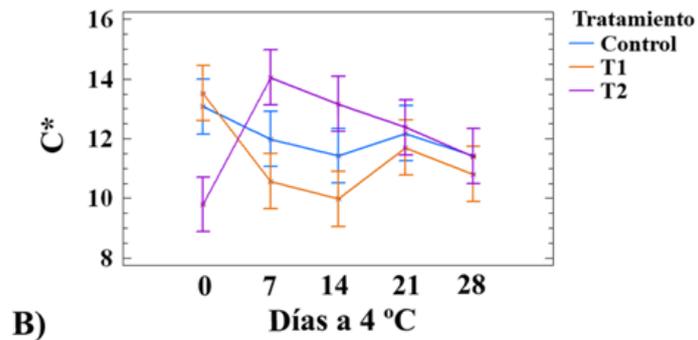
Al inicio del periodo de almacenamiento (D0) las muestras tratadas con 400 MPa a 25 °C (T2) tienen valores de C^* más bajos que la cebolla sin tratar. Tras la primera semana de almacenamiento el C^* aumenta significativamente ($P < 0.05$) en las muestras tratadas con 400 MPa (T2) mientras que disminuye en las muestras tratadas con 100 MPa (T1). Al final del periodo de almacenamiento (D28) las cebollas sometidas a ambos tratamientos poseen valores de C^* próximos a los de la cebolla sin tratar (Figura IV.4.8 B).

En lo que respecta al h , los valores de h de las muestras tratadas con 100 MPa a 50 °C (T1) no varían demasiado durante todo el periodo de almacenamiento y se mantienen similares a los de la cebolla control salvo tras 7 días de almacenamiento. Sin embargo, los valores de h de las muestras tratadas con 400 MPa a 25 °C (T2) disminuyen al final del periodo de almacenamiento, siendo significativamente inferiores ($P < 0.05$) a los de la cebolla control y cebolla tratada con 100 MPa a 25 °C (Figura IV.4.8 C).

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD

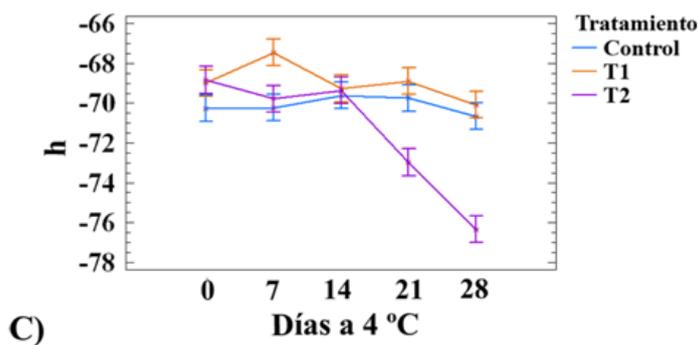
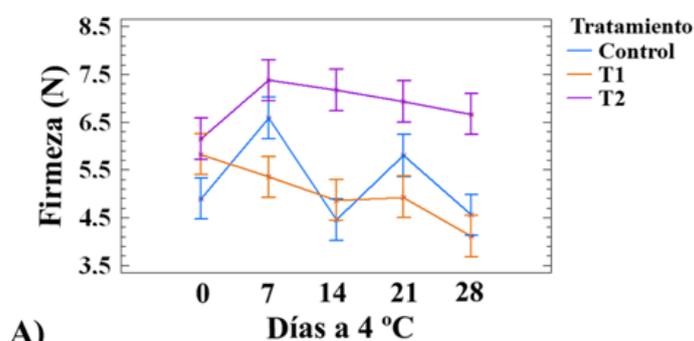


Figura IV.4.8. Gráficos de interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para los parámetros de color de cebolla 'Recas' considerando intervalos LSD. A) Luminosidad (L*). B) Saturación (C*). C) Tono (h). T1: 100 MPa / 50 °C; T2: 400 MPa / 25 °C.

IV.4.2.4. PROPIEDADES TEXTURALES

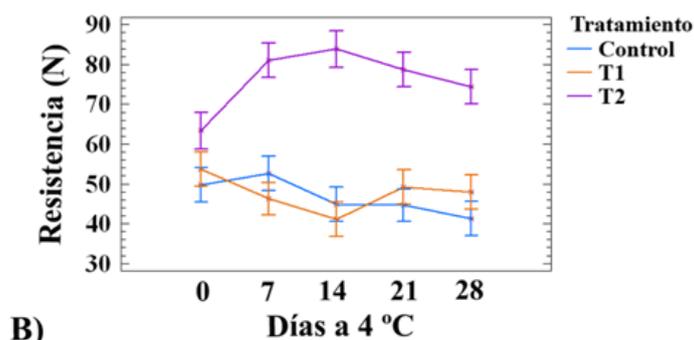
Tanto en el caso de la firmeza como en el de la resistencia al corte, la interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento resulta estadísticamente significativa ($P < 0.05$), ya que, en general, en ambos parámetros no hay diferencias entre las muestras control y las tratadas con 100 MPa a 50 °C y en cambio las muestras tratadas con 400 MPa a 25 °C poseen valores significativamente superiores ($P < 0.05$) de firmeza y resistencia al corte durante todo el periodo de almacenamiento (Figura IV.4.9).

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



A)

Interacciones y 95.0 Porcentajes Intervalos LSD



B)

Figura IV.4.9. Gráficos de interacción entre el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenamiento para los parámetros de textura de cebolla 'Recas' considerando intervalos LSD. A) Firmeza. B) Resistencia al corte. T1: 100 MPa / 50 °C; T2: 400 MPa / 25 °C.

Al tratar a 400 MPa y 25 °C (T2) se obtienen los valores más elevados de firmeza (Figura IV.4.9 A) y resistencia al corte (Figura IV.4.9 B) y la mayor degradación del material de las paredes celulares (Figura IV.4.3), lo que podría favorecer un mejor contacto entre las sustancias pécticas y la enzima pectinametilsterasa (PME), con la consecuente formación de pectatos cálcicos y fortalecimiento de la estructura. Estos valores de firmeza y resistencia al corte más elevados en la cebolla sometida al

tratamiento T2 se mantienen durante todo el periodo de almacenamiento. El efecto en la microestructura que produce el tratamiento con 100 MPa a 50 °C (T1) no parece influir excesivamente en las propiedades texturales de la cebolla durante un periodo de almacenamiento de 4 semanas (D28) con respecto a la cebolla no tratada.

V. CONCLUSIONS

1. High hydrostatic pressure (HHP) improves the extractability of some bioactive compounds of persimmon, such as the soluble dietary fiber fraction, since it favours the solubilization of cell wall constituents, the tannin fraction, since it favours their diffusion from the cell interior to the apoplast, and the carotenoids, since they are released from the chromoplasts. Therefore, the availability of these compounds could be favoured.
2. HHP modifies some physicochemical properties of persimmon. Overall, luminosity and firmness decrease, whereas total soluble solids content, pH and cohesiveness increase or decrease depending on the conditions of the treatment.
3. Persimmon at an early ripening stage (M1) and not previously submitted to deastringency treatment (astringent) seems to be the most suitable tissue in order to favour the diffusion and extractability of bioactive compounds by using HHP treatments.
4. The application of 400 MPa to persimmon, despite favouring the diffusion and extractability of bioactive compounds, produces important damage at an ultrastructural level, which affects persimmon firmness.
5. An increase in temperature treatment from 25 °C to 37.5 °C favours the diffusion of soluble material and improves the physicochemical properties of HHP-treated persimmon.
6. In order to obtain an optimum balance between structural stability and bioactive compounds extractability of persimmon, 200 MPa at 37.5 °C for 3 and 6 minutes could be suitable HHP treatment conditions.
7. HHP treatment could be used to replace the postharvest deastringency treatment with CO₂ of persimmon, since HHP treatment induces the precipitation of tannins, which are responsible for the astringency of the fruit.
8. Storage at 4 °C causes in HHP-treated persimmon structural degradation, modifications in the bioactive compounds extractability and changes in some physicochemical properties that vary depending on the treatment conditions and the storage time. The main changes in the physicochemical properties take place during the first 7 days of storage.
9. HHP treatment also causes important structural modifications in onion, mainly in the cell walls and the membranes. Since these modifications favour the diffusion of the cell compounds to the apoplast, they increase the phenolic extractability and the protein solubility.
10. The temperature of the treatment plays an important role in the extractability of compounds when low pressure (100 MPa) is applied. This factor is less decisive when 250 or 400 MPa are applied.

V. Conclusions

11. Firmness and shear force increase and luminosity (L^*) decreases when the pressure applied to onion is 250 MPa or higher.
12. In order to obtain an optimum between structural stability and bioactive compounds extractability of onion, 100 MPa at 50 °C and 400 MPa at 25 °C for 5 minutes could be suitable HHP treatment conditions.
13. Storage at 4 °C causes important structural degradation in HHP-treated onion. This degradation is higher when treating at 400 MPa at 25 °C if compared to 100 MPa at 50 °C. However, the differences decrease progressively during storage.
14. Onion samples treated at 400 MPa at 25 °C maintain higher texture values from the first week of storage than the rest of the samples.

VI. REFERENCIAS

- AOAC. VV.AA. 2000. Official methods of analysis. 17th ed., AOAC International, Arlington.
- Aguado Laza, C. 2009. 'Los deberes del caqui', [en línea]. *Las Provincias*: 1 de marzo de 2009. <<http://www.lasprovincias.es>>. [Consulta: Marzo 2012].
- Alonso, J.; Howell, N.; Canet, W. 1997. Purification and characterization of two pectinmethylesterase from persimmon (*Diospyros kaki*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75: 352–358.
- 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.
- Anderson, J.W.; Smith, B.M.; Gustafson, N.J. 1994. Health benefits and practical aspects of high-fiber diets. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59(5): 1242S-1247S.
- 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. Quality of persimmon fruit cv. 'Rojo Brillante' during storage at different temperatures. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2: 243–247.
- Arroyo, G.; Sanz, P.D.; Préstamo, G. 1999. Response to high-pressure, low-temperature treatment in vegetables: determination of survival rates of microbial populations using flow cytometry and detection of peroxidase activity using confocal microscopy. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 544–556.
- Arslan, D.; Özcan, M.M. 2010. Study the effect of sun, oven and microwave drying on quality of onion slices. *LWT – Food Science and Technology*, 43(7): 1121–1127.
- 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.
- B.log.ia 2.0. 2012. <<http://b-log-ia20.blogspot.com.es/2010/12/reproduccion-asexual-y-sexual-en.html>>. [Consulta: Abril 2012].
- Balny, C.; Masson, P. 1993. Effects of high pressure on proteins. *Food Reviews International*, 9: 611–628.
- Barbosa-Cánovas, B.V.; Pothamury, U.R.; Palou, E.; Swanson, B.G. 1998. Conservación no térmica de alimentos. Acribia S.A., Zaragoza.
- 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.
- Ben Arie, R.; Sonogo, L. 1993. Temperature affects astringency removal and recurrence in persimmon. *Journal of Food Science*. 58(6): 1397–1400.

VI. Referencias

- 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.
- Bilyk, A.; Cooper, P.L.; Sapers, G.M. 1984. Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion (*Allium cepa* L.) tissue. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 32: 274–276.
- Brett, C.; Waldron, K. 1996. Physiology and biochemistry of plant cell walls. Champlan & Hall, Londres.
- Breu, W. 1991. Analytische und pharmakologische Untersuchungen von *Allium Cepa* L. und neue 5-Lipoxygenase-Inhibitoren aus Arzneipflanzen. Tesis Doctoral. University of Munich.
- Brewster, J.L. 2001. La cebolla y otros Alliums. Acribia S.A. Zaragoza,. España.
- Briones-Labarca, V.; Venegas-Cubillos, G.; Ortiz-Portilla, S.; Chacana-Ojeda, M.; Maureira, H. 2011. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry*, 128: 520–529.
- 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.
- Butz, P.; Edenharder, R., Fernández-García, A.; Fister, H.; Merkel, H.; Tauscher, B. 2002. Changes in functional properties of vegetables induced by high pressure treatment. *Food Research International*, 35: 295–300.
- Butz, P.; Fernández-García, A.; Lindauer, R.; Dieterich, S.; Bogнар, A.; Tauscher, B. 2003. Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetables products. *Journal of Food Engineering*, 56: 233–236.
- Caldas, V.; Blair, M. 2004. Cuantificación de taninos condensados e identificación de QTLs asociados a su acumulación en fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.). En: Taller sobre taninos en la nutrición de rumiantes en Colombia. En: Memorias de taninos en la nutrición de rumiantes en Colombia. Bogotá, 43.
- Cano, M.P.; De Ancos, B. 2000. 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 Raton, Florida, 290–293.
- Cano, M.P., Hernandez, A. De Ancos, B. 1997. High Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Strawberry and Orange Products. *Journal of Food Science*, 62: 85–88
- Castell-Roig, V.; Castell Zeising, V. 1991. Cultivo de la cebolla en la Comunidad Valenciana. *Hortofruticultura*, 2: 30–37.

- Champ, M.; Langkilde, A.M.; Brouns, F.; Kettlitz, B.; Collet, Y.B. 2003. Advances in dietary fibre characterisation. 1. Definition of dietary fibre, physiological relevance, health benefits and analytical aspects. *Nutrition Research Reviews*, 6(1): 71–82.
- 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*. John Libbery Eurotext, Londres, 195–209.
- Cheftel, J.C. 1995. Review: High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International*, 1: 75–90.
- Chung, K.-T.; Wei, C.-I.; Johnson, M.G. 1998a. Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science & Technology*, 9: 168–175.
- Chung, K.T.; Wong, T.Y.; Wei, C.I.; Huang, Y.W.; Lin, Y. 1998b. Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6): 421–464.
- Ciardiello, M.A.; Tamburrini, M.; Tuppo, L.; Carratore, V.; Giovane, A.; Mattei, B.; Camardella, L. 2004. Pectin methylesterase from kiwi and kaki fruits: Purification, characterization, and role of pH in the enzyme regulation and interaction with the kiwi proteinaceous inhibitor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25): 7700–7703.
- Crelier, S.; Robert, M.C.; Claude, J.; Juillerant, M.A. 2001. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) pectin methylesterase and polygalacturonase behaviours regarding heat and pressure-induced inactivation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 5566–5575.
- De Ancos, B.; González, 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.
- De Ancos, B.; Sgroppo, S.; Plaza, L.; Cano, M.P. 2002. Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 790–796.
- De Lange, C.; Nyachoti, C.; Verstegen, M. 2000. The significance of antinutritional factors in feedstuffs for monogastric animals. En: Moughan, P.; Verstegen, M.; Visserreynveld, M. (eds). *Feed evaluation principles and practice*. Amstelveen, Holanda, 169–188.
- De Roeck, A.; Sila, D.N.; Duvetter, T.; Van Loey, A.; Hendrickx, M. 2008. Effect of high pressure/high temperature processing on cell wall pectic substances in relation to firmness of carrot tissue. *Food Chemistry*, 107: 1225–1235.
- Dede, S.; Alpas, H.; Bayindirli, A. 2007. High hydrostatic pressure treatment and storage of carrot and tomato juices: Antioxidant activity and microbial safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 773–782.

VI. Referencias

- 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.
- DeLong, J.M.; Prange, R.K.; Harrison, P.A.; McRae, K.B. 2000. Comparison of a new apple firmness penetrometer with three standard instruments. *Postharvest Biology and Technology*, 19: 201–209.
- Desjardins Y. 2008. Onion as a nutraceutical and functional food. *Chronica Horticulturae*, 48(2): 8–14.
- Dickinson, E.; James, J.D. 2000. Influence of high-pressure treatment on β -lactoglobulin-pectin associations in emulsions and gels. *Food Hydrocolloids*, 14: 365–376.
- Dong-Un L. 2002. Application of combined non-thermal treatments for the processing of liquid whole egg. Tesis Doctoral. Berlin University.
- Dörnenburg, H.; Knorr, D. 1993. Cellular permeabilization of cultures plant tissue by high electric field pulse or ultra high pressure or the recovery of secondary metabolites. *Food Biotechnology*, 7: 35–48.
- Douzals, J.P.; Perrier Cornet, J.M.; Gervais, P.; Coquille, J.C. 1998. High pressure gelatinization of wheat starch and properties of pressure induced gels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 4824–4829.
- Earnshaw, R. 1996. High pressure food processing. *Nutrition and Food Science*, 2: 8–11.
- Eurostat. 2012. <<http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/eurostat/home/>>. [Consulta: Abril 2012].
- Fachin, D.; van Loey, A.; Indrawati, D.; Ludikhuyze, L.; Hendrickx, M.E. 2002. Thermal and high pressure inactivation of tomato polygalacturonase: a kinetic study. *Journal of Food Science*, 67: 1610–1615.
- FAO Statistics. 2010. <<http://faostat.fao.org/?lang=es>>. Producción. País por producto. [Consulta: Abril 2012].
- Galazka, V.B.; Sumner, I.G.; Ledward, D.A. 1996. Changes in protein-protein and protein-polysaccharide interactions induced by high pressure. *Food Chemistry*, 57(3): 393–398.
- Gennaro, L.; Leonardi, C.; Esposito, F.; Salucci, M.; Maiani, G.; Quaglia, G. 2002. Flavonoid and carbohydrate contents in Tropea red onions: effects of homelike peeling and storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50: 1904–1910.
- Gökçe, A.F.; Kaya, C.; Serçe, S.; Özgen, M. 2010. Effect of scale color on the antioxidant capacity of onions. *Scientia Horticulturae*, 123: 431–435.

- Gorinstein, S.; Park, Y.-S.; Heo, B.-G.; Namiesnik, J.; Leontowicz, H.; Leontowicz, M.; Ham, K.-S.; Cho, J.-Y.; Kang, S.-G. 2009. A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables. *European Food Research and Technology*, 228: 903–911.
- 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.
- Gould, G.W. 2001. The evolution of high pressure processing of foods. En: Hendrickx (M.E.G.; Knorr, D. (eds). *Ultra High Pressure Treatments of Foods*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, 3–22.
- Goveas, R.N. 2011. Are allium vegetables and their constituents associated with reduced risk of breast cancer? ProQuest, UMI Dissertation Publishing, 15
- Griffiths, G.; Trueman, L.; Crowther, T.; Thomas, B.; Smith, B. 2002. Onions-A global benefit to health. *Phytotherapy Research*, 16: 603–615.
- Grigelmo-Miguel, N.; Martin-Belloso, O. 1999. Comparison of dietary fibre from by-products of processing fruits and greens and from cereals. *LWT – Food Science and Technology*, 32: 503–508.
- Harbaum, B. 2007. Characterization of free and cell-wall-bound phenolic compounds in chinese *Brassica* vegetables. Tesis Doctoral. University of Kiel.
- Harker, F.R.; Maindonald, J.H.; Jackson, P.J. 1996. Penetrometer measurement of apple and kiwifruit firmness: operator and instrument differences. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(5): 927–936.
- Heinz, V.; Buckow, R. 2010. Food preservation by high pressure. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 5(1): 73–81.
- Hendrickx, M.E.G.; Knorr, D.; Loey, A.V.; Heinz, V. 2005. *Ultra High Pressure Treatments of Foods*, Kluwer Academic Plenum Publishers, 297–309.
- Hendrickx, M.; Ludikhuyze, L.; Van den Broeck, I.; Weemaes, C. 1998. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 197–203.
- Heremans, K. 1995. High pressure effects on biomolecules. En: Ledward, L.A.; Johnston, D.E.; Earnshaw, R.G.; Hasting, A.P.M. (eds). *High Pressure Processing of Foods*, Nottingham University Press, Leicestershire, 81–98.
- Hernández Aranda, B. 1999. Cuadernos de tecnología agraria: El cultivo del kaki en la Comunidad Valenciana. Serie Fruticultura nº 3. Generalitat Valenciana. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación, 6–11.

VI. Referencias

- Hollman, P.C.H.; Arts, I.C.W. 2000. Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1081–1093.
- Hugas, M.; Garriga, M.; Monfort, J.M. 2002. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science*, 62: 359–371.
- 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.
- Inaba, A.; Sobajima, Y.; Ishida, M. 1971. Seasonal changes in the major components of kaki fruits. *The Scientific Report of Kyoto Prefectural University, Agriculture*, 23: 24–28.
- Irwe, S.; Olsson, I. 1994. Reduction of Pectinesterase Activity in Orange Juice by High Pressure Treatment. En: Singh, R.P.; Oliveira, F. (eds). *Minimal Processing of Foods and Process Optimization: an Interface*. CRC Press, Boca Raton, 35–42.
- Ito, S. 1971. The persimmon. En: Hulme, A.C. (ed) *The biochemistry of fruits and their products*. Academic Press, Nueva York, 281–301.
- Jaime, L.; Martín-Cabrejas, M.A.; Mollá, E.; López-Andréu, F.J.; Esteban, R.M. 2001a. Effect of storage on fructans and fructooligosaccharide of onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49(2): 982–988.
- Jaime, L.; Martínez, F.; Martín-Cabrejas, M.A.; Mollá, E.; López-Andréu, F.J.; Waldron, K.W.; Esteban, R.M. 2001b. Study of total fructan and fructooligosaccharide content in different onion tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 177–182.
- Johnston, D.E.; Austin, B.A.; Murphy, R.J. 1992. Effects of high hydrostatic pressure on milk. *Milchwissenschaft*, 47: 760–763.
- Kazuhiro Edagi, F.; Kluge, R.A. 2009. Removal of astringency in persimmon fruits: a biochemical, physiological and technological view. *Ciência Rural*, 39(2): 585–594.
- Knekt, P.; Hoppa, A.; Jarvinen, R.; Reunanen, A.; Maatela, J. 1996. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British Medical Journal*, 312: 478–481.
- 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, Reino Unido, 123–135.
- Knorr, D. 1999. Novel approaches in food-processing technology: new technologies for preserving foods and modifying function. *Food Biotechnology*, 10: 485–491.
- Krebbbers, B.; Matser, A.M.; Hoogerwerf, S.W.; Moezelaar, R.; Tomassen, M.M.M.; Van den Berg, R.W. 2003. Combined high-pressure and thermal treatments for

- processing of tomato puree: evaluation of microbial inactivation and quality parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4: 377–385.
- Kuon, J.; Bernhard, R.A. 1963. An examination of the free aminoacids of the common onion (*Allium cepa*). *Food Science*, 28: 298–304.
- Leighton, T.; Ginther, C.; Fluss, L.; Harter, W.K.; Cansado, J.; Notario, V. 1992. Molecular characterization of quercetin and quercetin glycosides in allium vegetables. En: Huang, M.T.; Ho, C.T.; Lee, C.Y. (eds). *Phenolic compounds in foods and their effects on health II*. American Chemical Society Symposium Series 507. ACS, Washington, DC, 220–238.
- Lindner, M.W. 1974. A monograph on the Kaki-fig. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 155(2): 65–71.
- Lombard, K.; Peffley, E.; Geoffriau, E.; Thompson, L.; Herring, A. 2005. Quercetin in onion (*Allium cepa* L.) after heat-treatment simulating home preparation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18: 571–581.
- Mallor, C. 2008. Principales variedades de cebolla de primavera-verano. *Horticultura*, 205: 10–14.
- Matsuo, T.; Ito, S. 1982. A model experiment for destringency of persimmon fruit with high carbon dioxide: in vitro gelation of kaki-tannin by reacting with acetaldehyde. *Agriculture and Biological Chemistry*, 46: 683–689.
- Mattikala, E.J.; Virtanen, A.I. 1967. On the quantitative determination of the amino acids and γ glutamyl peptides of onion. *Acta Chemica Scandinavica*, 21: 2891–2893.
- McInerney, J.K.; Seccafien, C.A.; Stewart, C.M.; Bird, A.R. 2007. Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability, in vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 543–548.
- Milczareka, R.R.; McHugha, T.H. 2011. Practical implications of probe- and sample-related variables in puncture testing of clingstone peaches. *Proceedings of International Congress on Engineering and Food (ICEF11)*, EPF536: 215.
- Mizuno, M.; Tsuchida, H.; Kozukue, N.; Mizuno, S. 1992. Rapid quantitative analysis and distribution of free quercetin in vegetables and fruits. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39: 88–92.
- Montero, P.; Gómez-Guillén, C. 2002. High pressure applications on miosystems. En: *Symposium on Emerging Technologies for the Food Industry*. Madrid, España, 29.
- Morata Barrado, A. 2008. Nuevas tecnologías de conservación de alimentos. Ediciones Madrid Vicente, Madrid.
- Moreiras, O.; Carbajal, A.; Cabrera, L.; Cuadrado, C. 2011. Tablas de composición de los alimentos. PIRAMIDE.

VI. Referencias

- Mountzouris, K.C.; Balaskas, C.; Fava, F.; Tuohy, K.M.; Gibson, G.R.; Fegeros, K. 2006. Profiling of composition and metabolic activities of the colonic microflora of growing pigs fed diets supplemented with prebiotic oligosaccharides. *Anaerobe*, 12: 175–185.
- Nakatsumo, 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.
- Neetoo, H.; Nekoozadeh, S.; Jiang, Z.; Chen, H. 2011. Application of high hydrostatic pressure to decontaminate green onions from *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 28: 1275–1283.
- Neri, L.; Hernando, I.; Pérez-Munuera, I.; Sacchetti, G.; Pittia, P. 2001. Effect of blanching in water and sugar solutions on texture and microstructure of sliced carrots. *Journal of Food Science*, 76: E23–E30.
- Ng, A.; Arker, M.L.; Parr, A.J.; Saunders, P.K.; Smith, A.C.; Waldron, K.W. 2000. Physicochemical characteristics of onion (*Allium cepa* L.) tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11): 5612–5617.
- Ng, A.; Smith, A.C.; Waldron, K.W. 1998. Effect of tissue type and variety on cell wall chemistry of onion (*Allium cepa* L.). *Food Chemistry*, 63: 17–24.
- Oey, I.; Van der Plancken, I.; Van Loey, A.; Hendrickx, M. 2008. Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems? *Trends in Food Science and Technology*, 19: 300–308.
- 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, C.G.; Lee, K.C.; Lee, D.W.; Choo, H.Y.; Albert, P.J. 2004. Effects of purified persimmon tannin and tannic acid on survival and reproduction of bean bug, *Riptortus clavatus*. *Journal of Chemical Ecology*, 30(11): 2269–2283.
- Park, Y.-S.; Jung, S.-T.; Kang, S.-G.; Delgado-Licon, E.; Martínez Ayala, A.L.; Tapia, M.S.; Martín-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 – Food Science and Technology*, 39: 748–755.
- Prakash, D.; Singh, B.N.; Upadhyay, G. 2007. Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). *Food Chemistry*, 102: 1389–1393.
- Préstamo, G.; Arroyo, G. 1998. High Hydrostatic Pressure effects on vegetable structure. *Journal of Food Science*, 63(5): 878–881.

- Qiu, W.; Jiang, H.; Wang, H.; Gao, Y. 2006. Effect of high hydrostatic pressure on lycopene stability. *Food Chemistry*, 97: 516–523.
- 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.
- Raventós Santamaría, M. 2005. Industria alimentaria. Tecnologías emergentes. Edicions UPC, Barcelona, 25–31.
- Rehman, Z.U.; Islam, M.; Shah, W.H. 2003. Effect of microwave and conventional cooking on insoluble dietary fibre components of vegetables. *Food Chemistry*, 80: 237–240.
- Roldán, E.; Sánchez-Moreno, C.; De Ancos, B.; Cano, M.P. 2008. Characterisation of onion (*Allium cepa* L.) by-products as food ingredients with antioxidant and antibrowning properties. *Food Chemistry*, 108(3): 907–916.
- Roldán-Marín, E.; Sánchez-Moreno, C.; Lloría, R.; de Ancos, B.; Cano, M.P. 2009. Onion high-pressure processing: Flavonol content and antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 42: 835–841.
- Rubens, P.; Heremans, K. 2000. Pressure-temperature gelatinization phase diagram of starch: an in situ fourier transformation infrared study. *Biopolymers*, 54: 524–530.
- 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.; 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.
- Sánchez-Moreno, C.; De Ancos, B.; Plaza, L.; Elez-Martínez, P.; Cano, M.P. 2009. Nutritional approaches and health-related properties of plant foods processed by high pressure and pulsed electric fields. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49: 552–576.
- Sánchez-Moreno, C.; Plaza, L.; De Ancos, B.; Cano, M.P. 2003a. Vitamin C, provitamin A carotenoids, and other carotenoids in high pressurized orange juice during refrigerated storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 647–653.
- Sánchez-Moreno, C.; Plaza, L.; De Ancos, B.; Cano, M.P.; Olmedilla, B.; Granado, F.; Martín, A. 2003b. High-pressurized orange juice consumption affects plasma

VI. Referencias

- vitamin C, antioxidative status and inflammatory markers in healthy humans. *Journal of Nutrition*, 133: 2204–2209.
- Sánchez-Moreno, C.; Plaza, L.; De Ancos, B.; Cano, M.P.; Olmedilla, B.; Granada, F.; Martín, A. 2004. Consumption of high-pressurized vegetable soup increases plasma vitamin C and decreases oxidative stress and inflammatory biomarkers in healthy humans. *Journal of Nutrition*, 134: 3021–3025.
- 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.
- Schmidt, D.G.; Koops, J. 1977. Properties of artificial casein micelles. Part 2. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 31: 342–357.
- Schuphan, W.; Schwerdtfeger, E. 1972. Biochemie der vegetativen Entwicklung von *Allium cepa* L. unter besonderer Berücksichtigung ihres Eiweiss- und Aminosäuren-Haushalts. Die Rolle Des Arginins als N-Pool. *Qualitas Plantarum Plant foods for human nutrition*, 21(3): 141–157.
- Shon, M.; Choi, S.; Kahng, G.; Nam, S.; Sung, N. 2004. Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. *Food and chemical Toxicology*, 42(4): 659–666.
- Shouqin, Z.; Jun, X.; Changzheng, W. 2005. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80: 50–54.
- Smithard, R. 2002. Secondary plant metabolites in poultry nutrition. En: McNab, J.; Boorman, K. (eds). *Poultry Feedstuffs: supply, composition and nutritive value*. CABI publishing, Wallingford, Reino Unido, 237–278.
- Spare, C.G.; Virtanen, A.I. 1964. On the occurrence of free selenium-containing amino acids in onion (*Allium cepa*). *Acta Chemica Scandinavica*, 18(1): 280–282.
- Stute, R.H.; Klingler, R.W.; Boguslawski, S.; Eshtiaghi, M.N.; Knorr, D. 1996. Effects of high pressures treatment on starches. *Starch*, 48: 399–408.
- Sukhwant, M.K.; Harvinder, K.; Tejinder, G. 1992. Effect of cooking on fibre content of vegetables. *Journal of Food Science and Technology*, 29: 185–186.
- Taira, S. 1996. Astringency in persimmon. En: Linskens, H.F.; Jackson, J.F. (eds). *Modern Methods of Plant Analysis, Vol. 18: Fruit Analysis*. Springer, Berlín, 97–110.
- Taira, S.; Ono, M.; Matsumoto, N. 1997. Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. *Postharvest Biology and Technology*, 12(3): 265–271.

- Tangwongchai, R.; Ledward, D.A. Ames, J.M. 2000. Effect of high-pressure treatment on lipoxygenase activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 2896–2902
- USDA. 2008. Composition of Foods Raw, Processed, Prepared. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21.
- Valette, C.; Andary, C.; Geiger, J.P.; Sarah, J.P.; Nicole, J.L.M. 1998. Histochemical and cytochemical investigations of phenols in roots of banana infected by the burrowing nematode *radopholus similis*. *Phytopathology*, 88: 1141–1148.
- Van den Berg, R.W.; Hoogland, H.; Lelieveld, H.L.M.; Van Schepdael, L. 2002. High pressure equipment designs for food processing applications. En: Hendrickx, M.E.G.; Knorr, D. (eds). *Ultra High Pressure Treatments of Foods*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, 23–51.
- Vásquez-Caicedo, A.L.; Heller, A.; Neidhart, S.; Carle, R. 2006. Chromoplast morphology and β -carotene accumulation during postharvest ripening of mango cv. 'Tommy Atkins'. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 5769–5776.
- Wahid, A.; Gelani, S.; Ashraf, M.; Foolad, M.R. 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61: 199–223.
- Waldron, K.W. 2001. Useful ingredients from onion waste. *Food Science and Technology*, 15(2): 38–41.
- Weemaes, C.; Ludikhuyze, L.; Van den Broeck, I.; Hendrickx, M. 1998. High pressure inactivation of polyphenoloxidase. *Journal of Food Science*, 63: 873–877.
- Wennberg, M.; Nyman, M. 2004. On the possibility of using high pressure treatment to modify physicochemical properties of dietary fibre in white cabbage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5: 171–177.
- 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.
- Yaldagard, M.; Mortazavi, S.A.; Tabatabaie, F. 2008. The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology*, 7(16): 2739–2767.
- Yamada, M.; Taira, S.; Ohtsuki, M.; Sato, A.; Iwanami, H.; Yakushiji, H.; Wang, R.; Yang, Y.; Li, G. 2002. Varietal differences in the ease of astringency removal by carbon dioxide gas and ethanol vapor treatments among Oriental astringent persimmons of Japanese and Chinese origin. *Scientia Horticulturae*, 94: 63–72.
- Zavrtanik, M.; Hribar, J.; Vidrih, R. 1999. Effect of short anoxia exposure on metabolic changes of persimmon fruits (*Diospyros kaki*. L). *Acta Horticulturae*, 485: 405–411.

VII. ABREVIATURAS

APH	Altas presiones hidrostáticas
C*	Saturación o croma
CLSM	Microscopía láser confocal de barrido
Cryo-SEM	Microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas
FST	Fenoles solubles totales
h	Tono o matiz
L*	Luminosidad
LM	Microscopía óptica
PG	Poligalacturonasa
PME	Pectinametilesterasa
POD	Peroxidasa
PPO	Polifenoloxidasa
PPS	Porcentaje de proteína soluble
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SST	Sólidos solubles totales
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TS	Taninos solubles

