



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA**

**DOCTORADO EN NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS**

**“INFLUENCIA DE LAS TÉCNICAS CULINARIAS SOBRE EL
CONTENIDO DE POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN
HORTALIZAS DE LA DIETA MEDITERRANEA”**

Memoria que presenta
Jessica del Pilar Ramírez Anaya
Para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Granada

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Jessica del Pilar Ramírez Anaya
D.L.: GR 512-2014
ISBN: 978-84-9028-821-4

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

El Director del Departamento, Dr. Miguel Navarro Alarcón CERTIFICA:

Que el presente trabajo de Investigación que lleva por título “Influencia de las técnicas culinarias sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante en hortalizas de la dieta mediterránea” ha sido desarrollado en el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, por la Maestra Jessica del Pilar Ramírez Anaya.

Dr. Miguel Navarro Alarcón

Granada, 2013

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

Directores de la Tesis Doctoral

Dra. Herminia López García de la Serrana

Dra. Marina Villalón Mir

Dra. Cristina Samaniego Sánchez

Memoria presentada por la Maestra Jessica del Pilar Ramírez Anaya

Aspirante al Grado de Doctor

Granada 2013

AGRADECIMIENTOS

A mis paladines de nivel 85...

Cristóbal y Emiliano

INFLUENCIA DE LAS TÉCNICAS CULINARIAS SOBRE EL CONTENIDO DE POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN HORTALIZAS DE LA DIETA MEDITERRANEA

RESUMEN

Los compuestos fenólicos constituyen poderosos antioxidantes de presencia exclusiva en alimentos de origen vegetal. Al garantizar un aporte en la dieta complementan la actividad de las defensas antioxidantes endógenas, ayudando a la prevención de enfermedades crónico-degenerativas. El aceite de oliva virgen extra (AOVE) es un alimento básico de la dieta española y un aporte importante de fenoles cuya acción es esencial en los beneficios a la salud que proporciona la Dieta Mediterránea. La patata, el tomate, la berenjena y la calabaza también son alimentos de consumo frecuente, la primera destaca como fuente de carbohidratos complejos, y el resto por su aporte de vitaminas, minerales y compuestos bioactivos no nutritivos. Las técnicas culinarias a las que son sometidos los alimentos y el AOVE, previo a su consumo, causan cambios en la retención de la capacidad antioxidante (CA) y en el contenido de fenoles (CF), que no son considerados al hacer la elección de la técnica culinaria.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar los cambios que ocurren en la CA (Método DPPH, ABTS, FRAP y DMPD) y el CF (totales por el método de Folin Ciocalteu e individuales por HPLC) en cuatro hortalizas crudas de la Dieta Mediterránea (patata, berenjena, tomate y calabaza), como resultado de la aplicación de cuatro técnicas culinarias de uso frecuente en los hogares (fritura, rehogado, cocción en agua y cocción en agua-aceite (AA)), también fueron estudiados los cambios que ocurren en el AOVE y en el agua empleados durante los ensayos como medio de transferencia de calor. Para la comparación estadística de los resultados se estableció un nivel de probabilidad de 0,05 y, además, fueron aplicadas técnicas de análisis multivariado (Cluster analysis y análisis discriminante).

El método de cuantificación originó variaciones en la magnitud de la CA; sin embargo fueron los métodos FRAP y DPPH los que mostraron las mejores correlaciones significativas ($r = 0,7036$ y $r = 0,7788$, respectivamente) con el CF totales y con el de algunos fenoles individuales como los ácidos clorogénico, caféico, hidroxibenzóico, p-cumárico y en el caso de la CA medida por el método DPPH, también con el pinorresinol. Las técnicas culinarias generaron efectos de incremento, reducción ($p < 0,05$) y protección ($p > 0,05$) del CF totales e individuales y de la CA, también el enriquecimiento del perfil cualitativo de los fenoles de las hortalizas, el AOVE y el agua. En las hortalizas fueron más frecuentes los incrementos en la CA y en el CF como resultado de la mayor disponibilidad de los propios fenoles y, adicionalmente en las técnicas que incluyen AOVE, por la absorción de los presentes en el aceite en conjunto con un efecto de concentración. La clasificación de acuerdo a la frecuencia de incrementos fue la siguiente: fritura (80,8 %) > rehogado (58,9 %) > cocción AA (38,4 %) > cocción (23,3 %). En el AOVE se detectó una mayor proporción de pérdidas de la CA y de la CF, fue el rehogado el que ocasionó el mayor porcentaje de pérdidas en el aceite (44 %), le siguió la cocción AA (42 %) y la fritura (29 %). El agua de cocción incorporó compuestos fenólicos que se diluyeron desde la hortaliza y el AOVE. Así se observó que la cocción de hortalizas enriquece el perfil cualitativo y cuantitativo del agua de cocción y la adición de AOVE lo enriquece aún más con los fenoles propios de este aceite, por ello es altamente recomendable el consumo de las hortalizas junto con el agua de cocción.

ABREVIATURAS

A_{λ}	Absorción leída en espectrofotómetro
ABTS	Ácido 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
AH	Antioxidante
AOVE	Aceite de oliva virgen extra
Abs_f	Absorbancia final
Abs_i	Absorbancia inicial
°C	Grado centígrado o Celsius
CA	Capacidad antioxidante
CEE	Comunidad económica europea
cm	Centímetro
cocción AA	Cocción en mezcla de agua y aceite de oliva virgen extra
c	Concentración de la disolución
DMPD	Dicloruro de 4-amino-N,N-dimetilfenilenediamina
DPPH	1,1-difenol-2-picrilhidrazil
$E_{1cm}^{1\% \lambda}$	Extinción específica a la longitud de onda λ
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ET	Equivalentes de Trólox
e	Espesor de la cubeta
FRAP	2,4,6-tripiridil-S-triazina
fd	Factor de dilución
g	Gramo
HPLC	High performance liquid chromatography
h	Hora
Kg	Kilogramo
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
l	Litro
meq	Miliequivalentes
mg	Miligramo
m.h.	Masa húmeda
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
M	Mol
nm	Nanómetro
N	Normalidad
N_d	Normalidad deseada
N_t	Normalidad teórica
P	Índice de peróxidos
$P.M.$	Peso molecular
P	Probabilidad
p	Peso
ppm	Partes por millón
p/v	Peso sobre volumen
R^{\bullet}	Radical

s	Segundo
r	Coeficiente de correlación
r _{min}	Riqueza mínima
rpm	Revoluciones por minuto
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente al Trolox
TPTZ	2,4,6-tripiridil-S-triazina
UV - IR	Ultravioleta - infrarrojo
UV-VIS	Ultravioleta - visible
u.a.	Unidades de absorbancia
V	Volumen
V ₀	Volumen gastado
λ	Longitud de onda
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μmol	Micromol

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTIOXIDANTES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .	
1.1. Sistemas de defensa antioxidante.....	3
1.2. Capacidad antioxidante (CA).....	7
1.3. Mecanismo de reacción de los antioxidantes.....	8
1.4. Métodos para la medida de la capacidad antioxidante.....	10
1.4.1. Capacidad captadora de radicales libres con la 2,2-Difenil-1 picrilhidrazil (DPPH) (Capacidad captadora del radical DPPH).....	11
1.4.2. FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power).....	13
1.4.3. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS (ácido2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico).....	15
1.4.4. Ensayo DMPD (N,N-dimetil-p-fenilendiamina).....	18
1.5. Antioxidantes alimentarios.....	19
1.5.1. Carotenos.....	21
1.5.2. Vitamina C.....	23
1.5.3. Vitamina E.....	25
1.5.4. Productos de las reacciones de Maillard.....	26
1.5.5. Compuestos fenólicos.....	28
1.5.6. Polifenoles y capacidad antioxidante.....	32
2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA DIETA ESPAÑOLA.	
2.1. Generalidades sobre la dieta Mediterránea.....	35
2.2. Alimentos con mayores tasas de capacidad antioxidante.....	39
2.3. Capacidad antioxidante de la dieta española.....	43
2.4. Rueda antioxidante de los alimentos.....	46
3. DESCRIPCION GENERAL, DISTRIBUCIÓN Y CONTENIDO DE SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES EN HORTALIZAS (Patata, Calabaza, Tomate, Berenjena) Y ACEITE DE OLIVA.	
3.1. Generalidades del aceite de oliva.	
3.1.1. Origen del olivo.....	49
3.1.2. Características botánicas de olivo.....	49
3.1.3. Producción de aceite de oliva.....	50
3.1.4. Proceso de obtención del aceite de oliva.....	52
3.1.5. Definición y clasificación del aceite de oliva.....	53
3.1.6. Composición química del aceite de oliva virgen extra.....	57
3.1.7. Distribución y contenido de sustancias antioxidantes en el aceite de oliva virgen extra.....	59
3.2. Generalidades de la patata.	
3.2.1. Origen de la patata.....	61

3.2.2.	Descripción botánica de la patata.....	61
3.2.3.	Producción de patata.....	62
3.2.4.	Composición química de la patata.....	64
3.2.5.	Distribución y contenido de sustancias antioxidantes en la patata.....	66
3.3.	Generalidades de la berenjena.	
3.3.1.	Origen de la berenjena.....	67
3.3.2.	Descripción botánica de la berenjena.....	68
3.3.3.	Producción de Berenjena.....	69
3.3.4.	Composición química de la berenjena.....	70
3.3.5.	Distribución y contenido de sustancias antioxidantes en la berenjena.....	71
3.4.	Generalidades del tomate.	
3.4.1.	Origen del tomate.....	74
3.4.2.	Descripción botánica del tomate.....	75
3.4.3.	Producción de Tomate.....	75
3.4.4.	Composición química del tomate.....	77
3.4.5.	Distribución y contenido de sustancias antioxidantes en el tomate.....	78
3.5.	Generalidades de la calabaza.	
3.5.1.	Origen y descripción botánica de la calabaza.....	81
3.5.2.	Producción de calabaza.....	81
3.5.3.	Composición química de la calabaza.....	82
3.5.4.	Distribución y contenido de sustancias antioxidantes en la calabaza.....	83
4.	ELABORACION CULINARIA DE ALIMENTOS.	
4.1.	Naturaleza del proceso de cocción.....	87
4.2.	Clasificación de las técnicas de cocción según el medio de transferencia de calor.....	90
4.3.	Efecto de la elaboración culinaria sobre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante de las hortalizas.....	96
4.4.	Efecto de la elaboración culinaria sobre el aceite de oliva.....	98
II.	OBJETIVOS.....	101
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	105
1.	ESTUDIO DEL EFECTO DE TRATAMIENTOS CULINARIOS EN EL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL AOVE Y HORTALIZAS.	
1.1.	Técnicas culinarias aplicadas en la elaboración de las hortalizas.	
1.1.1.	Material.....	106
1.1.2.	Métodos de Aplicación de Técnicas Culinarias.....	108
1.2.	Métodos de análisis de humedad, grasa y materia seca en las fracciones (fracción sólida y medios de cocción) tras la aplicación de las técnicas culinarias de elaboración.	
1.2.1.	Material.....	113

1.2.2.	Métodos.....	114
1.3.	Obtención de extractos metanólicos a partir de las fracciones resultantes obtenidas tras la aplicación de las técnicas culinarias de elaboración.	
1.3.1.	Materiales.....	116
1.3.2.	Métodos.....	117
1.4.	Métodos de análisis para la concentración de fenoles totales en extractos metanólicos y agua.	
1.4.1.	Material.....	118
1.4.2.	Métodos.....	119
1.5.	Métodos de análisis por HPLC para fenoles en extractos metanólicos de AOVE, hortalizas y en el agua de cocción.	
1.5.1.	Material.....	121
1.5.2.	Método cromatográfico por HPLC.....	123
1.6.	Métodos para evaluar la actividad antioxidante en extractos metanólicos de AOVE y hortalizas y en el agua de cocción.	
1.6.1.	Material.....	128
1.6.2.	Métodos.....	162
1.7.	Determinaciones complementarias en el aceite de oliva virgen extra crudo.	
1.7.1.	Material	141
1.7.2.	Métodos para la determinación del estado de oxidación del aceite.....	142

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

1.	CINÉTICAS DE TEMPERATURA.	
1.1.	Valoración de las cinéticas de temperatura en los experimentos.....	151
2.	CUANTIFICACIÓN DE HUMEDAD, GRASA Y EXTRACTO SECO EN LAS FRACCIONES (HORTALIZA, ACEITE OLIVA VIRGEN EXTRA Y AGUA).	
2.1.	Contenido de humedad en las diferentes fracciones.....	155
2.2.	Contenido de grasa en las distintas fracciones.....	157
2.3.	Contenido de extracto seco en las distintas fracciones.....	159
3.	ESTUDIO DE LOS FENOLES TOTALES Y COMPUESTOS FENÓLICOS.	
3.1.	Cuantificación de la concentración de fenoles totales.....	163
3.2.	Estudio de los compuestos fenólicos por HPLC.....	168
3.2.1.	Compuestos Fenólicos exclusivos del aceite de oliva Virgen extra	178
3.2.2.	Compuestos fenólicos exclusivos de las verduras y hortalizas.....	193
3.2.3.	Compuestos fenólicos de presencia tanto en aceite de oliva virgen extra como en hortalizas.....	207
3.3.	Estudio de las frecuencias de cambios en los fenoles analizados.....	231
4.	ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CA).	
4.1.	Evaluación de la capacidad antioxidante con el método DPPH.....	239

4.2.	Evaluación de la capacidad antioxidante con el método ABTS.....	246
4.3.	Evaluación de la capacidad antioxidante con el método FRAP.....	253
4.4.	Evaluación de la capacidad antioxidante con el método DMPD.....	260
5.	ANÁLISIS MULTIVARIADO.	
5.1.	Análisis de conglomerados (Cluster analysis).....	269
5.1.1.	Elección del método de análisis y del algoritmo de medida de la distancia entre conglomerados.....	270
5.1.2.	Definición del número de conglomerados.....	272
5.1.3.	Análisis de los conglomerados.....	277
5.2.	Análisis discriminante.....	284
5.2.1.	Análisis discriminante según la técnica culinaria.....	285
5.2.2.	Análisis discriminante según la hortaliza.....	292
6.	DETERMINACIONES COMPLEMENTARIAS.	
6.1.	Análisis periódico del estado de oxidación del aceite de oliva virgen extra durante el almacenamiento previo a la experimentación.....	301
V.	CONCLUSIONES.....	307
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	311
VII.	PUBLICACIONES Y CONGRESOS.....	347

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTIOXIDANTES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CA).

1.1. Sistemas de defensa antioxidante.

Para los organismos aerobios la oxidación es esencial en la obtención de la energía necesaria para realizar procesos biológicos. Sin embargo, la producción descontrolada de radicales libres derivados del oxígeno es hostil y dañina para las células y sus funciones; y es el origen de una reacción en cadena que da lugar a la generación de nuevos radicales libres que causan cambios o transformaciones oxidativas (Jin-wei et al., 2005).

Un radical libre es cualquier especie, cargada o no, que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado en su orbital más externo, lo que les confiere un carácter de moléculas inestables y altamente reactivas (Venereo, 2002). Los radicales libres cuya actividad es considerada como biológicamente relevante son los derivados del Oxígeno: el radical peróxido, RO^{\bullet} ; el anión superóxido, $O^{\bullet-}_2$; el radical hidroxilo, HO^{\bullet} (Roginsky y Lissi, 2005). También existen especies reactivas con N, como el peroxinitrito ($ONOO^-$), formado por la reacción entre el óxido nítrico y el superóxido o el dióxido de nitrógeno (NO_2), y con Cl como el triclorometilo (CCl_3^{\bullet}) (Prior et al., 2005; Sánchez-Moreno, 2002). El anión superóxido, puede producirse en múltiples reacciones intracelulares. Esta especie reactiva de oxígeno, se transforma en otras especies destructivas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o peróxidos lipídicos (LOO^{\bullet}) que pueden, en su momento, causar daño celular.

Un antioxidante se define como aquel compuesto que previene la oxidación de moléculas susceptibles y que puede ser de producción endógena o ser aportado a través de la dieta (FAO/WHO, 1998 en Dilis and Trichopoulou, 2010a). Antioxidantes de reacción directa como son la vitamina E y las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, o la glutatión peroxidasa reducen esos oxidantes (Fig. 1.1-1), otros cofactores como el glutatión, el ascorbato y las enzimas dependientes del NADPH como la glutatión reductasa son importantes para regenerar las moléculas/enzimas reducidas (Finley et al., 2011).

La producción del ion superóxido ocurre principalmente en la mitocondria celular. Por otra parte, el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) es la forma neutra del ion hidróxido; este ion es altamente reactivo, lo que lo hace peligroso. Por eso cuando es producido in vivo el ión $\cdot\text{OH}$ reacciona cerca de su sitio de formación (Finley et al., 2011).

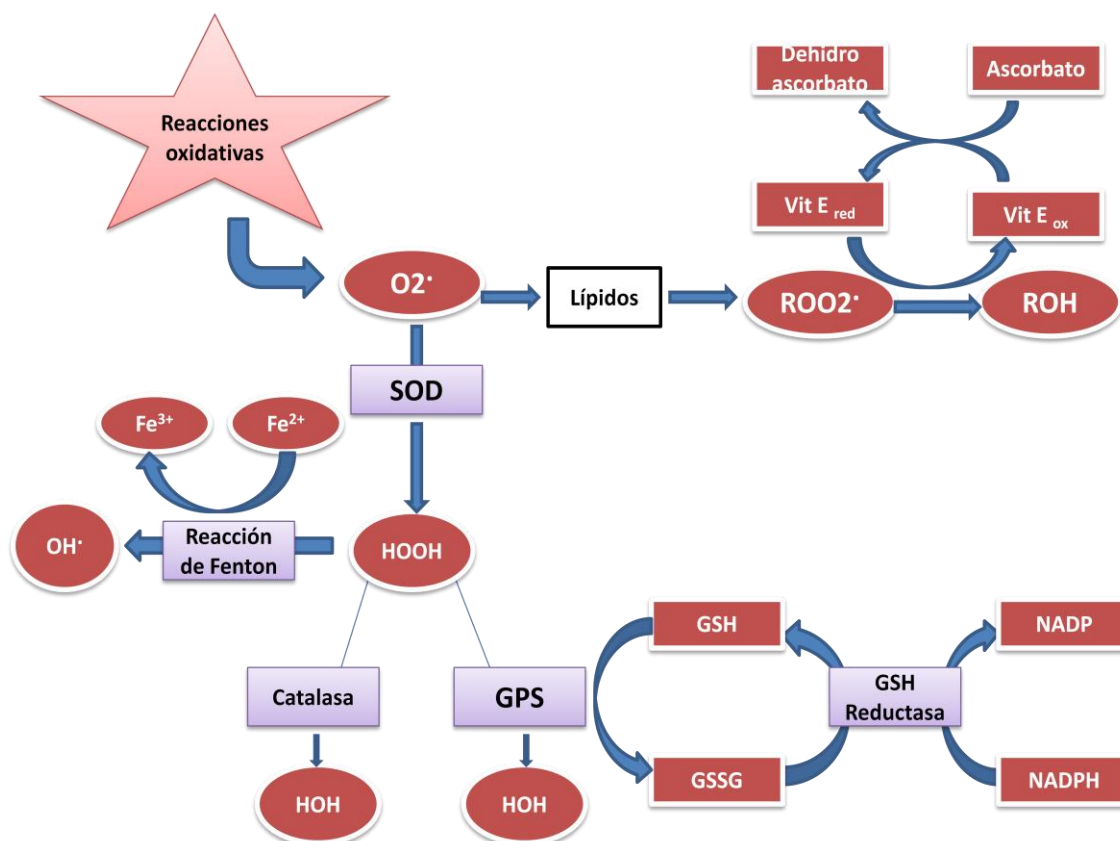
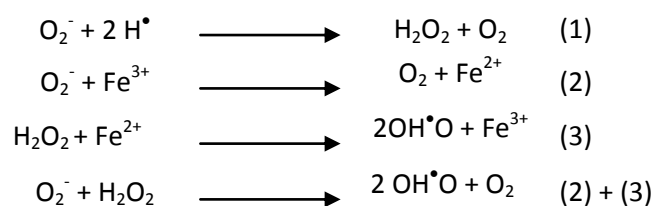


Figura 1.1-1. Esquema simplificado de la teoría antioxidante tradicional.

Bajo condiciones de estrés, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ actúa como un oxidante ya que favorece a que el Fe^{2+} contenido en diversas moléculas quede disponible para la reacción de Fenton facilitando, finalmente, la producción de $\cdot\text{OH}$ a partir de H_2O_2 (Valko et al., 2005; Leonard et al., 2004). El radical superóxido también participa en la reacción de Haber-Weiss produciendo el radical hidroxilo:



Otros radicales reactivos derivados del oxígeno que se pueden formar en sistemas vivientes son los radicales peroxilo (ROO^\bullet), el peroxilo más simple es HOO^\bullet , llamado radical hidroperoxil o perhidroxil que es la forma protonada del ion superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$ (De Grey, 2002); el radical hidroperoxil inicia la peroxidación lipídica.

Cuando hay un exceso en la producción de radicales libres, estos pueden afectar a las enzimas protectoras, causando efectos de destrucción y muerte celular por oxidación de la membrana lipídica, proteínas, DNA y enzimas que intervienen en la respiración celular; esta serie de efectos está asociada a la aparición de condiciones patológicas como cáncer, aterosclerosis, diabetes, neurodegeneración, degeneración macular y envejecimiento (Andersen, 2004; Giorgio et al., 2005; Sablina et al., 2005; Hernández-García et al., 2010; Navarrete et al. 2011; Andrade and Assuncao, 2012; Curtis et al., 2012; Haque et al., 2012; Matés et al., 2012). La oxidación también afecta a los alimentos, siendo la causa principal del deterioro químico, originando enranciamiento y reducción de la calidad nutricional, color, sabor, textura e inocuidad (Laguerre et al., 2007).

Para contrarrestar las especies de oxígeno reactivo y prevenir el daño que ocasionan a las moléculas biológicas, especialmente al DNA, lípidos y proteínas, todos los organismos aerobios están dotados con sistemas de defensa antioxidante (Wang et al., 1996). Los antioxidantes biológicos se definen como “aquellas moléculas que cuando están presentes en bajas concentraciones respecto a las biomoléculas que protegen, pueden prevenir o reducir la destrucción oxidativa de las biomoléculas” (Huang et al., 2005).

Las defensas antioxidantes son de tipo enzimático y no enzimático. La primera defensa antioxidante es intracelular y es principalmente de tipo enzimático; está controlada genéticamente por un sistema de retroalimentación en el que participan pequeñas concentraciones de radicales libres de origen endógeno (Gonchar and Mankovska, 2010; Zhang et al., 2010).

Las enzimas antioxidantes requieren de la presencia de metales como Cu, Fe, Mg, Zn, o Se para su acción, por esto se les llama en ocasiones metales antioxidantes. Las más importantes son la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. La segunda barrera antioxidante es

Introducción

de tipo no enzimática y viene dada por compuestos antioxidantes que actúan tanto a nivel celular como extracelular. Son los responsables de la capacidad antioxidante (CA) de los fluidos biológicos, como el plasma y de la protección frente al daño oxidativo de las distintas partículas y macromoléculas circulantes (Valko et al., 2007).

A diferencia de las enzimas antioxidantes, las sustancias antioxidantes se modifican al reaccionar con los radicales libres y necesitan ser reabastecidas; es decir se agota su concentración. Algunos de origen endógeno, como son glutatión, bilirrubina, hormonas sexuales estrogénicas, ácido úrico, coenzima Q, melanina, melatonina, ubiquinol y ácido lipóico son reemplazados por síntesis (Laguerre et al., 2007). Si son de origen exógeno, requieren ser reabastecidos a través de la dieta una vez que se agotan; estos compuestos antioxidantes, denominados como “antioxidantes alimentarios” son fundamentales para la prevención de enfermedades ya que son fácilmente modificables.

La actividad de algunos antioxidantes alimentarios está bien establecida como en el caso de la vitamina C, la vitamina E y de los carotenoides y el Se; y la de otros compuestos, particularmente los polifenoles, aun sigue siendo objeto de estudios (Jin-wei et al., 2005; López, 2003).

Cuando en el organismo aumenta la producción de radicales libres, debido a causas exógenas (contaminantes ambientales o alimentarios, radiación) o endógenas (ejercicio excesivo, estrés psicológico o hipermetabolismo) las enzimas antioxidantes y algunas de las sustancias endógenas antioxidantes como la ferritina y ceruloplasmina (antioxidantes primarios) previenen la formación de nuevos radicales libres. Pero cuando ocurre superproducción de radicales libres y los antioxidantes primarios son desbordados, son los antioxidantes secundarios los encargados de prevenir las reacciones en cadena; entre estos últimos se incluyen sustancias antioxidantes endógenas como el ácido úrico, bilirrubina y albúmina y exógenos como la vitamina E, C, y el β -caroteno; todos ellos son extracelulares, presentan el menor peso molecular y en su mayoría provienen de la dieta (Poljsak, 2011).

1.2. Capacidad antioxidante (CA).

El interés en la cuantificación de la actividad antioxidante de diversos productos naturales surgió a partir de 1990 cuando se reconoció que la influencia benéfica de muchos alimentos y bebidas incluidas las frutas, hortalizas, té, vino tinto, café y cacao en la salud humana está asociada con la actividad antioxidante de algunos compuestos naturalmente presentes. Actualmente la CA de muchos productos naturales se considera un parámetro significativo que condiciona el valor dietario (Roginsky y Lissi, 2005).

La actividad antioxidante de un compuesto es un proceso químico que depende de sus propiedades redox, de partición, quelantes, como donador de hidrógeno y como captador de radicales. Idealmente, todas esas propiedades deberían medirse en cada componente para valorar la actividad antioxidante total. En la práctica, se han desarrollado diversos ensayos para conjugar las propiedades en una sola estimación de la CA (Laguerre et al., 2007; Williamson et al., 1999).

No existe un método estándar para las determinaciones en diferentes tipos de muestras de alimentos, pero hay una serie de requisitos que cualquiera de ellos debe cubrir (Roginsky y Lissi, 2005):

- Que el parámetro determinado posea un significado físico evidente, sustentado en una teoría bien desarrollada.
- Que las determinaciones sean reproducibles no solo en un trabajo, sino entre laboratorios.
- La posibilidad de un monitoreo continuo que permita automatizar el proceso y observar con todo detalle la cinética de los antioxidantes.
- Una productividad suficiente que facilite la realización de determinaciones rutinarias.
- Un procedimiento relativamente sencillo.

Introducción

Los mecanismos de acción de los compuestos antioxidantes incluyen (Dillis and Trochopoulou, 2010; Leonarduzzi et al., 2010):

- La inhibición/captación de especies reactivas.
- La reducción y la acción quelante de metales.
- Un mecanismo propuesto recientemente que es independiente de las propiedades antioxidantes consiste en la interacción química directa el “antioxidante” con enzimas de señalización y factores de transcripción.

1.3. Mecanismo de reacción de los antioxidantes.

Los antioxidantes pueden inactivar los radicales a través de dos vías principales: reacciones de transferencia de un átomo de H (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer SET).

El resultado final es el mismo, pero difieren en la cinética y en las reacciones colaterales. Ambos tipos de reacciones pueden ocurrir paralelamente, y el mecanismo dominante tendrá que ser determinado a través de la estructura y propiedades del antioxidante; la solubilidad, el coeficiente de partición, el solvente del sistema, la energía de disociación y el potencial de ionización (Prior et al., 2005). Los dos últimos factores, son los más importantes para determinar el mecanismo de reacción y la eficacia (Wright et al. 2001). Ya que la CA de un alimento está determinada por un mezcla de diversas sustancias con diferentes mecanismos de acción, entre las cuales puede haber interacciones sinérgica, es necesario combinar más de un método para determinar la CA *in vitro* (Pérez-Jiménez et al., 2008).

Las reacciones HAT son del tipo:



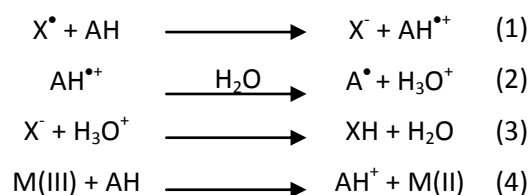
En donde X^{\bullet} es el radical libre y AH el antioxidante

Estas reacciones vienen determinadas por la entalpía de disociación del grupo donador de H en la molécula antioxidante. La capacidad de reacción se basa en una cinética en la que el antioxidante y el sustrato compiten por radicales peroxilo térmicamente generados a través de la decomposición de azo-compuestos (Huang et al., 2005).

Son reacciones dependientes del pH y el solvente, usualmente son muy rápidas (minutos o segundos). La presencia de agentes reductores incluidos los metales complica la reacción y pueden dar lugar a una sobreestimación de la reactividad.

Entre estos ensayos se incluyen el de la inhibición de la autoxidación de lipoproteínas de baja densidad, el ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Prior et al., 2005), TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter) (Serafini et al., 2000), CBA (Crocin Bleaching Assays) (Bors et al., 1984), CARS (Capacidad Captadora de Radicales Superóxido) (Benov et al., 1998), TOSC (Total Oxidant Scavenging Capacity) (Winston et al., 1998), TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Species) (Fernández et al., 1997), Oxidación de LDL (Kleinveld et al., 1992), β -caroteno (β -carotene bleaching test) (Velioglu et al., 1998), PHOTOCHEM (Fotoquimioluminiscencia) (Popov et al., 1994; 1999).

En las reacciones SET el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales; serían reacciones como las que se describen enseguida, siendo de nuevo X^\bullet el radical libre y AH el antioxidante:



La reactividad en las reacciones SET se basa principalmente en la deprotonación y el potencial de ionización del grupo funcional reactivo, en general son reacciones dependientes del pH, son lentas y pueden requerir largos tiempos para completarse, por ello los cálculos de la capacidad antioxidante se basan en el porcentaje de reducción del producto más que en la cinética.

Cuando $AH^{*\bullet}$ tiene suficiente tiempo de vida, las reacciones secundarias representan una interferencia significativa para el ensayo, también son muy sensibles a la presencia de trazas de contaminantes y otros componentes (particularmente metales) que pueden convertirse en la causa de una alta variabilidad, pobre reproductibilidad y poca consistencia de los resultados.

Entre los ensayos basados en reacciones SET están, la determinación de fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1965), ABTS/TEAC (Trolox Equivalence Antioxidant Capacity) (Miller et al., 1993), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (Benzie and Strain, 1996), el DPPH (Brand-Williams et al., 1995) y el DMPD (N,N-dimetil-p-fenilendiamina) (Fogliano et al., 1999) y la PHOTOCHEM (Fotoquimioluminiscencia) (Popov et al., 1994; 1999).

1.4. Métodos para la medida de la capacidad antioxidante.

Los métodos utilizados para evaluar la capacidad antioxidante de una sustancia se clasifican en dos grandes grupos. Se conocen como “métodos indirectos” a aquellos generalmente usados para medir la capacidad de una molécula de reducir un radical libre artificial y estable (por transferencia de hidrógeno o electrones), o un metal de transición (por transferencia de electrones). Algunos ejemplos de estos métodos son el DPPH, y los ensayos de poder antioxidante por reducción del hierro férrico, así como la voltametría cíclica. Por otro lado, la evaluación por “métodos directos” involucra un sustrato oxidable; se basan en la evaluación del efecto inhibitorio de una sustancia potencialmente antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sustrato en un sistema de prueba sujeto a condiciones naturales o aceleradas de oxidación. Este tipo de aproximación parcialmente modelada se combina con una estrategia de medición basada en la detección de los productos de oxidación (Laguerre et al., 2007).

Los métodos de cuantificación de uso más extendido son el del poder antioxidante del hierro reductor (FRAP); el del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfónico) (ABTS o TEAC); el del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH); y el de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) (Pérez-Jiménez et al., 2008). También ha encontrado aplicación una versión de la prueba ABTS en la que el radical $ABTS^{\bullet}$ fue reemplazado por el radical catiónico estable $DMPD^{\bullet}$. Enseguida se describen con mayor detalle los cuatro métodos utilizados en este estudio.

1.4.1. Capacidad captadora de radicales libres con la 2,2-difenil-1 picrilhidrazil (DPPH) (Capacidad captadora del radical DPPH).

Este es el ensayo indirecto de la actividad antioxidante más antiguo, actualmente es muy popular en el estudio de antioxidantes naturales por proporcionar resultados en tiempos relativamente cortos, por su sencillez y sensibilidad y junto con el ABTS es de los más fáciles de implementar (Jin-wei et al., 2005).

Fue probado por Blois (1958) por primera vez para medir la capacidad antioxidante de diversos compuestos naturales. El fundamento se basa en medir la capacidad de una muestra de captar radicales libres, consiste en una reacción que al mismo tiempo es de transferencia de electrones y de átomos de hidrógeno (SET y HAT).

Su principio se sustenta en la teoría de que un antioxidante es un donador de hidrógeno y en el hecho de que el DPPH es un aceptor de hidrógeno estable (Fig. 1.4-1), siendo el efecto antioxidante proporcional a la decoloración del DPPH en muestras problema (Brand-Williams et al., 1995).

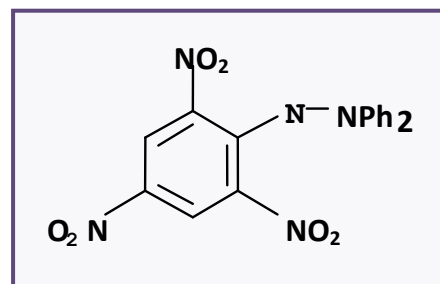


Figura 1.4-1. Estructura química del DPPH

La cuantificación de la cantidad de DPPH en el sistema de prueba se realiza con exactitud espectrofotométricamente en la longitud de onda de 515 nm; conforme el color del sistema cambia de violeta a amarillo como resultado de la captación de los átomos de hidrógeno del antioxidante por el DPPH.

Introducción

Esta reacción es estequiométrica con respecto al número de átomos de hidrógeno absorbidos y, por ello, el efecto antioxidante de una muestra se evidencia con la reducción progresiva de la absorción de la luz UV a 515 nm durante 30 min o hasta que la absorbancia se estabiliza.

Para estandarizar los resultados reportados en varios estudios, se usa como unidad el equivalente de Trolox (TE); la actividad antioxidante de una muestra se expresa en términos de micromoles de equivalentes de Trolox por 100 g de muestra (TE/100 g). Los resultados también se han reportado como IC₅₀, que es la cantidad de antioxidante necesario para reducir hasta el 50 % la concentración inicial de DPPH (Koşar et al., 2005; Joon-Kuan and Shibamoto, 2009).

Algunas de las principales desventajas asociadas al método DPPH son (Prior et al., 2005):

- La interpretación es complicada cuando los compuestos analizados tienen espectros de absorción similares al DPPH (515 nm); en particular los carotenos interfieren.
- Puede haber un obstáculo estérico para moléculas con alto peso molecular; y el acceso al sitio del radical es más accesible para las moléculas pequeñas.
- El radical usado no tiene significado biológico pues no está presente *in vivo* y además es bastante estable respecto a los que se encuentran en los organismos vivos.
- La reacción no es competitiva porque el DPPH es al mismo tiempo radical de prueba y antioxidante. Por lo tanto el color puede desaparecer tanto por reacciones con el radical como por reducción del compuesto o también por que participe en otras reacciones no relacionadas.

Este método representa un recurso fácil y preciso para el análisis de sustancias antioxidantes puras como el BHT, TBHQ, ácido rosmarínico y α -tocoferol (Alamed, et al., 2009); y de extractos acuosos y alcohólicos de fracciones o alimentos de origen vegetal como por ejemplo bebidas a base de algas o té negro y blanco (Nagai et al., 2003). O comparar la actividad antioxidante de extractos que contienen fenoles libres con los que contienen fenoles ligados como se hizo en harina de alforfón (Inglett et al., 2011).

Se aplica también en el análisis de alimentos de consumo común como cacao, frutos secos, uvas y sus fracciones (Pérez-Jiménez et al., 2008), AOVE (Samaniego-Sánchez et al., 2012) hierbas de uso culinario (Koşar et al., 2005), té verde (Samaniego-Sánchez et al., 2011), y de otros alimentos de consumo menos extendido como algunos frutos exóticos brasileños (De Assis et al., 2009) o de importancia reducida por ser autóctonos o de consumo local (Jin-wei et al., 2005).

Se analizan también sustancias y materiales diversos como plantas medicinales, polen y resinas (Nagai et al., 2002; Dudonné et al., 2009). Es uno de los ensayos aplicados para la caracterización de diversas estructuras vegetales como hojas, tallos, raíces, rizomas, vainas y madera de plantas de interés alimentario como la patata o la fresa (Simirgiotis and Schmeda-Hirschmann, 2010; Joong-Keun et al., 2011).

Durante el cultivo se aplica para comparar frutas y hortalizas producidas con el sistema orgánico y con el convencional (Faller and Fialho, 2009, 2010). Durante el procesamiento para obtener datos que permitan el monitoreo de las condiciones que optimizan la capacidad antioxidante a nivel industrial y a nivel doméstico (Gorinstein et al., 2009); y que ayuden a elucidar la contribución de compuestos individuales después de las transformaciones (Dini et al., 2010; Tiong et al., 2010).

1.4.2. FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power).

El mecanismo de acción del FRAP es totalmente de transferencia electrónica, se trata de una reacción SET, que se basa en la reducción del complejo de la tripiridiltriazina férrica (2,4,6-tripiridil-s-triazina) al complejo ferroso por un antioxidante a pH de 3,6 (Fig. 1.4-2) (Benzie and Strain, 1996; Floegel et al., 2011).

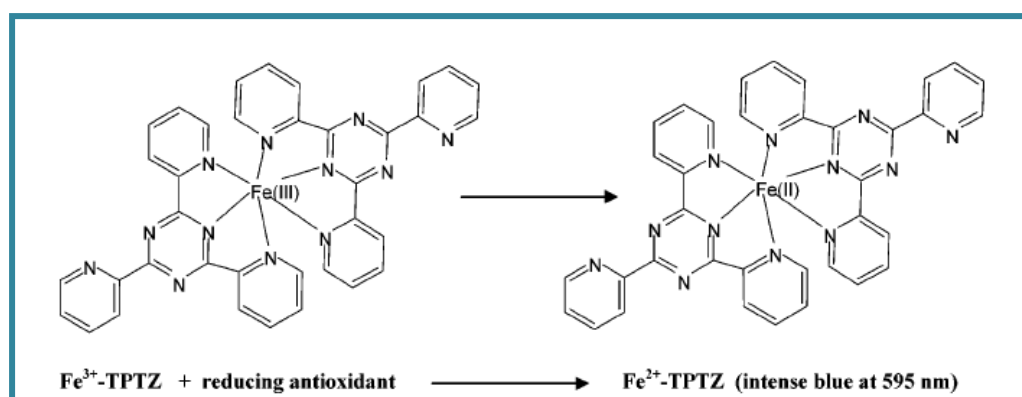


Figura 1.4-2. Reducción del reactivo FRAP.

Introducción

La preparación del oxidante se hace mezclando TPTZ, 25 mL de buffer de acetato, y 2,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20mM). El conglomerado es conocido como "reactivo FRAP". La solución final tiene Fe(III) de 1,67 mM y TPTZ de 0,83 mM. Por lo tanto, el TPTZ se encuentra en la proporción ideal para una estequiometría de reacción entre el Fe(III) y el TPTZ de 1 a 2. En este caso el oxidante no es solo el Fe(III)(TPTZ)_2 ; también contiene otras especies de Fe(III) que pueden crear problemas potenciales ya que muchos quelantes en alimentos pueden ligarse con el Fe(III) y formar complejos que son capaces de reaccionar con los antioxidantes (Huang et al., 2005).

Esta reacción produce un cambio de color que es monitorizado midiendo la absorbancia a 595 nm durante 4 minutos, según el método original, aunque este tiempo fue posteriormente ampliado hasta 30 minutos (Pulido, Bravo and Saura-Calixto, 2000), ya que a los 4 minutos los compuestos de reacción lenta (algunos fenoles) no la han completado (Prior et al., 2005).

El cambio en la absorbancia ($\Delta A = A_{n \text{ min}} - A_{0 \text{ min}}$) se calcula y relaciona con el ΔA de una solución estándar de Fe(II). El ΔA es linealmente proporcional a la concentración de antioxidante. Una unidad FRAP se define arbitrariamente como la reducción de 1 mol de Fe(III) a Fe(II) (Huang et al., 2005). Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol Trolox/g}$ o $\mu\text{mol Trolox/L}$), tras elaborar una curva de calibrado de este compuesto, un análogo hidrosoluble de la vitamina E muy utilizado en la expresión de resultados de capacidad antioxidante.

Se han planteado diversas críticas a este método:

- Se lleva a cabo a un pH no fisiológico (Prior and Cao, 1998a; Pulido et al., 2000).
- Como el potencial de reducción del Fe (III) a Fe (II) es de 0,77 V, cualquier compuesto con un potencial redox inferior podría reducir al Fe (III), sobreestimando el valor de FRAP (Ou et al., 2002).
- A 593 nm pueden absorber otros compuestos, como la bilirrubina oxidada, que produce biliverdina, elevando el valor FRAP (Prior and Cao, 1998; Ou et al., 2002).
- Hay compuestos como el ácido ascórbico que, además de reducir el ion férrico a ferroso, pueden reaccionar con éste último para generar nuevos radicales libres (Cao and Prior, 1998). Por ejemplo, en fluidos biológicos, el Fe (II) puede interactuar con agua oxigenada para producir radical hidroxilo (Ou et al., 2001).

- El método FRAP no mide antioxidantes tiol como el glutatión. Solo mide la capacidad reductora basada en el ion férrico, que no es ni fisiológica, ni mecanísticamente relevante para la actividad antioxidante (Prior et al., 2005).

En conjunto con otros métodos para la medida de la CA (ABTS y DPPH); este ensayo se ha aplicado en el estudio de las interacciones de la matriz alimentaria con los compuestos antioxidantes; (Sun-Waterhouse et al., 2008); del efecto que ejerce el medio de extracción y las sustancias bioactivas sobre la CA (Tian et al., 2009).

También es una herramienta en la exploración de las propiedades antioxidantes de productos nutraceuticos provenientes de fuentes naturales alternativas como algas (Díaz-Rubio et al., 2009), flores (Kaisson et al., 2011) o estructuras no comestibles de alimentos convencionales (Sulaiman et al., 2011). Se ha posicionado como uno de los análisis de rutina para calcular la capacidad antioxidante de la dieta, por ejemplo en 35 frutas y hortalizas de consumo tradicional en Uganda (Stangeland et al., 2010) y en 62 frutas chinas (Li et al., 2011).

1.4.3 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).

Es ampliamente usado para evaluar la actividad antioxidante en plantas, alimentos y bebidas debido a su utilidad tanto en fase acuosa como grasa y a que proporciona rápidamente los resultados más reproducibles empleando equipo de laboratorio relativamente común (Dudonné et al., 2009).

Inicialmente fue reportada la aplicación de este ensayo por Miller y colaboradores (1993) para medir el estatus antioxidante del plasma humano; más tarde fue comprobada la eficacia del ABTS en alimentos desarrollando un ensayo de decoloración (Miller et al., 1997).

Este método mide la capacidad que tiene una muestra de captar radicales libres, por lo tanto consiste en una reacción de transferencia de electrones (SET). Se usa para medir compuestos hidrofílicos aunque se han sugerido modificaciones al método original para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos lipofílicos de una muestra (Pulido et al., 2003).

Introducción

El fundamento del método es vigilar la reducción del radical catiónico ABTS^{•+} (Fig. 1.4-3) producida por la oxidación del 2,2'-azinobis(3-etilvenzotiazilina-6-sulfonato) (ABTS) causada por la adición de una muestra que contiene antioxidantes (Riginsky y Lissi, 2005).

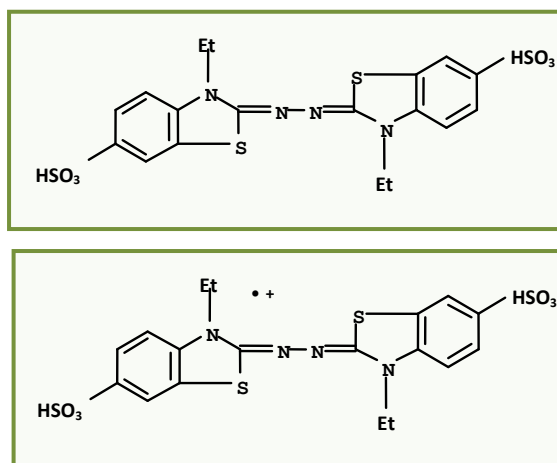


Figura 1.4-3. Estructura química del ABTS y del radical ABTS^{•+}

El método original estaba basado en la reacción del radical ferromioglobina con ABTS producido por la reacción de la metamioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de peroxidasa (Re et al., 1999). En la versión mejorada de este ensayo, antes de la adición de antioxidantes se obtiene un radical catiónico estable por oxidación a temperatura ambiente del ABTS en solución 7 mM agregando persulfato potásico 2.45 mM para obtener un cromóforo con absorción azul-verde. Cuando se realiza la mezcla se permite que reaccione en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 horas antes de usarla (Pulido et al., 2003).

Existen modificaciones de este método que consisten en la estrategia de generación del radical ABTS^{•+}. Se ha ensayado la generación enzimática del radical simultáneamente con la captación; observándose que la adición de muestras que contienen fenoles puede reducir la producción enzimática; esto ocasiona la sobreestimación del TEAC. Por lo que el autor recomendó separar en tiempo la producción del radical de su captación (De Beer et al., 2003).

Esta solución se diluye con etanol o buffer (pH 7,4) hasta que la absorbancia alcance 0.7 a 734 nm. Un mililitro de la solución resultante se mezcla con 10 µL de la muestra. La absorbancia se mide a 30°C, 1, 4 y 6 min después de mezclar, la diferencia de la lectura de absorbancia se interpola en una curva de calibración de Trolox y los resultados son expresados como equivalentes de Trolox.

Se conoce como TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox) a los μmol de Trolox necesarios para desarrollar la misma capacidad antioxidante que un gramo de muestra (Huang et al., 2005). Cuanto mayor es el número de equivalentes de Trolox, mas antioxidante es la muestra. El Trolox no tiene ningún significado fisiológico y su elección como estándar para la capacidad antioxidante es arbitrario, sin embargo, ya que su uso es muy generalizado, elegirlo facilita la comparación de los datos publicados (Pérez-Jiménez et al., 2008).

Entre las limitaciones que presenta esta técnica se encuentran: (Roginski y Lissi, 2005):

- Que al igual que todos los métodos indirectos no es representativo de la capacidad de inhibir el proceso oxidativo.
- La reacción de diversos fenoles y productos naturales con el ABTS[•] es relativamente lenta. Por lo que el resultado de la determinación del TEAC se espera que sea dependiente del tiempo de incubación así como de la relación entre la cantidad de muestra y concentración de ABTS[•].
- También existe poca selectividad del ABTS[•] en la reacción con donadores de átomos de hidrógeno; ya que reacciona con el grupo hidroxilo de cualquier compuesto aromático independientemente de su potencial antioxidante real.
- El efecto del tipo de solvente usado para la extracción de antioxidantes de la muestra tiene gran influencia en los resultados obtenidos con este método.

La longitud de onda de absorción a 734 nm hace a este método particularmente interesante para el estudio de extractos vegetales ya que elimina la posibilidad de interferencias de color. Con este método se ha investigado la actividad antioxidante de múltiples productos naturales como frutas y hortalizas, plantas medicinales, vinos, uvas, cereales, bebidas y aceites esenciales, carotenoides, compuestos fenólicos, algunos antioxidantes plasmáticos (Dudonné et al., 2009), AOVE y té verde (Samiengo-Sánchez et al., 2007; 2011).

Las aplicaciones recientes del método se han enfocado a cuantificar los cambios durante el crecimiento y desarrollo de frutas y hortalizas para maximizar la CA en el momento de la cosecha (Samec et al., 2011), o al estudio de las variaciones que provocan diversos procesos

Introducción

industriales (hortalizas ready-to eat) y domésticos, así como técnicas modernas de cultivo y de almacenamiento (atmósferas modificadas) en la CA de los alimentos (Lana and Tijssens, 2006; Pérez-Conesa et al., 2009; Murcia et al., 2009).

Se aplica en la valoración de plantas medicinales como fuente potencial de antioxidantes o al estudio de sus propiedades antioxidantes y terapéuticas (Nantitanon et al., 2010; Cardozo et al., 2011), y como parte de las determinaciones del perfil químico y funcional para el aprovechamiento de subproductos de la fabricación de alimentos (Navarro-González et al., 2011).

1.4.4. Ensayo DMPD (N,N-dimetil-p-fenilendiamina).

Es un método con un mecanismo de transferencia de electrones (SET) parecido al del método ABTS (Huang et al., 2005) que emplea la N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD). El protocolo experimental es rápido y económico y asegura la sensibilidad y reproducibilidad en la cuantificación de la actividad antioxidante de compuestos hidrofílicos, aunque existen reportes de que también es eficaz para evaluar los liposolubles (Corral-Aguallo et al., 2008; Rodríguez-Nogales et al., 2011). La eficacia de método DMPD en alimentos fue evaluada inicialmente en muestras de vino italiano ya que la CA de esta bebida proviene exclusivamente de la cantidad de compuestos fenólicos presentes (Fogliano et al., 1999).

El radical rosa $\text{DMPD}^{\cdot+}$, se decolora a la forma DMPD conforme se verifica la acción antioxidante involucrada en la transferencia de un átomo de hidrógeno. El radical se obtiene mezclando 1 mL de solución DMPD (200 mM), 0,4 mL de cloruro férrico (III) (0,05M) y 100 mL de buffer de acetato de sodio, ajustando el pH a 5,25. La solución alcanza valores estables de absorbancia a 505 nm después de un periodo de 18 a 21 h después de su preparación si es mantenida en la oscuridad y refrigeración (4-5°C).

Tras añadir la muestra con antioxidantes a la solución del radical, la absorbancia es monitorizada durante 10 minutos es comparada con la de un blanco, expresándose finalmente los resultados en equivalentes de Trolox (Fogliano et al., 1999). Recientemente se ha incrementado la estabilidad de la solución acuosa de DMPD al disolver el reactivo en buffer acetato con un 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) (Kubo et al., 2008).

Este test ha encontrado utilidad en la mejora de las técnicas de extracción de antioxidantes, en el análisis de la CA de alimentos (Bursal and Köksal, 2011), y en la validación de tecnologías analíticas automatizadas (Pohanka et al., 2012).

Con este método ha sido evaluada la CA de extractos lipofílicos e hidrofílicos de vinos tintos, frutas, hortalizas, cereales, leguminosas (Rivero-Pérez et al., 2007; Corral-Aguayo et al., 2008; Rodríguez-Nogales et al., 2011), de extractos de plantas medicinales (Tripathi et al., 2007; Dorman et al., 2011), de moléculas con actividad fisiológica y antioxidante como la melatonina, serotonina, resveratrol, curcumina (Ak and Gulcin, 2008; Gulcin, 2008; 2010) y de estructuras no comestibles como tallos, hojas y partes aéreas de cultivos alimentarios (Gulpinar et al., 2012)

Se ha aplicado para determinar el efecto que tienen sobre la CA, procesos como el envejecimiento de vinos (Rivero-Pérez et al., 2008); la temperatura del agua de infusión en el té (Venditti et al., 2010); o en la evaluación de alimentos o procesos innovadores (Jagtapa et al., 2011).

1.5. Antioxidantes alimentarios.

La mayor parte de la actividad antioxidante de los alimentos se deriva de la acción sinérgica de compuestos antioxidantes diferentes a las vitaminas C, E o β -carotenos; por ejemplo, algunos flavonoides (incluidas las flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas, catequinas e isocatequinas) polifenoles, terpenoides, compuestos de Maillard y trazas de minerales (Wang et al., 1996; Pérez-Jiménez et al., 2008).

Como se muestra en la Fig. 1.5-1, los compuestos antioxidantes pueden estar naturalmente presentes en diversos arreglos dentro de la microestructura de los alimentos (Naczk y Shahidi, 2006); y a partir de ello fueron clasificados recientemente en las siguientes categorías (Gökmen et al., 2009):

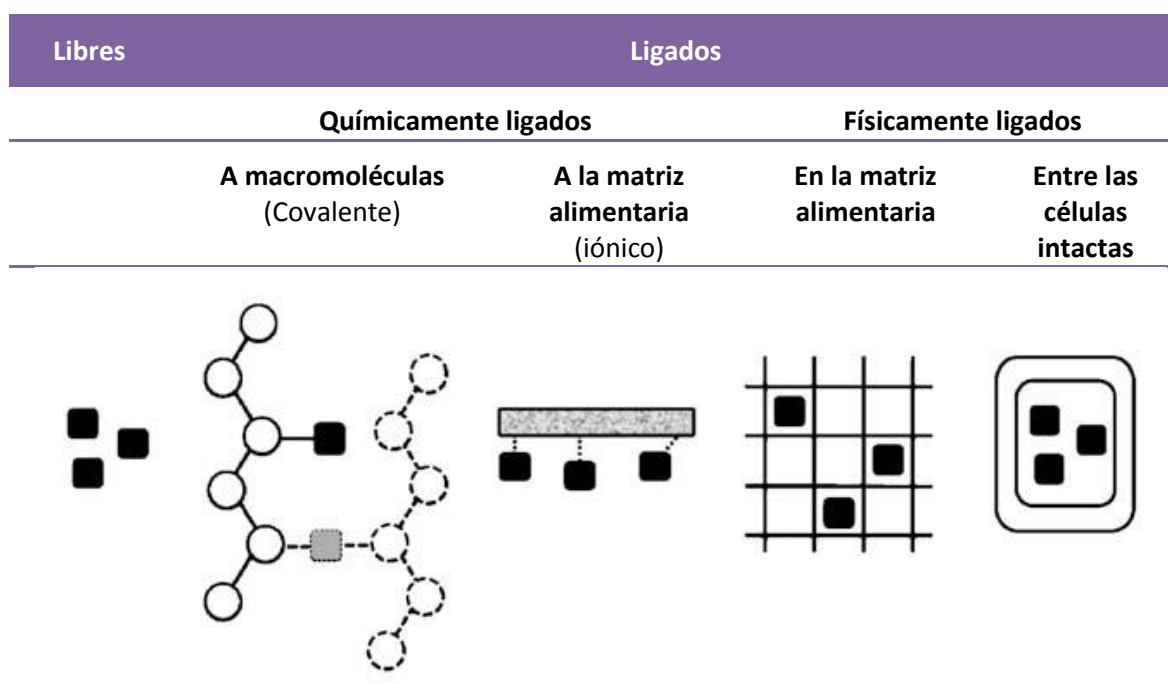


Figura 1.5-1. Configuraciones y localizaciones posibles de los compuestos antioxidantes dentro de la microestructura alimentaria (Gökmen et al., 2009).

- a) **Compuestos de bajo peso molecular**, que están libres de interacciones físicas o químicas con otras macromoléculas. Es el caso de la mayoría de compuestos antioxidantes de frutas y hortalizas; por ejemplo, la vitamina C, los tocoferoles, los ácidos fenólicos como el cinámico y benzoico, los flavonoides glicosidados, estilbenos y lignanos, taninos hidrolizables, y las proantocianidinas oligoméricas.
- b) **Compuestos que están físicamente atrapados en diferentes estructuras celulares.** Como los carotenoides en forma de complejos lipoprotéicos o en forma cristalina; los flavonoides (sobre todo en su forma no glicosidada) atrapados en las redes de pectina de las cáscaras.
- c) **Compuestos de bajo peso molecular que están química o físicamente unidos a otras macromoléculas.** Este es el caso de la mayor parte de los antioxidantes de cereales, semillas y leguminosas (principalmente los ácidos ferúlico, p-cumárico, sinápico y caféico) que se presentan en forma de complejos junto con los polisacáridos de las paredes celulares para constituir la “fibra dietética antioxidante” (Goñi et al., 2009).

- d) **Material antioxidante insoluble (usualmente de alto peso molecular).** Se incluyen todos los antioxidantes que no son solubles en agua o solventes, compuestos altamente polimerizados con pesos moleculares superiores a 3000 como proteínas insolubles, taninos (50 o más unidades de flavonoides) y productos de la reacción de Maillard (melanoidinas).

1.5.1. Carotenos.

Los carotenoides son uno de los grupos de pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza, han sido identificados más de 600 sintetizados en plantas y otros organismos fotosintéticos, así como en algunas bacterias no fotosintéticas y levaduras. Aproximadamente 20 de ellos pueden ser identificados en el suero sanguíneo humano después del consumo de frutas y hortalizas.

Son compuestos tetraterpenoides formados por una larga cadena central de carbono con 3 a 15 dobles enlaces conjugados que determinan su espectro de absorción. La ciclización del licopeno lleva a la formación de β -caroteno y sus xantofilas derivativas, β -criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina, y violaxantina o α -caroteno y luteína. Los principales carotenos en los alimentos y los más importantes desde el punto de vista de la salud humana son el α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina (Tabla 1.5-1).

De acuerdo a su estructura química, los carotenos se clasifican en dos grupos: los hidrocarburos llamados comúnmente carotenos, y las xantofilas; los carotenos están constituidos solo por átomos de Carbono e Hidrógeno, mientras que las xantofilas también contienen átomos de Nitrógeno. Otra clasificación se basa en las funciones biológicas que finalmente dependen de su estructura (Namita and Negi, 2010).

La alta hidrofobicidad causa una baja solubilidad en sistemas acuosos y como consecuencia una pobre asimilación en el organismo. La absorción se realiza a través del sistema linfático y se inicia con la disrupción de la matriz alimentaria, la liberación de los carotenoides y la emulsión en forma de micelas que posteriormente son absorbidas en el intestino delgado (Thakkar et al., 2007).

Tabla 1.5-1. Características y fuentes alimentarias de carotenos.

Nombre común	Absorción	Color	Fuente de Carotenoides
Anteraxantina	2350 a 446 nm	Amarillo	Hojas verdes
Astaxantina	2100 a 470 nm	Rojo	Haematococcus sp.
Bixina	4200 a 456 nm	Rojo	Achiote
Cantaxantina	2200 a 466 nm	Rojo	Hojas verdes
Capsantina	2072 a 483 nm	Rojo	Pimiento rojo
Capsorrubina	2200 a 489 nm	Rojo	Pimiento rojo
α-caroteno	2800 a 444 nm	Amarillo	Zanahoria
β-caroteno	2592 a 449 nm	Amarillo	Zanahoria
δ-caroteno	2760 a 462 nm	Naranja brillante	Tomate, durazno, palma
ζ-caroteno	2555 a 400 nm	Amarillo pálido	Fruto de la pasión
Crocetina	4320 a 450 nm	Amarillo	Azafrán
β-criptoxantina	2386 a 449 nm	Amarillo/naranja	Papaya
Fucoxantina	1100 a 585 nm	Amarillo	Hojas
Luteina	2550 a 445 nm	Amarillo	Hojas, hortalizas verdes
Licopeno	3450 a 470 nm	Rosa/rojo	Tomate
Neoxantina	2243 a 439 nm	Amarillo	Hojas
Norbixina	2850 a 456 nm	Rojo	Achiote
Fitoeno	1250 a 286 nm	Sin color	Hortalizas verdes
Fitoflueno	1350 a 348 nm	Sin color	Hortalizas verdes
Violaxantina	2250 a 440 nm	Amarillo	Hojas
Zeaxantina	2348 a 449 nm	Naranja	Maíz amarillo
	2540 a 450		

Fuente: Namitha and Negi, 2010.

La actividad como antioxidante de los carotenoides se realiza a través de la captación del oxígeno singlete; también puede prevenir la formación de esta forma tan reactiva de oxígeno por la captación de sensibilizadores excitados. Aunque no destacan en la captación de radicales libres, también tienen cierta capacidad de interactuar y captar otras especies radicalarias intracelulares como el radical peroxilo, o los radicales hidroxilo (Rodríguez-Amaya, 2010). También pueden presentar efectos sinérgicos con otros antioxidantes, como la vitamina E (Zanfini et al., 2010).

El procesamiento alimentario afecta profundamente el contenido, perfil y biodisponibilidad de los carotenos. Durante los tratamientos térmicos cortos (pasteurización) se mantiene o puede aumentar la concentración a raíz de un incremento en la extractabilidad por degradación parcial de la pared de las células de la piel (Oliveira et al., 2012).

Sin embargo, cuando los tratamientos son prolongados (deshidratación, concentración, cocción) hay una reducción del contenido de carotenos y un incremento en el número de compuestos por isomerización, con la consiguiente disminución de la actividad como provitamina A (Rojas-Garbanzo et al., 2011). La isomerización es favorecida por el contacto con ácidos, los tratamientos térmicos y la exposición a la luz. Una excepción notable son los productos a base de tomate que presentan un contenido marcadamente superior al de los tomates frescos que se atribuye a la eliminación de agua durante el procesamiento por concentración (Pérez-Conesa et al., 2009).

Diversos estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de frutas y hortalizas que contienen carotenoides contribuyen a la prevención del desarrollo de enfermedades degenerativas como las enfermedades neuronales, cardiovasculares, diabetes, degeneración macular, algunos tipos de cáncer y las cataratas asociadas al envejecimiento. El efecto preventivo contra las enfermedades ha sido atribuido a sus potentes propiedades como antioxidante (Kang et al., 2009; Di Matteo et al., 2009; Houston, 2010; Obulesu et al., 2011; Ying et al., 2012; Tomo et al., 2012).

1.5.2. Vitamina C.

Se conoce como vitamina C al ácido L-ascórbico, es un compuesto hidrofílico de seis carbonos derivado de la L-treo-hex-2-enono-1,4-lactona con una estructura química semejante a la de las hexosas, contiene un grupo ene-diol que involucra a los Carbonos 2 y 3.

Este grupo hace al ácido ascórbico un potente agente antioxidante que reacciona fácilmente con radicales peroxilo, los neutraliza y se transforma en radical dehidroascórbico. En las células, el ácido ascórbico y el ácido dehidroascórbico se encuentran en equilibrio químico, y ambos están dotados de actividad vitamínica (Fig. 1.5-2). El carácter ácido del ácido ascórbico se debe a la facilidad del grupo -OH del carbono 2 de liberar un protón (Blasa et al., 2010).

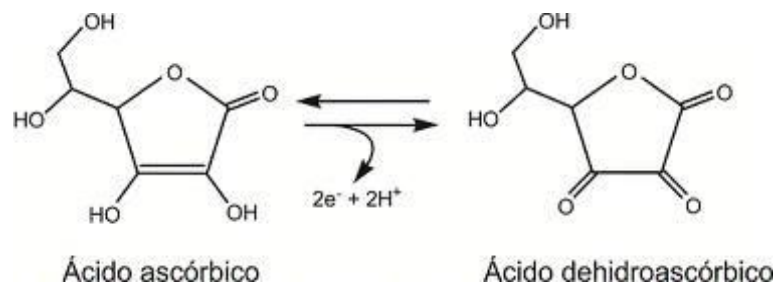


Figura 1.5-2. Estructura química e interconversión del ácido ascórbico y dehidroascórbico.

La mayoría de vegetales sintetizan el ácido ascórbico partiendo de la glucosa; sin embargo, los primates son incapaces de hacerlo, debido a que el gen que codifica a la enzima L-gulono-1,4-lactona oxidasa (último eslabón en la síntesis del ácido ascórbico) está altamente mutado. Por lo tanto la vitamina C es una vitamina esencial que debe ser introducida en la dieta a través del consumo de frutas y hortalizas frescas (Schlueter and Johnston, 2011).

Desde un punto de vista fisiológico el ácido ascórbico está involucrado en diversos procesos metabólicos: hormonas corticosteroides, ácidos biliares, carnitina, prostaglandinas, histamina, colágeno, hierro, tiroxina y algunos neurotransmisores. La vitamina C también mejora la respuesta inmune y favorece la eliminación de xenobióticos y radicales reaccionando directamente con los aniones superóxido, los radicales hidroxil y varios hidroperóxidos lipídicos.

El ascorbato cumple una función como un antioxidante y un cofactor enzimático en la interacción redox que existe entre los organismos vivos y el ambiente (Cruz-Rus et al., 2012).

La vitamina C en su forma oxidada como ácido dehidroascórbico es transportada al interior de la mitocondria en donde es reducida. La cadena respiratoria puede donar electrones para la reducción del ácido dehidroascórbico en el complejo III para regenerarla a su estado reducido (ascorbato) por medio de la dihidroascorbato reductasa y glutatión reducido. El glutatión que fue oxidado es regenerado a su estado reducido por la glutatión reductasa a expensas de NADPH.

El ácido ascórbico puede salir de la mitocondria por transporte activo. De esta manera las moléculas de ácido ascórbico se convierten en captadores de especies reactivas de Oxígeno, protegen el genoma mitocondrial y evitan la depolarización de la membrana mitocondrial (Mandl et al., 2009).

Por otro lado, actúa sinérgicamente con el tocoferol para regenerar los radicales tocoferil. Además, puede prevenir o reducir la peroxidación lipídica inducida por H_2O_2 y la formación de OH-deoxiguanosina, producida como consecuencia de la oxidación del ADN (Yen et al., 2002)

1.5.3. Vitamina E.

La vitamina E es un antioxidante lipofílico disruptor de cadena que se encuentra en la naturaleza en ocho diferentes isoformas derivadas de la estructura 6-hidroxicromano. Cuatro son tocoferoles (Fig. 1.5-3) con una larga cadena lateral isoprénica en el C2 y un número variable de grupos metilo unidos al anillo cromanol; y cuatro tocotrienoles que tienen la misma estructura que los anteriores, excepto por la cadena lateral que está insaturada con tres dobles enlaces (Blasa et al., 2010).

Actúa sinérgicamente con el selenio neutralizando de forma muy eficiente los radicales peroxilo, en este proceso es oxidado a radical tocoperoxil y posteriormente reciclado a α -tocoferol por el ácido L-ascórbico. Este reciclaje transforma a la vitamina E en el factor clave en la prevención de la generación y propagación del estrés oxidativo protegiendo a los ácidos grasos poliinsaturados frente a la oxidación, ya sea, en los fosfolípidos de las biomembranas y/o en las lipoproteína plasmáticas (García-Parrilla 2008; Cruz-Rus et al., 2012).

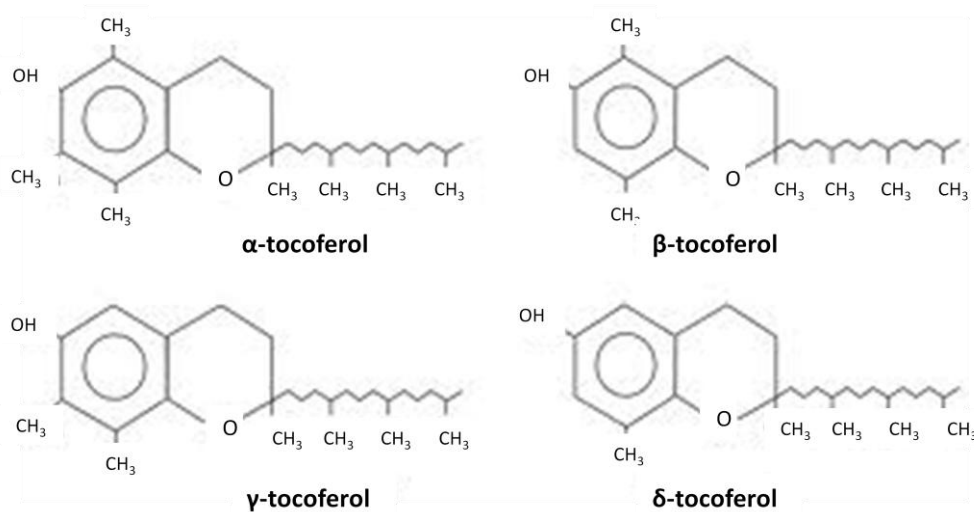


Figura 1.5-3. Estructura química de los tocoferoles.

Introducción

Son hidrolizados en el intestino delgado, emulsionados con los ácidos biliares, transportados en el torrente sanguíneo por las lipoproteínas de baja densidad, almacenados en el hígado y eliminados a través de la bilis y orina. A pesar de que tienen actividad semejante como captadores de radicales, los ocho vitámeros muestran actividad biológica diferente. El α -tocoferol es el más potente y el único que se retiene en el organismo; esto se debe en parte a la selección específica del RRR- α -tocoferol y a su baja tasa de eliminación y degradación (Leonarduzzi et al., 2010).

Los efectos celulares de la vitamina E no solo se basan en la actividad antioxidante como disruptor de cadena; se ha demostrado que regula significativamente diversas vías de señalización, así como la expresión genética celular. Contribuye a mantener la función y comportamiento celular dentro del rango fisiológico, puede proteger frente la proliferación celular anormal, pero especialmente puede revertir los procesos inflamatorios (Devaraj and Jialal, 2005; Tiwari and Cummins, 2009; Miyazawa et al., 2009; Gohil et al., 2010).

El nivel de tocoles en un determinado producto alimentario terminado depende de las operaciones y las condiciones en que se ha elaborado (Tiwari and Cummins, 2009). Durante el almacenamiento se reduce el contenido de vitamina E en los alimentos (Mian et al., 2009) debido a la oxidación, exposición a altas temperaturas y humedad, luz solar y a la acción de microorganismos. De acuerdo con Charlton y Ewing (2007) (Mian et al., 2009), la vitamina E es estable a los ácidos, calor, y humedad, pero inestable a la oxidación (acelerada por calor), luz UV, álcalis, Cloro, humedad, micotoxinas, grasa rancia, trazas de minerales como Cobre, Zinc, Manganeso, Hierro y sales de Plomo.

1.5.4. Productos de las reacciones de Maillard.

La reacción de Maillard consta de tres etapas (Valls-Bellés et al., 2005; Yilmaz and Toledo, 2005):

- a) Se produce la condensación entre un compuesto carbonílico y un grupo amino en medio ácido, a partir de la cual se generan una serie de compuestos denominados de Amadori.
- b) Los compuestos de la primera etapa se descomponen, dando lugar a moléculas volátiles y no volátiles de bajo peso molecular.

- c) En la tercera etapa, muchos de los compuestos formados durante la etapa intermedia, como derivados enaminol, análogos de azúcar de bajo peso molecular y productos carbonílicos insaturados sufren reacciones de polimerización, dando lugar a los compuestos de alto peso molecular llamados melanoidinas

Los productos hidrosolubles del pardeamiento no enzimático generados durante el tratamiento térmico ejercen un efecto como captadores de radicales (Plaza et al., 2010). Esta actividad antioxidante es proporcional al grado de pardeamiento (Yilmaz and Toledo, 2005; Tubaro, 2009) y tiene una correlación estrecha con los productos derivados de las etapas intermedias y tardías y con el tipo de azúcar involucrado en la reacción (Chen and Kitts, 2011).

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la actividad antioxidante de los PRM como la inactivación de los radicales libres lipídicos, la inhibición de la formación de peróxidos, la habilidad de los PRM de captar tanto los iones metálicos como los catalizadores de las reacciones de primer orden y la acción como trampas de oxígeno (Yen et al., 2005).

El tratamiento térmico de los alimentos incrementa el pardeamiento, acelera la formación de melanoidinas de alto peso molecular (85-232 kDa) e incrementa significativamente los valores de CA (Brudzynski and Miotto, 2011), este efecto se relaciona con la temperatura y tiempo de tratamiento (Serpen and Gökmen, 2009). Las melanoidinas están presentes en alimentos de amplio consumo como en el pan, cocoa, café, alimentos fritos, entre otros, y su ingesta diaria puede llegar a ser considerable (Saura-Calixto and Goñi, 2009).

Las reacciones de Maillard son esenciales para el desarrollo de colores y sabores en los alimentos, pero causan una reducción del valor nutritivo. Otros efectos negativos de los PRM en la salud humana si son consumidos como parte de la dieta son la formación de compuestos mutagénicos y carcinogénicos. También ha sido demostrado el efecto citotóxico tanto en células intestinales humanas normales como en líneas celulares específicas (Hongsprabhas et al., 2011). La potencia de este efecto es superior en las fracciones de mayor peso molecular y también depende del tiempo de exposición, concentración y la fuente de azúcares (Jing and Kitts, 2000).

Los PRM también pueden ser considerados como fibra dietética y como tal no son absorbidos en el intestino delgado y son al menos parcialmente degradados por microorganismos intestinales (Goñi et al., 2009).

1.5.5. Compuestos fenólicos.

Los fenoles o polifenoles, son “metabolitos secundarios” que se sintetiza exclusivamente en plantas y microorganismos, son considerados como los principales antioxidantes en los alimentos. Se los encuentra en forma de lignina y otros polímeros estructurales, o como fenoles con función protectora frente a estreses ambientales (excesos de luz, temperaturas extremas, radiación UV, patógenos, herbívoros, ozono), actúan neutralizando el estrés oxidativo a través de la captación o “detoxificación” de las especies reactivas de oxígeno.

Desde la perspectiva humana, se sabe que los fenoles dietarios afectan favorablemente la salud. Se han realizado estudios sobre las propiedades químicas y farmacológicas de los compuestos fenólicos presentes en frutas, hortalizas, cocoa, vino y té, entre otros alimentos. Aunque no son considerados como nutrientes, existe evidencia de que contribuyen a la quimiopreención de diversas afecciones humanas, incluida la enfermedad coronaria (Gendron et al., 2010) y ciertas clases de cáncer (Grace, 2005). Tienen un rol específico en la inhibición de los estadios iniciales de desarrollo, promoción y progresión de tumores (Liu et al., 2008; Beecher, 2003; Cook and Samman, 1996), ejercen actividad antiaterogénica y evitan la agregación plaquetaria al prevenir la modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad, por ello su consumo en la dieta normal les relaciona con un efecto profiláctico, más que curativo, que impacta en la reducción de la mortalidad por enfermedades coronarias en diversos estudios poblacionales (Arts and Hollman, 2005; Zamora-Ros, 2012).

Se postula que atenúan el daño al hígado inducido por el consumo crónico de alcohol disminuyendo la actividad de la alanin-aminotransferasa y la aspartato-aminotransferasa séricas, mediante una mejora de la expresión de genes que codifican antioxidante estratégicos y una subsecuente supresión del estrés oxidativo (Giriwono et al., 2010).

En modelos animales se ha demostrado el potencial terapéutico para curar el síndrome cardiometabólico inducido por dietas con elevado contenido lipídico ya que modula la expresión de diversas proteínas involucradas en la aparición del estrés oxidativo, la inflamación la resistencia a la insulina, la esteatosis hepática y la hipertensión (Sharma et al., 2010; Chuang and McIntosh, 2011; Muthuraman et al., 2011); despliegan perfiles transcriptómicos en el hígado, bazo y corazón de ratones relacionados con la regulación o inactivación de más de 27 genes que los relacionan con la reducción de enfermedades cardiovasculares (Leow et al., 2011).

Los compuestos fenólicos incluyen una amplia gama de compuestos sintetizados a partir de carbohidratos a través del ciclo de shikimate. Se caracterizan por que en estado puro son difíciles de disolver en agua pero las interacciones en las que participan en estado natural hacen posible cierta solubilidad en medio acuoso; su peso molecular varía entre 500 a 3-4000; poseen entre 12-16 grupos fenólicos y 5-7 anillos aromáticos por masa molecular relativa de 1000; y además, tienen la propiedad de precipitar algunos alcaloides, gelatina y otras proteínas en solución (Haslam, 1999)

De acuerdo al número de anillos fenólicos que contienen y según los elementos estructurales que los unen, los polifenoles se dividen en 5 clases (D'Archivio et al., 2007).

a) Flavonoides.

De los más de 8.000 polifenoles, se han identificado 4.000 flavonoides (Harborne et al., 1999); en se muestra su clasificación. Son compuestos de bajo peso molecular, que consisten en quince átomos de carbono ordenados en una configuración C6-C3-C6. La estructura consiste en dos anillos aromáticos unidos por un enlace carbono 3, usualmente en la forma de un anillo heterocíclico. Las sustituciones en los anillos pueden incluir oxigenación, alquilación, glicosilación, acilación y sulfonación y dan lugar a las diferentes clases de flavonoides (Balasundram et al., 2006). Son especialmente importantes por tener un elevado potencial redox lo que los hace agentes reductores, donadores de hidrógeno y captadores de oxígeno singlete, adicionalmente tienen potencial como quelantes de metales (Tsao and Yang, 2003). Son los fitoquímicos más comunes, se les encuentra en frutas y hortalizas en concentraciones que varían por factor diversos factores como los ambientales, condiciones de cultivo, clima, almacenamiento, condiciones de preparación (Caridi et al., 2007). Se pueden dividir en tres clases de flavonoides:

Flavanonas Se caracterizan por la presencia de una cadena saturada de tres carbonos y un átomo de oxígeno en posición C4. Generalmente están glicosilados por un disacárido en la posición C7. Solo en las frutas cítricas se encuentran en altas concentraciones, pero también se presentan en los tomates y ciertas plantas aromáticas como la menta. Las principales agliconas son la naringenina (pomelos), hesperetina (naranjas), eriodictiol (limones) (Ignat et al., 2011).

Isoflavonas. Son estructuralmente semejantes a los estrógenos (p. ej. Grupos en las posiciones C7 y C4, como el estradiol). Se les encuentra en alimentos de origen vegetal en forma de aglicona y como acetil- o malonil, etc., β -glucósidos. Tienen efectos estrogénicos atribuidos a las similitudes con la estructura del β -estradiol, se les llama “fitoestrógenos” (Klejdus et al., 2007; D’Archivio et al., 2007).

Antocianinas. Son pigmentos hidrosolubles de color rojo, púrpura, o azul dependiendo del pH sintetizados por la vía del ciclo fenilpropanoide. Se encuentran en todos los tejidos vegetales incluyendo hojas, tallos, raíces, flores y frutos. Se les conoce como antocianidinas cuando están en su forma glicosidada (unidas a una o varias unidades de glucosa, galactosa, ramnosa o arabinosa).

La estructura consisten en un anillo aromático ligado a un anillo heterocíclico que contiene oxígeno que a su vez está unido por un enlace C-C a un tercer anillo aromático (Konczak and Zhang, 2004). Las más abundantes son la pelargonidina, cianidina y delphinidina, se encuentran en el 80% de las hojas pigmentadas, en el 69% de las frutas y 50% de las flores. Las antocianinas aisladas son muy inestables y susceptibles a la degradación (Giusti and Wrolstad, 2003). Actúan como antioxidantes por la donación de Hidrógeno a radicales altamente reactivos (Iversen,

1999), su potencial depende del número y disposición de los grupos hidroxilo y del grado de conjugación estructural, así como de la presencia de sustituyentes donadores o aceptores en el anillo (Lapornik et al., 2005).

b) Ácidos fenólicos.

Constituyen una tercera parte de los fenoles de la dieta, están presentes tanto libres como ligados (Robbins, 2003). Los ligados se unen por medio de enlaces ester, éter o acetal a diversos componentes vegetales (Zadernowskiet al., 2009). Los ácidos fenólicos se clasifican en (Bravo, 1998):

Derivados del ácido hidroxibenzóico. Incluye los ácidos, gálico, p-hidroxibenzóico, protocatequico, vanillico y siríngico que tienen en común la estructura C6-C1.

Derivados del ácido hidroxicinámico. Son compuestos aromáticos con una cadena lateral de tres carbonos (C6-C3), los más comunes son los ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico y sinápico.

c) **Taninos.**

Son compuestos de alto peso molecular que constituyen otro tercio de los compuestos fenólicos; se subdividen en hidrolizables y taninos condensados (Porter, 1989). Poseen estructuras complejas y variables, funcionan como quelantes de metales, agentes precipitantes de proteínas y antioxidantes biológicos (Hagerman, 2002).

Proantocianidinas (taninos condensados) Los más estudiados son los basados en flavan-3 oles, (-)-epicatequina y (+)-catequina.

Taninos Hidrolizables Son derivados del ácido gálico (ácido 3,4,5 trihidroxibenzóico). El ácido gálico se encuentra esterificado a un poliol central, y los grupos galoil pueden estar adicionalmente esterificados para formar taninos hidrolizables más complejos (Hagerman, 2002).

d) **Estilbenos.**

Se encuentran en pequeñas cantidades en la dieta humana, el más importante es el resveratrol en forma glicosidada ya sea como isómero cis o trans (Delmas et al., 2006). Plantas como las uvas, bayas y cacahuets lo sintetizan en respuesta a condiciones estresantes (Bavaresco, 2003).

e) **Lignanós.**

Se producen por dimerización oxidativa de dos unidades fenilpropano; están presentes en forma libre en la naturaleza, la forma glicosidada es menos frecuente. Tiene aplicaciones potenciales en la quimioterapia del cáncer y otros efectos farmacológicos (Saleem et al., 2005).

Los polifenoles hidrofílicos son los más comunes en alimentos con alto contenido de humedad (frutas, hortalizas, té, café, vino); mientras que en aceites y grasas vegetales, están representados mayoritariamente por monofenoles, siendo el tocoferol (Vitamina E) el principal de ellos (Roginsky and Lissi, 2005).

Exhiben una considerable variación con respecto a su localización tisular y subcelular. Por ejemplo, sustancias como los flavonoides y ácidos hidroxicinámicos son sintetizados en el citoplasma y pueden ser transportados hacia la vacuola en forma de glicósidos o conjugados de glutatión; al mismo tiempo se encuentran en mayor concentración en las vacuolas de las células epidermales, pero también se presentan en las de las células del mesófilo (Grace 2005).

Una elevada cantidad de fenoles están asociados con la matriz de fibra, convirtiéndose en un sustrato fermentable para la microflora bacteriana; los polifenoles constituyen entre 1,4 al 50 % (m. s.) de la fibra dietética insoluble en frutas, hortalizas y cereales, y del 2,9 al 62,8 % de la fibra dietética soluble en bebidas comunes (Goñi et al., 2009).

En general todos fenoles son excelentes antioxidantes dada la presencia del grupo hidroxilo fenólico "ácido" como donador de electrones. Los grupos o-Dihidroxi en el anillo β , la presencia de un doble enlace C 2-3 en conjunto con un 4-oxo en el anillo C, y grupos hidroxilo 3- y 5- y la función del 4-oxo en los anillos A y C están asociados con la actividad antioxidante. Los grupos fenólicos pueden captar directamente intermediarios de oxígeno dañinos e inactivarlos sin promover reacciones oxidativas posteriores. Los ácidos fenólicos parecen ser antioxidantes más activos que los derivados hidroxilo del ácido benzóico (Velioglu, 1998).

1.5.6. Polifenoles y capacidad antioxidante.

La actividad antioxidante de los alimentos está en estrecha relación con la composición cualitativa y cuantitativa de las sustancias antioxidantes; y la composición puede ser tan diversa como es la diversidad taxonómica del reino vegetal. Así, se encuentran variaciones entre familias, géneros, especies, e incluso diferentes variedades o cultivares de una misma especie pueden exhibir una composición de polifenoles y actividades antioxidantes diferentes (Cao, Sofic and Prior, 1996; Jin-wei et al., 2005).

Independientemente de que los compuestos fenólicos desplieguen una mayor CA que las vitaminas y los carotenoides tanto *in vivo* como *ex vivo* (Pulido et al., 2003); los extractos con elevado contenido fenólico han demostrado una CA comparativamente superior a la de antioxidantes puros como el α -tocoferol y el BHT (Maisuthisakul et al., 2007).

Se sabe que en las hortalizas y frutas predomina la actividad antioxidante hidrofílica respecto a la lipofílica y que solo en casos como el aguacate y algunas bayas predomina la segunda. Los constituyentes responsables de la actividad antioxidante lipofílica son los carotenoides y tocoferoles, mientras que los compuestos fenólicos y las antocianinas son los principales constituyentes antioxidantes en los extractos hidrofílicos (Teow et al., 2007). Toor and Savage (2005) (en Ma et al, 2011) los fenoles hidrofílicos llegan a constituir un 78 a 87 % de los fenoles totales presentes en las pulpas de tomate.

La estrecha correlación positiva entre los fenoles totales y la CA medida medida por los métodos ABTS, DPPH, FRAP y ORAC en extractos acuosos ha sido ampliamente referida (Netzel et al., 2007; Khanizadeh et al., 2008; Vieira et al., 2009; Andre et al., 2009; Kunradi et al., 2011); se conoce también que el contenido de flavonoides guarda una relación estrecha con la CA; pero no el contenido de antocianinas, esto último debido en parte a su baja concentración en los alimentos (Tsao et al., 2005). Al elucidar la contribución de fenoles individuales a la CA de algunos extractos, se observa que son los ácidos fenólicos los mayores contribuyentes, tal es el caso del ácido clorogénico cuando se encuentra presente (Maisuthisakul et al., 2007).

En extractos acuosos de diferentes fracciones de alimentos vegetales ha sido observada una contribución superior de los fenoles a la CA *in vitro* que la del resto de antioxidantes (Ma et al., 2011; Landbo and Meyer 2001; Maisuthisakul and others 2007; Abu Bakar and others 2009); la vitamina C ha sido reportada como un contribuyente menor a la CA de frutas comunes y la contribución de los carotenoides puede llegar a ser despreciable; Saura-Calixto and Goñi, 2006). En extractos metanólicos la correlación de la CA y el contenido de fenoles totales también ha sido confirmada; no así en el caso de la vitamina C (Hanson et al., 2006)

No siempre se han encontrado correlaciones positivas entre la concentración total de estos compuestos y la capacidad antioxidante medida en fuentes vegetales y/o sus extractos. Algunos casos son el de diversas hierbas medicinales; de vegetales altos en antocianinas (bayas, cebollas y cascarillas de pipas de color rojo); manzanas (Kähkönen et al., 1999) y el de algunos cereales (Pelegriini et al., 2006). Los autores señalaron como posibles explicaciones, la presencia de diferentes clases de compuestos fenólicos que no siempre son extraídos o cuantificados en su totalidad a través del método de elección (Folin-Ciocalteu); así como la presencia de otras sustancias biofuncionales además de los polifenoles (Sun et al., 2002).

Introducción

Los efectos biológicos dependerán de la baja biodisponibilidad de las sustancias polifenólicas (Porrini and Riso, 2008; Benzie and Wachtel-Galor, 2011); se estima que la cantidad de polifenoles no extraíbles es casi el doble de los extraíbles y que alrededor del 48 % de los polifenoles dietarios son accesibles en el intestino delgado, mientras que el 42 % se hacen accesibles en el intestino grueso. Aún así, los efectos metabólicos son significativos debido al alto consumo y a la potencia de la CA (Saura-Calixto et al., 2007).

2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA DIETA ESPAÑOLA.

2.1. Generalidades sobre la dieta Mediterránea.

El término “dieta Mediterránea” fue acuñado en torno a la década de 1960 y se refiere a patrones de alimentación específicos de algunos territorios Mediterráneos, como Creta, otras regiones de Grecia, España y el Sur de Italia.

En general, la dieta Mediterránea tradicional se caracteriza por un alto consumo de frutas, hortalizas, cereales, patatas, pollo, judías, nueces, pescados magros, productos lácteos, pequeñas cantidades de carne roja, y de aceite de oliva como una fuente importante de grasas (Fig. 2.1-1). También se incluye un moderado consumo de vino tinto o blanco (p.e. más de 100 a 200mL por día) casi siempre durante las comidas. Aunque la ingesta de leche es moderada, el consumo de queso y yogurt es elevado.

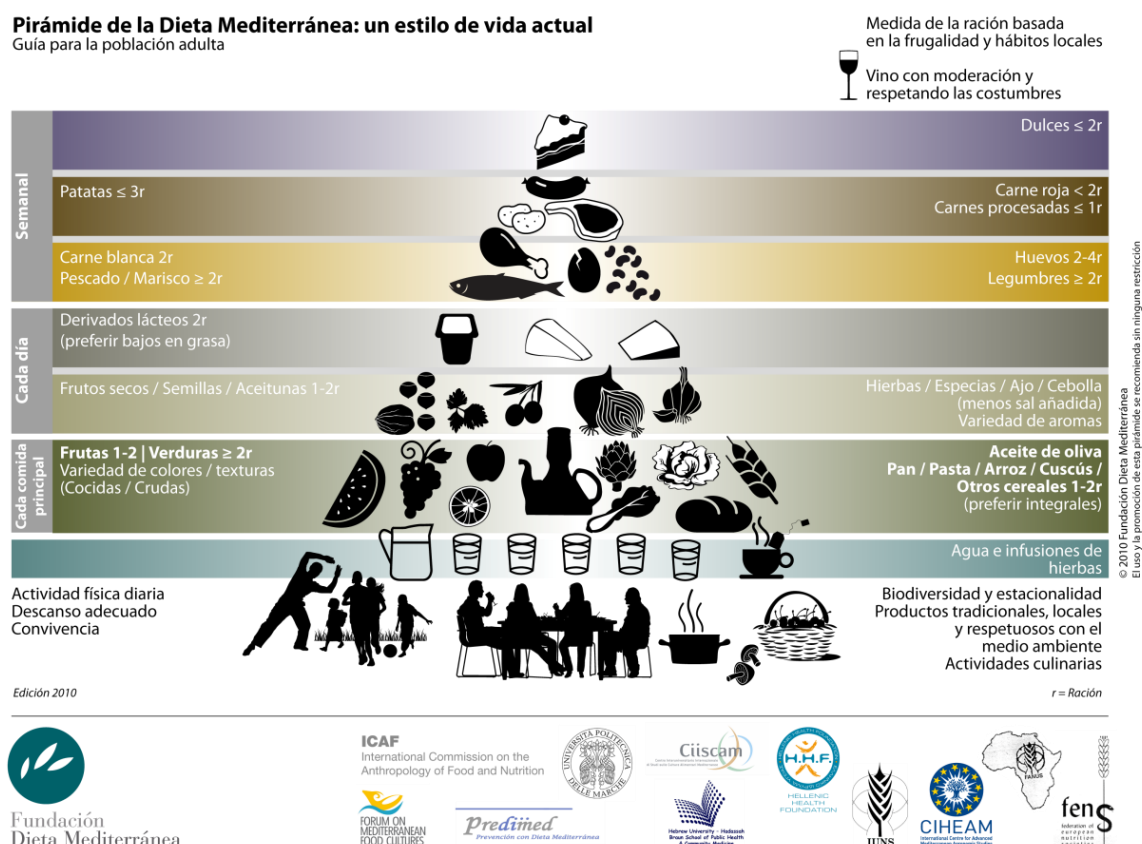


Figura 2.1-1. Pirámide de la dieta Mediterránea (Fuente FDM, 2010).

Introducción

Esta dieta es baja en grasas saturadas ($\leq 7-8$ % de la energía diaria), con una cantidad total de grasa que fluctúa entre el 25 a 35 % de los requerimientos diarios de energía. La proporción de ácidos grasos monosaturados a saturados es mayor de dos.

El aceite de oliva, es una fuente rica de ácidos grasos monoinsaturados y es el principal componente de la dieta Mediterránea. Adicionalmente, las nueces (también típicas de la dieta Mediterránea), tienen un perfil de ácidos grasos favorable y son una fuente rica de nutrientes y otros componentes bioactivos como la fibra, fitosteroles, ácido fólico y antioxidantes (Kouris-Blazos et al., 1999).

Los patrones alimentarios españoles sufrieron cambios dramáticos entre 1960 y 1980. La tendencia cambió en los 1990, y recientemente (2010) dentro del estudio prospectivo europeo sobre nutrición y cáncer (EPIC) fue evaluada la adecuación de la ingesta dietética de una subpoblación española a las ingestas recomendadas y objetivos nutricionales con los siguientes hallazgos (Molina-Montes et al., 2012):

- Un 10 a 15 % de la población estudiada excede la ingesta recomendada de energía, de lípidos (principalmente los ácidos grasos saturados y el colesterol), y de proteínas (95 % de la población estudiada); mientras que los carbohidratos y la fibra se encuentran por debajo de los valores de referencia. Esta tendencia es común a ambos sexos y a todos los grupos de edad.
- Las ingestas recomendadas de micronutrientes no son cubiertas en los casos del magnesio, hierro, vitamina A, D y E. La ingesta de magnesio es más elevada entre hombres pero fue inferior a la recomendada en ambos sexos y en todos los grupos de edad; las deficiencias son más notorias para el hierro (mujeres). Respecto a las vitaminas, el total consumido de vitamina A fue menor a edades más avanzadas. Se encontró una reducción marcada en el consumo de vitamina D y E, esta última disminuye en mayor magnitud y cae por debajo de las recomendaciones en mujeres mayores de 50 años. La ingesta media de vitamina D tampoco cubre las recomendaciones.

- En general, las recomendaciones fueron cubiertas para la mayoría de nutrientes (vitaminas C, B₁, B₁₂, y hierro en los hombres). Entre un 50 a 78 % de la población analizada tiene consumos por encima de las recomendaciones para las vitaminas B₂ y B₆ y solo una pequeña proporción mostró un riesgo moderado de inadecuación nutricional (7 % para la vitamina B₂, y para la vitamina B₆ un 3 % de los hombres y un 13 % de las mujeres) (Capita et al., 2006).

Los rápidos procesos de urbanización y la creciente proporción de mujeres en las fuerzas de trabajo han dado lugar a los cambios descritos en los patrones alimentarios en las últimas décadas. Aunque la mujer española prefiere cocinar a pesar de la escasez de tiempo (Kantar Worldpanel, 2012); es un hecho demostrado que la reducción del tiempo disponible para la organización de la alimentación familiar provoca una tendencia a sustituir las preparaciones tradicionales por comida rápida y de conveniencia (Jabs et al., 2007). Por otra parte, algunos de los cambios tienen un impacto positivo, como son el incremento en la variedad de la dieta y el acceso a los alimentos.

En la actualidad, las personas entre 40-60 años no cubren las recomendaciones de consumo de la mayoría de alimentos que constituyen la base de la alimentación mediterránea, y es en la población entre 60-70 años en donde existe el mayor grado de adherencia (Villalón et al., 2012)

De esta manera, la dieta española se ha alejado paulatinamente del tradicional patrón alimentario Mediterráneo. Los patrones alimentarios actuales evidencian un mayor consumo de productos de origen animal: carne, pescado, leche y productos lácteos (Aranceta, 2001).

Esta transición, ha motivado el surgimiento de iniciativas de mejora dirigidas a incrementar la adherencia de la población a la dieta tradicional. En una de estas experiencias se observó que al intervenir durante 12 meses en el comportamiento alimentario a través de charlas motivacionales individuales, sesiones grupales y la provisión de alimentos clave de la dieta Mediterránea (aceite de oliva y frutos secos) se consiguió modificar favorablemente el patrón alimentario global individual hacia una mejora en los hábitos dietarios de los 1.511 participantes adultos con edades entre 55 a 60 años reclutados en hospitales españoles (Zazpe et al., 2008)-

Introducción

En los datos del consumo alimentario en el hogar que publica el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (Tabla 2.1-1) se puede observar que la dieta española actual es especialmente rica en una amplia variedad de frutas y hortalizas. Las bebidas alcohólicas más consumidas son el vino y la cerveza, mientras que el café, zumos de frutas y colas son las principales bebidas no alcohólicas y el aceite de oliva es la principal fuente de grasa (MAPA, 2011).

Tabla 2.1-1. Consumo alimentario en hogares españoles durante el año 2011.

Grupos de alimentos	Alimentos y proporción consumida por grupo (%)	Consumo Per cápita (g m. h./día)	Proporción del consumo total per cápita (%)
Total consumo alimentario		1807,9	
Carne	Carne vacuno (12,5%), pollo (27,6%), carne ovino/caprino (4%), carne cerdo (20,4%), carne congelada (3,3%), carne transformada (23,17%), otros (9,05%)	144,4	7,9
Pesca	Pescados frescos (44,3%), pescados congelados (12,2%), mariscos/moluscos/crustáceos (28,0%), cons. pescado/molusco (15,6%).	73,4	4,0
Huevos	Huevos (100%).	22,47	1,2
Leche	Leche líquida (65,8%), yogurt (8,8%), bifidus/leches fermentadas (5,4%), queso (7,1%), resto derivados lácteos (12,37%).	310,4	17,2
Azúcar	Azúcar (100%)	10,9	0,6
Cereales	Pan (100,0%).	97,5	5,4
Hortalizas	Patatas frescas (26,4%), tomates (17,9%), cebollas (8,7%), lechuga/escarola/endivia (5,6%), pimientos (5,8%), judías verdes (2,8%), coles (2,2%), otros (30,62%).	234,0	12,9
Frutos secos		0,9	0,05
Frutas	Naranjas (19,7%), mandarinas (6,6%), limones (2,23%), plátanos (10,9%), manzanas (11,8%), peras (6,9%), melocotones (4,3%), fresas/fresón (2,5%), melón (8,6%), sandía (7,5%), ciruelas (1,7%), cerezas (1,6%), uvas (2,4%), kiwi (3,0%), otros (10,44%).	278,1	15,4
Legumbres	Legumbres (100%)	8,7	0,5
Bebidas	Vinos tranquilos D.O. (2,2%), espumosos/cavas D.O. (0,4%), vino de mesa sin D.O. (3,6%), otros vinos (0,52%), cervezas (12,3%), sidra (0,2%), bebida con vino (0,8%), agua de bebidas envasadas (37,2%), bebidas alcohólicas alta graduación (0,7%), bebidas refrescantes y gaseosas (33,6%), zumo y néctar (8,5%), café (1,24%), te/infusiones (0,22%), cacao (0,32).	386,4	21,4
Aceites vegetales	Aceite de oliva (72,6%), aceite de girasol (25,26%), otros (2,11%).	36,4	2,0
Resto de alimentos		74,6	11,3

Fuente: MAPA, 2011.

2.2. Alimentos con mayores tasas de capacidad antioxidante.

Los alimentos de origen vegetal generalmente contienen una mayor cantidad de antioxidantes que los alimentos de origen animal. En la Tabla 2.2-1 se presenta la contribución de alimentos de origen vegetal de consumo frecuente a la ingesta de diversos compuestos antioxidantes.

Alimentos como los condimentos y hierbas aromáticas, las hierbas y plantas medicinales, y las vitaminas y suplementos dietéticos incluyen a los alimentos más ricos en antioxidantes. Los alimentos como bayas y sus productos derivados, las frutas y zumos de frutas, las nueces y semillas, los cereales para el desayuno, los chocolates, las bebidas y las hortalizas junto con sus productos derivados, incluyen a los alimentos y bebidas con una cantidad de antioxidantes que varía de media a alta. Mientras que la cantidad de antioxidantes de los aceites vegetales es comparativamente baja (Saura-Calixto and Goñi, 2006; Carlsen et al., 2010; Floegel et al., 2011).

La mayoría de las especias o condimentos y las hierbas aromáticas tienen contenidos de antioxidantes altos. Aunque en términos de cantidad consumida estos alimentos aportan poco a la alimentación diaria, siguen contribuyendo de manera importante al consumo de antioxidantes, especialmente en culturas alimentarias en donde las especias y hierbas son usadas con regularidad. La mayor concentración de antioxidantes que se aprecia en diversas hierbas deshidratadas respecto a las frescas, es un efecto normal del proceso de secado que mantiene la mayoría de antioxidantes intactos en el producto final. Esta tendencia también ha sido reconocida en algunos frutos y en sus contrapartes deshidratadas. Por lo tanto, las hierbas y frutas secas son excelentes fuentes de antioxidantes (Divya et al., 2012).

Las hierbas y plantas medicinales tradicionales también son productos con concentraciones altas de antioxidantes. Se ha especulado que la presencia de potentes antioxidantes asociados a diversas plantas es un factor que contribuye a las propiedades curativas. Un ejemplo es “Sangre de dragón”, una mezcla peruana de savia de troncos de tres variedades de la especie *Croton lechleri*. Sus propiedades incluyen la curación de heridas, antifúngico, antiséptico, antiviral y antihemorrágico. Los principales constituyentes de esta savia son las proantocianidinas. Los estudios han mostrado que limitan la transcripción de un amplio rango de citocinas proinflamatorias, también es un mediador y acelerador de la sanación de úlceras estomacales (Saffi et al., 2006).

Tabla 2.2.-1 Contribución de alimentos de origen vegetal a la ingesta de antioxidantes.

Grupo	Compuesto	Alimento
Flavonas	Apigenina	Perejil, vino, puerro
	Luteolina	Pimiento rojo, naranja, melón
	Rutina	Piel de tomate, vino tinto
Flavonoles	Quercetina	Cebolla, lechuga, broccoli, aceituna, okra, calabacín, té, vino tinto, arándanos
	Kaempferol	Verduras (endivia, brócoli, té negro), espinaca, cebolla,
	Isoramnetina	Cebolla, eneldo, Apio
	Mirecetina	Tomate, perejil, uvas, arándanos, vino tinto
Flavanonas	Eriodictial	Zumo de limón, zumo de naranja
	Hesperitina	Naranja, zumo de naranja y de limón
	Naringenina	Naranja, tomate, zumo naranja, vino tinto
	Taxifolina	Cítricos
Flavan-3-ols	Catequina	Manzana, durazno, uva
	Epicatequina	Manzana, durazno, uva, vino tinto
	Galocatequina	Lentejas, uvas, té, vino, cerveza
	Epigallocatequina	Durazno, manzana, té
	Epicat. Galato	Uvas, té, higos
	Epigaloc. Galato	Durazno, té verde y negro, manzana
Antocianidinas	Cianidina	Cereza, fresa, frambuesa, uva manzana, durazno
	Delfinidina	Berenjena, plátano, vino
	Malvidina	Vino tinto, uvas tintas
	Pelargonidina	Fresa, cereza, manzana
	Peonidina	Cereza, vino
	Petunidina	Vino, vinagre
	Isoflavonas	Judías secas, garbanzos, lentejas
	Proantocianidinas	Uvas, durazno, pera, vino tinto
Ácidos fenólicos	Ácido fenólico	Trigo, maíz, tomate, espinacas, espárragos
	Ácido caféico	Uvas blancas, vino blanco, tomate, espinacas, espárragos
	Ácido gálico	Té
	Ácido clorogénico	Manzana, pera, cereza, ciruela, melocotón, albaricoque, tomate
Vitamina C		Naranja, pimiento, tomate
Vitamina E		Aceite de oliva, aceitunas, tomate
β-caroteno		Zanahorias, tomate, melón
Selenio		Pan, arroz, queso madurado
TEAC		Naranja, tomate, pimiento, vino tinto
TRAP		Naranja, tomate, pimiento, vino tinto
FRAP		Naranja, tomate, pan
ORAC		Manzana, naranja, patata
Fenoles totales		Naranja, tomate, patata

Fuente: Valls-Bellés et al., 2005; Dilis and Trichopoulou, 2010.

Otra hierba medicinal extremadamente antioxidante es la Trifala, una formulación herbal Ayurvédica originaria de la India que muestra actividad antiinflamatoria (Rasool and Sabina, 2007), antibacterial y sanadora de heridas (Deep et al., 2005). Se ha demostrado que Arjuna, otra fórmula Ayurvédica, posee actividades benéficas para la salud (Manna et al., 2007; Devi et al., 2007).

Las bayas y sus productos derivados son excelentes fuentes de antioxidantes como flavonoides, antocianinas, taninos, estilbenos, ácidos fenólicos, lignanos y ácido ascórbico (Maatta-Riihinen et al., 2004; Paredes-López et al., 2010, Tabart et al., 2011). El contenido de fitoquímicos de las bayas varía con las condiciones geográficas del cultivo, y entre cultivos (Scalzo et al., 2005), pero la aplicación de tratamientos térmicos doméstico (congelación, horneado, cocción en microondas o con vapor y fritura) no alteran la concentración de antioxidantes ni la capacidad antioxidante (Murphy et al., 2009).

Las nueces también son fuentes de antioxidantes, principalmente flavonoides concentrados en el pedicelo. Los frutos que conservan esta estructura presentan un mayor contenido de antioxidantes (Chen et al., 2005). En el caso de los pistachos, las concentraciones de flavonoles y antocianinas del pedicelo, son reducidas por tratamientos térmicos destinados a mejorar la apariencia de frutos defectuosos. Esta práctica además de resultar ilegal, es contraproducente, pues afecta la calidad biológica del producto (Navindra et al., 2006).

Después del agua, el té y el café son las bebidas más consumidas en el mundo. Aunque los patrones de consumo varían entre los países. Como resultado del alto contenido de antioxidantes y el consumo frecuente, el café y el té son importantes fuentes de antioxidates en diversas dietas.

La capacidad antioxidante de las infusiones de café se atribuye a antioxidantes naturales (principalmente fenoles derivados del ácido clorogénico), y a los antioxidantes inducidos durante el tostado como las melanoidinas y otros productos de las reacciones de Maillard (Niseteo et al., 2012). Sin embargo, la cantidad y tipo de compuestos ingeridos a partir de la bebida cambia según la variedad de café, el grado de tostado, el método de elaboración y el tamaño de la porción servida (Ludwig et al., 2012). Tanto el ácido clorogénico, sus derivados y la fibra dietaria del café (incluyendo las melanoidinas) pueden reducir el riesgo de cáncer colon-rectal, incrementando la motilidad y el estatus antioxidante del colon (Vitaglione, et al., 2012).

Introducción

En el té verde, se encuentran sustancias biofuncionales como el ácido gálico, flavonoides como las catequinas monoméricas, el galato de epigallocatequina, la epigallocatequina, el galato de epicatequina y la epicatequina. En el té negro adicionalmente a la quercetina y los flavonoles, predominan las catequinas polimerizadas, teaflavina, teaflavina 3,3'-digalato y el tearubínógeno, y dos alcaloides: cafeína y teobromina (Serpen et al., 2012). La potencia de los tés depende de los flavonoides predominantes, del tipo de cultivar y del método de procesamiento. La operación de aireado para la producción del té negro reduce significativamente el contenido de fenoles totales, el perfil de catequinas y la capacidad antioxidante

Es interesante, que el contenido de antioxidantes en la leche materna es comparable al de zumo de granada, fresas y café y en promedio mayor que el contenido de antioxidantes observado en las fórmulas infantiles disponibles en el comercio (Carlsen et al., 2010).

Los posibles efectos benéficos del chocolate han sido estudiados durante varios años. Los resultados muestran una alta correlación entre el contenido de cacao y el contenido de antioxidantes, lo que está de acuerdo con estudios previos (Lee et al., 2003). El cacao contiene elevadas concentraciones de flavonoles, catequinas y procianidinas; esos flavonoides muestran potente actividad antioxidante y antiplaquetaria tras el consumo. Sin embargo los granos de cacao de diferentes países y orígenes y los métodos usados para su preparación pueden influir sobre los antioxidantes polifenólicos de los productos (Lacroix and Bishop, 2010).

Como ha sido demostrado, la variación del contenido de antioxidantes es muy amplia. De manera semejante al contenido de cualquier otro componente alimentario, las cifras pueden variar por diversas razones, como son las condiciones de crecimiento, los cambios estacionales y las diferencias genéticas entre cultivares (Scalzo et al., 2005), las condiciones de almacenamiento (Xianquan et al., 2005) y las diferencias en los procesos de manufactura y procesamiento (Hartman et al., 2008; Ismail and Lee 2005).

Por otra parte, el procesamiento también puede incrementar el potencial de los alimentos como fuente de antioxidantes incrementando la cantidad de antioxidantes liberados de la matriz alimentaria que de otra manera no estarían o estarían menos disponibles para la absorción (Lindsay and Ashtley, 2005). El procesamiento del tomate en uno de esos ejemplos en donde el licopeno de la salsa de tomate procesada por calor es más biodisponible que en el tomate no procesado (Unlu et al., 2007).

2.3. Capacidad antioxidante de la dieta española.

La capacidad antioxidante dietaria total puede ser definida como la capacidad antioxidante de todos los alimentos vegetales y bebidas (alcohólicas y no alcohólicas) consumidas diariamente en una dieta. La capacidad antioxidante dietaria total puede representar la cantidad de unidades antioxidantes (equivalentes de trolox) presentes diariamente en el tracto gastrointestinal (Saura-Calixto and Goñi, 2006).

Se ha estimado que la capacidad antioxidante dietaria total en la dieta española es de 6.014 y 3.549 μmol de equivalentes de trolox respectivamente para el FRAP y el ABTS (Saura-Calixto and Goñi, 2006). La contribución de cada alimento específico a la capacidad antioxidante dietaria total depende tanto de la ingesta total, como de la capacidad antioxidante del alimento. Los contribuyentes mayoritarios de la capacidad antioxidante dietaria total son las bebidas (alrededor de 68 % - promedio de los valores de FRAP y ABTS) y las frutas y hortalizas (alrededor del 20 %), mientras que la contribución de los cereales y de los aceites vegetales es baja. A pesar de su bajo consumo, las nueces y legumbres representan casi el 8 % de la capacidad antioxidante dietaria total (6,8 y 22,3 g, respectivamente).

Se ha propuesto que deberían considerarse las dietas en su totalidad cuando se está investigando el rol de los antioxidantes dietarios en la salud, ya que los estudios en alimentos individuales pueden sobreestimar sus efectos potenciales dentro de una dieta completa (Saura-Calixto and Goñi, 2006).

Los alimentos que se sabe que contienen una elevada capacidad antioxidante pueden contribuir muy poco a la capacidad antioxidante de las dietas. Por ejemplo, las contribuciones del té y el aceite de oliva a la capacidad antioxidante dietaria total de la dieta española constituyen tan solo 2,7 y 0,6 %. El consumo de vino representa alrededor del 14 % de la capacidad antioxidante dietaria total, y el café es el mayor contribuyente individual (44,5 %) (Saura-Calixto and Goñi, 2006). La alta contribución del café a la ingesta de antioxidantes en la dieta española fue reportada previamente (Pulido et al., 2003) y recientemente demostrada de nuevo (Svilaas et al., 2004) en un estudio de cohorte en Finlandia y Francia (Pérez-Jiménez et al., 2011). También se considera que el cacao aporta una proporción importante (9%) a la capacidad antioxidante dietaria total en España (Martínez and Izquierdo, s/f).

Introducción

Respecto a los microconstituyentes alimentarios, la vitamina C, la vitamina E, los compuestos polifenólicos y los carotenoides son reconocidos como los antioxidantes dietarios más importantes. Para la determinación de la contribución de esos microconstituyentes alimentarios a la capacidad antioxidante dietaria total deben ser considerados los siguientes puntos (Saura-Calixto and Goñi, 2006):

- La ingesta diaria de fenoles totales en la dieta española se estimó en 1.171 mg/persona/día que es considerablemente mayor que la ingesta diaria de carotenoides (1,67mg), vitamina C (137 mg) y vitamina E (8,6 mg) (Agudo et al, 2007).
- Los compuestos fenólicos presentan mayor capacidad antioxidante in vitro y in vivo que las vitaminas y carotenoides (Sánchez-Moreno et al., 2000). Los fenoles parecen ser cuantitativamente los principales antioxidantes dietarios en frutas (Vinson et al., 2001). Se ha reportado la vitamina C como un contribuyente minoritario a la capacidad antioxidante de frutas comunes, y como despreciable la contribución de los carotenoides (Gardner et al., 2000). La ingesta diaria recomendada de vitamina C (60 mg) más la ingesta recomendada de vitamina E (12 mg) es equivalente a alrededor de 580 μ mol de equivalentes de Trolox (FRAP) y 400 μ mol de equivalentes de trolox (ABTS). Esto representa tan solo cerca de 10% de la capacidad antioxidante dietaria total en la dieta mediterránea española (Pulido et al., 2003).
- La capacidad antioxidante de los alimentos y bebidas se correlaciona fuertemente con el contenido de polifenoles. Hay una alta correlación entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante en alimentos vegetales (FRAP, ABTS) y en las bebidas (FRAP, ABTS) (Saura-Calixto and Goñi, 2006).

Esos datos sugieren que los polifenoles son cuantitativamente los antioxidantes dietarios más importantes. Sin embargo, se postula que los efectos biológicos de esas sustancias dependen de su biodisponibilidad que a su vez está condicionada por la clase de antioxidante, la preparación del alimento, la matriz y otros factores externos (Manach, et al, 2004; Porrini and Riso, 2008).

Se estima que alrededor del 48 % de los polifenoles dietarios son bioaccesibles en el intestino delgado, mientras que el 42 % se hace bioaccesible en el intestino grueso. Solo pequeñas cantidades (10 %) son inaccesibles y se mantienen como parte de la matriz alimentaria después de que el proceso digestivo se haya realizado por completo (Saura-Calixto et al., 2007).

En la población francesa la ingesta de polifenoles en la cohorte del estudio SU.VI.MAX (SUplémentation en Vitamines et Minéraux AntioXydants) fue calculada a partir de los valores presentados en la base de datos Phenol-Explorer que contiene las concentraciones de 502 polifenoles en 452 alimentos. Los más consumidos fueron los ácidos hidroxicinámicos, con una ingesta cercana a los 600 mg/d. Las proantocianidinas fueron los segundos más consumidos (227 mg/d) (Pérez-Jiménez et al., 2010). Las catequinas y antocianinas fueron las siguientes más consumidas (99 y 57 mg/d, respectivamente) y estuvieron seguidas en orden decreciente por los flavonoles, ácidos hidroxibenzóicos, flavonas, flavononas, teaflavinas y dihidroflavonoles (Pérez-Jiménez et al. 2011).

La fruta parece ser un tema esencial en la prevención de enfermedades dietarias, tanto sola o en algunos casos en combinación con hortalizas, nueces y otros alimentos vegetales. Una razón posible para los efectos benéficos del consumo de frutas puede ser su capacidad antioxidante y la capacidad de inhibición de las lipoproteínas de baja densidad (Saura-Calixto and Goñi, 2006). En relación a este tema Martínez-González y colaboradores (2002) encontraron una asociación inversa entre el primer infarto agudo al miocardio y el consumo de frutas en la dieta mediterránea española, pero no con el consumo de hortalizas o legumbres.

Un estudio de población basado en una investigación prospectiva que involucró a 28.000 adultos en Grecia, mostró que la adherencia a la dieta mediterránea estaba asociada a una baja mortalidad total por enfermedades cardíacas coronarias y por cáncer. Sin embargo tan pronto como se indagó por alimentos específicos, solo el consumo de frutas y nueces fue predictivo de la mortalidad total (Trichopoulou et al., 2006; Tyrovolas and Panagiotakos, 2009).

En un estudio semejante (41.358 sujetos) se concluyó que un alto consumo de fruta fresca, y de hortalizas de raíces y frutos se asocia con una mortalidad reducida; los autores postularon que esta tendencia resultó de su alto contenido de vitamina C, provitamina A, carotenoides y licopeno. La capacidad antioxidante podría explicar parcialmente el efecto del ácido ascórbico y de la provitamina A pero no la asociación con el licopeno (Agudo et al., 2007).

Sin embargo, en esta clase de estudios mencionados, existe una debilidad debido a que los cambios en el contenido de antioxidantes de los alimentos durante el procesamiento industrial o doméstico no han sido considerados, ni factores como las condiciones ambientales y de cultivo.

La heterogeneidad que llegan a presentar los alimentos hace que las bases de datos sobre el contenido de antioxidantes en alimentos aún estén lejos de ser perfectas (Dilis and Trichopoulou, 2010a). Incluso tablas tan exhaustivas como Phenol-Explorer adolecen de limitaciones como la ausencia de datos sobre el contenido de determinados compuestos en los alimentos (tearrubiginas) o la presentación de datos insuficientes (proantocianidinas). También carece de datos sobre alimentos cocinados (Tarascou et al., 2010).

Aunque parece que los alimentos ricos en antioxidantes son benéficos, aún no es clara la cantidad diaria de antioxidantes necesaria para mantener un buen estado de salud. También existen evidencias que apoyan el hecho de que en altas concentraciones, las sustancias antioxidantes ejercen un efecto prooxidante.

2.4. Rueda antioxidante de los alimentos.

La capacidad antioxidante dietaria total puede ser definida como la capacidad antioxidante de todos los alimentos vegetales y bebidas (alcohólicas y no alcohólicas) consumidas diariamente en una dieta, representa la cantidad de unidades antioxidantes (equivalentes de Trolox) presentes diariamente en el tracto gastrointestinal.

Dada la importancia de la ingesta de antioxidantes, ha sido propuesta la “Rueda Antioxidante de los Alimentos” (Fig. 2.4-1). Es un recurso didáctico enfocado a la población, que fue diseñado por la Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación teniendo en cuenta las ventajas que se reconocen en la ingesta de antioxidantes y basándose en la tradicional “Rueda de Alimentos”.

Tiene como objetivo sensibilizar a la población en general sobre los beneficios que una dieta saludable, variada y equilibrada pueden proporcionar a la salud, especialmente en lo que respecta a una ingestión adecuada de antioxidantes.

La “Rueda Antioxidante de los Alimentos”, representaría gráficamente la necesidad de ingerir diariamente cantidades concretas de los alimentos más destacados con mayor capacidad antioxidante: frutas, pan, patatas, hortalizas, cacao, legumbres, frutos secos y aceite de oliva (SEDCA; 2013).

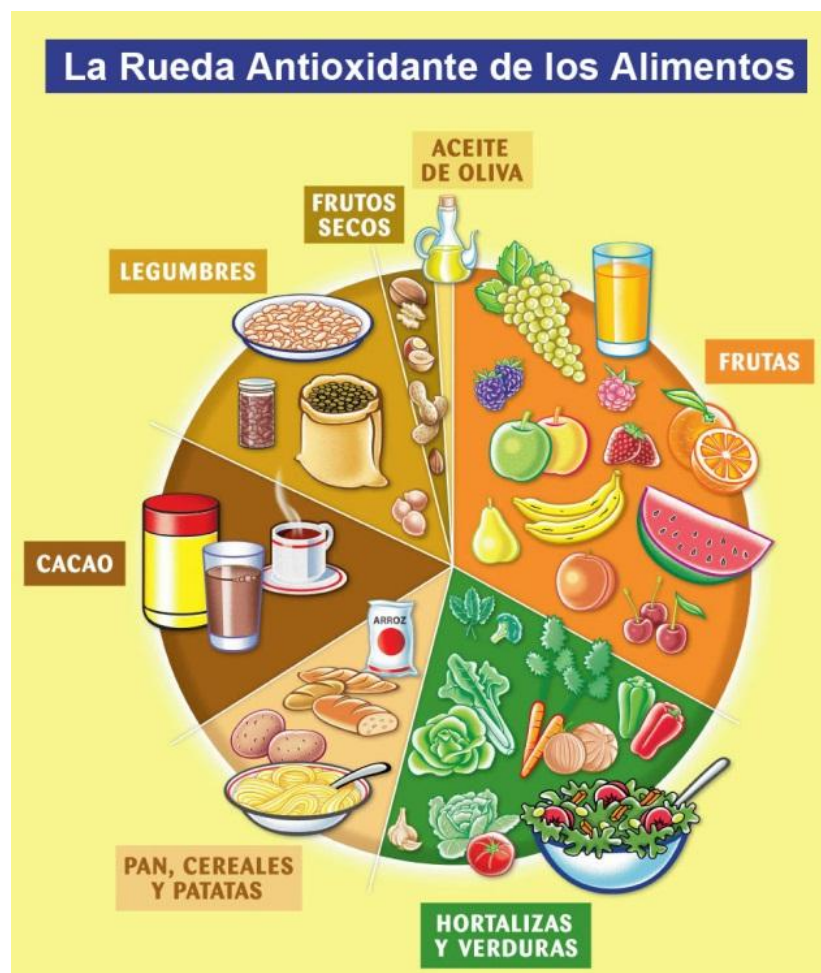


Figura 2.4-1. Rueda Antioxidante de los alimentos (Martínez-Álvarez et al., 2013).

3. DESCRIPCIÓN GENERAL, DISTRIBUCIÓN Y CONTENIDO DE SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES EN HORTALIZAS (Patata, Calabaza, Tomate, Berenjena) Y ACEITE DE OLIVA.

3.1. Generalidades del aceite de oliva.

3.1.1. Origen del olivo.

Los botánicos concuerdan que el olivo procede de la domesticación del acebuche. Se admite que dicha domesticación se efectuó en la cuenca mediterránea oriental en la región sirio-palestina y desde esa zona original se difundió a los territorios vecinos y posteriormente hacia el Mediterráneo occidental, siguiendo una dirección este-oeste. La olivicultura, tras ser desarrollada en la región de Levante, se introduciría desde Anatolia hasta las tierras bañadas por el Mar Egeo. Posteriormente, desde el Mediterráneo oriental, el olivo ganaría los territorios occidentales. Esta difusión fue efectuada por los colonos fenicios y griegos (Mataix y Barbancho, 2008).

Fue introducido en las comunidades indígenas de Francia o de la península Ibérica por los primeros colonizadores griegos, a partir del año 600 a.C., aunque fue con la romanización y concretamente a partir de finales del siglo II a.C. cuando el cultivo del olivo y otras especies (vid, trigo, etc.) experimentaron un incremento significativo, asumiendo desde entonces un papel fundamental en la economía agrícola por el abastecimiento de los centros urbanos más importantes del país y por la exportación al resto de los territorios incorporados al imperio romano (Tous-Romero, 1993).

3.1.2. Características botánicas del olivo.

El olivo pertenece a la familia de las Oleáceas. El género *Olea* está dividido en los subgéneros: *Tetrapilus* y *Olea*. El subgénero *Olea* se divide a su vez en dos secciones: *Olea* y *Ligustroides*. La sección *Olea* contiene al complejo *Olea europaea* que actualmente es dividido en cuatro

Introducción

subespecies: *O.e. ssp cuspidata* (China y Africa del Este y del Sur), *O.e. ssp laperrinei* (Africa del Este y el Sahara), *O.e. ssp cerasiformis* (Islas Canarias) y *O.e. ssp europaea* (todo el entorno del Mediterráneo). La subespecie *O.e. ssp europaea* aún se divide en dos variedades: *sylvestris* (el acebuche u oleaster) y *macrocarpa* (el olivo), que no se pueden diferenciar por criterios botánicos y solo se distinguen en que uno es cultivado y el otro no (Mataix y Barbancho, 2008).

El fruto es una drupa ovoide cuya pulpa o mesocarpio es carnoso y rico en aceite. El epicarpio varía de coloración según su maduración y pasa del verde pálido al rojo-violáceo y al negro. El endocarpio es leñoso, fusiforme, duro y de una sola semilla. El desarrollo del fruto tiene lugar durante todo el verano y llega a la maduración verde entre septiembre y octubre. El cambio de color empieza a continuación, y la maduración completa de la mayoría de los cultivares sólo se alcanza en el invierno (Mataix y Barbancho, 2008).

- **Variedades de olivo**

Los hallazgos arqueológicos hacen suponer que algunas de las variedades actualmente cultivadas ya lo eran hace cientos de años, y que los actuales cultivares debieron tener su origen en una selección inicial de clones que posteriormente se propagaron y se hibridaron con las poblaciones locales de acebuches. El olivo cultivado agrupa más de 260 variedades, aunque solamente unas 25 son consideradas como principales. Mataix y Barbancho (2008) las clasificaron en aceitunas de almazara, de mesa o de doble aptitud, siguiendo una perspectiva agronómica de tipo práctico en función del destino que se da a su fruto (Tous-Romero, 1993). Las variedades de mayor aplicación en la industria española de extracción de aceite se describen en la Tabla 3.1-1.

3.1.3. Producción de aceite de oliva.

- **Producción Mundial.**

Los países del perímetro mediterráneo concentran más del 90 % de la producción de aceite de oliva del mundo (Fig. 3.1-1). Sin embargo, el incremento del consumo a nivel mundial ha propiciado el establecimiento de esta industria en lugares tan distantes de su origen como California y Australia (UNCTAD, 2005).

Tabla 3.1-1. Variedades de oliva de mayor aplicación en la industria de extracción de aceite.

Variedad	Distribución	Aceite
Picual	Variedad más extendida. Jaén, Córdoba y Granada.	Elevada estabilidad por su alto contenido en polifenoles y alto contenido en ácido oleico. Intenso sabor amargo, gran fuerza, sabor afrutado, tonos picantes.
Hojiblanca	Tercera variedad de importancia. Córdoba, Málaga, Cádiz, Granada y Sevilla.	Baja estabilidad a la oxidación. Perfil de ácidos grasos equilibrado y menor cantidad de saturados. Color verde intenso, aromas de frutas maduras y de aguacate, sabor agradable con ligero amargor y picor.
Cornicabra	Segunda variedad más cultivada y la tercera en producción. Castilla-La Mancha, Toledo y Ciudad Real.	Gran estabilidad por su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados. Color amarillo verdoso a oro, con aromas frescos y sabor entre dulce, amargo y algo picante.
Picuda	Zona norte de Granada, Málaga, Jaén y en la zona Penibética Cordobesa. También usadas para consumo de mesa.	Su perfil de ácidos grasos lo hace sensible a la oxidación, por lo que se complementa con el de otras variedades como la picual. Color amarillo verdoso a oro, con aromas frescos y sabor entre dulce, amargo y algo picante.
Arbequina	Cataluña, Aragón.	Por su composición son muy delicados frente a la oxidación. Frutados, entre verdosos y amarillos, con aromas a manzana y almendra fresca. Son suaves, dulces, amargan y pican poco.

Los principales países productores son al mismo tiempo los principales consumidores. Los países de la Unión Europea representan el 71 % del consumo mundial y justo con los países europeos del resto de la cuenca mediterránea se alcanza el 77 %. El resto de países consumidores son Estados Unidos, Canadá, Australia y Japón.

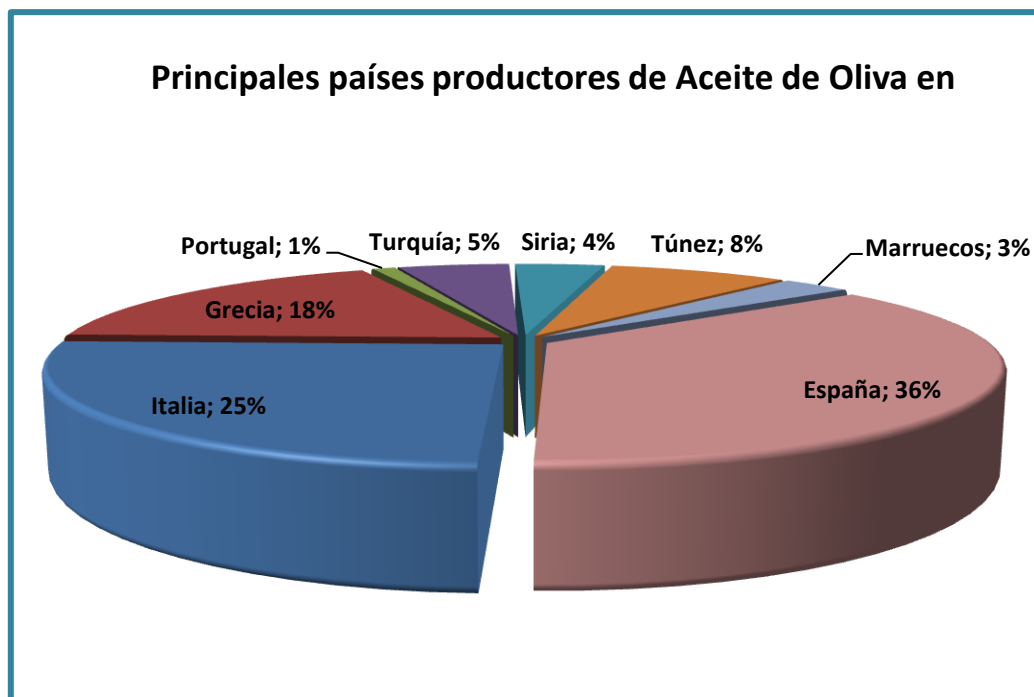


Figura 3.1-1. Principales países productores de aceite de oliva en 2005 (UNCTAD, 2009).

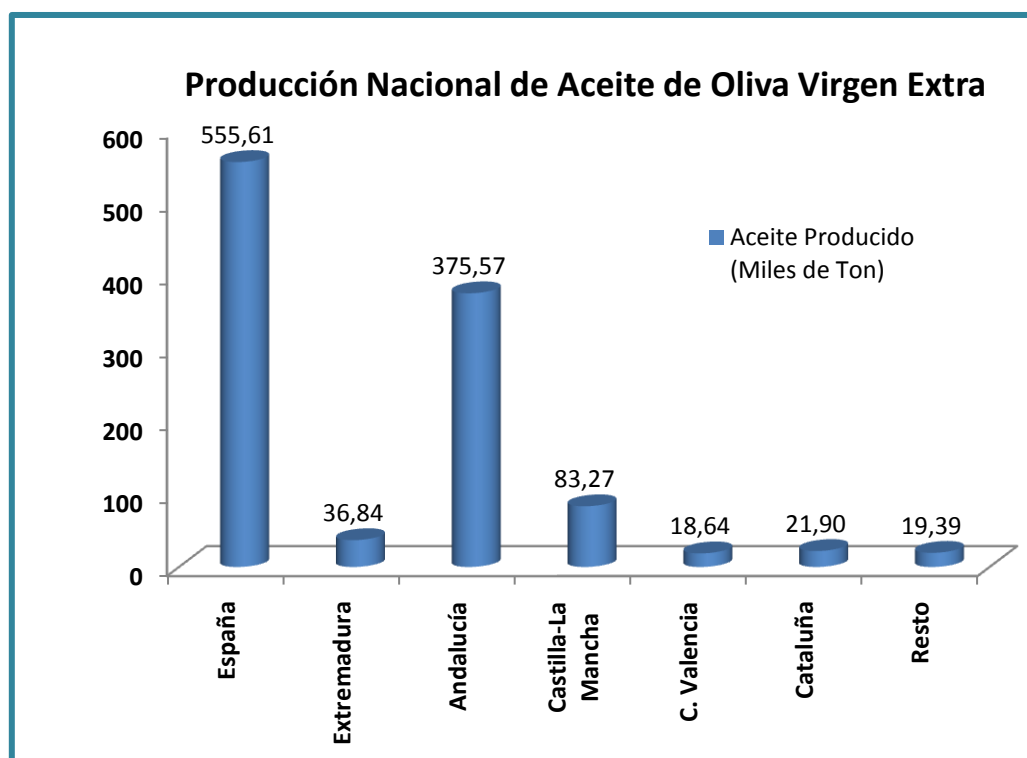


Figura 3.1-2. Producción Nacional y primeras comunidades productoras de aceite de oliva en España (MAGRAMA, 2011 a).

- **Producción Nacional.**

Los datos de la producción de aceite de oliva en almazaras presentados en el balance estadístico del 2010 publicado por el Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente (MAPA, 2011a); muestran que la producción en España de aceite de oliva alcanzó los 1,4 millones de toneladas, de las que 555.611 se clasificaron en la categoría virgen extra (40 %), y el resto fue clasificado como aceite lampante. La Comunidad Autónoma con mayor producción fue Andalucía (68 %), seguida de Castilla-La Mancha (15 %), Extremadura (7 %), Cataluña (4 %) y la Comunidad Valenciana (3 %) (Fig. 3.1-2).

3.1.4. Proceso de obtención del aceite de oliva.

El momento más apropiado para la recolección de las aceitunas destinadas a la extracción de aceite es cuando el fruto alcanza su maduración óptima, en ese momento, el contenido y la calidad del aceite es el más alto. La tecnología empleada es compleja y la calidad del producto depende de su correcta aplicación: recolectar la aceituna en el grado preciso de maduración, transformarla en un tiempo razonable, y emplear las instalaciones y las condiciones adecuadas (COI, 1996).

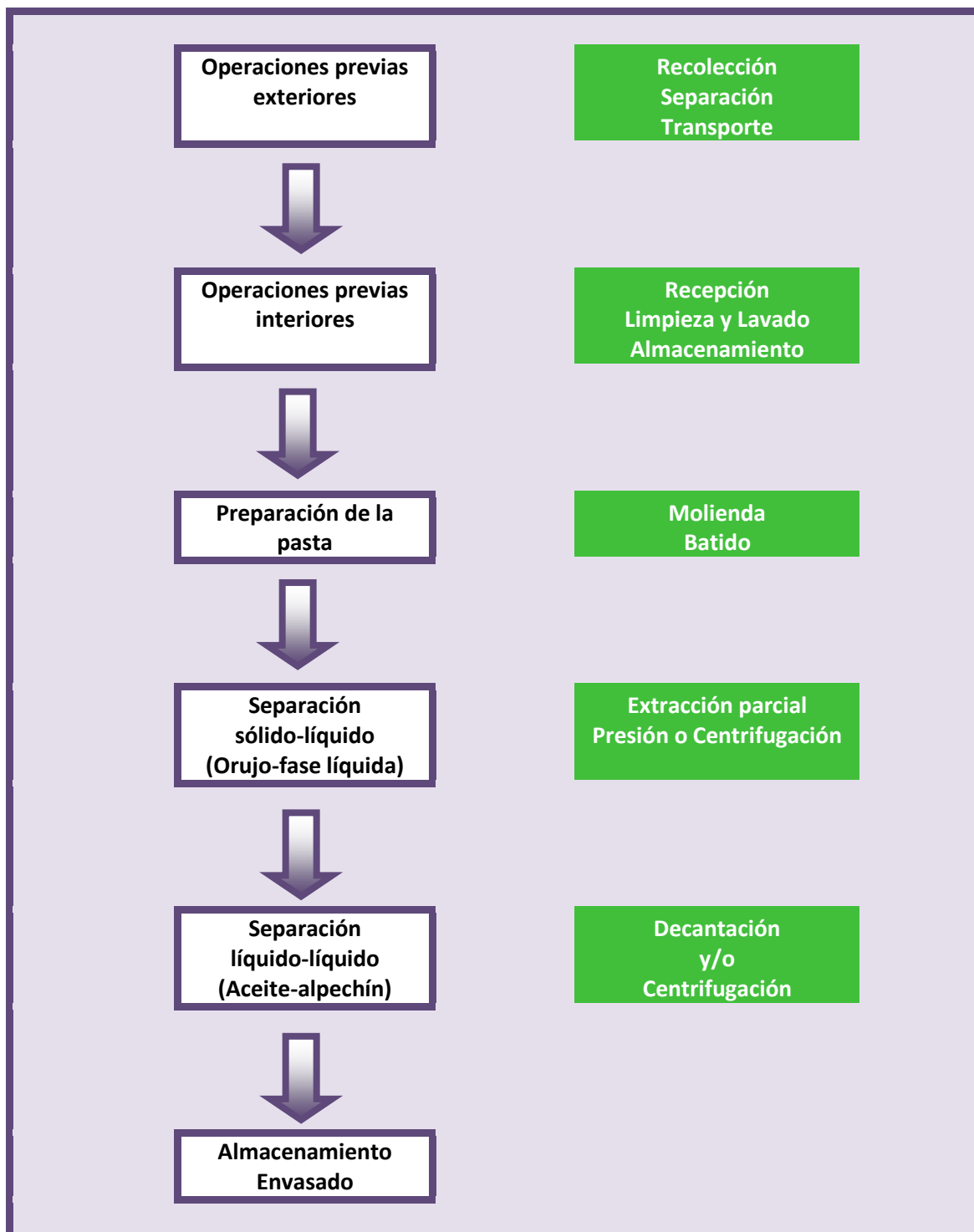
La extracción del aceite con el método tradicional, como el molino de rulos (empiedro) y el sistema de prensas, era poco operativo y racional, ya que las necesidades de mano de obra eran elevadas y la limpieza e higiene eran difíciles. El proceso moderno de obtención supone una importante transformación que incrementa la calidad del producto. Las etapas que lo conforman se muestran a continuación en la Tabla 3.1-2.

3.1.5. Definición y clasificación del aceite de oliva.

De entre las diferentes categorías comerciales de los aceites de oliva y orujo de oliva (Tabla 3.1-3), seis de ellas están destinadas al consumo humano directo: el aceite de oliva virgen extra (AOVE), el aceite de oliva virgen (AOV), el aceite de oliva refinado, el aceite de oliva, el aceite de orujo de oliva refinado y el aceite de orujo de oliva. El AOVE o el AOV fueron definidos recientemente por la regulación de la Comunidad Europea como “aquellos obtenidos del fruto

del árbol del olivo (*Olea europea* L.) únicamente por procedimientos mecánicos o por otros medios físicos en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite, que no hayan tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado” (S/A, 2003).

Tabla 3.1-2. Etapas en el proceso de obtención del aceite de oliva.



Fuente: Lendínez, 2004 en Samaniego 2006.

Tabla 3.1-3. Denominaciones del aceite de oliva y de orujo de oliva.

Aceites de oliva vírgenes		Aceite de orujo de oliva	
Aptos para el consumo	No aptos para el consumo	Aptos para el consumo	No aptos para el consumo
-Aceite de oliva virgen extra	-Aceite de oliva virgen lampante	-Aceite de orujo de oliva refinado	-Aceite de orujo de oliva crudo
-Aceite de oliva virgen		-Aceite de orujo de oliva	
-Aceite de oliva refinado			
-Aceite de oliva compuesto por aceites de oliva refinados y de oliva vírgenes.			

Fuente: UE, 2011

En particular, el AOVE (acidez libre ≤ 0.8 g/100g) es reconocido por la regulación C.E.E. como el producto con la mayor calidad entre las diferentes categorías de aceites de oliva (C.E.E., 2011). El aceite de oliva (AO) (acidez libre ≤ 1.0 g/100g) se obtiene mezclando aceite de oliva virgen con aceite de oliva refinado. El aceite de orujo de oliva (acidez libre ≤ 1.0 g/100g) es una mezcla entre aceite de oliva virgen y el aceite de orujo de oliva refinado; este último es producido refinando aceite crudo de orujo de oliva, extraído previamente del orujo (subproducto sólido) con solventes. Las características fisicoquímicas de los aceites de oliva y de orujo de oliva se sintetizan en la tabla (Tabla 3.1-4).

La clasificación de los aceites de oliva se realiza tomando como punto de partida los parámetros instrumentales y sensoriales correspondientes a los criterios de calidad (grado de acidez, índice de peróxidos, espectrometría UV y valoración organoléptica). Una vez que se estableció o confirmó la clasificación del aceite se procede a la obtención de los valores de los criterios de pureza (estigmastadieno, isómeros trans de ácidos grasos, contenido de ácidos grasos Δ ECN42, composición esterólica y esteroides totales, eritrodol + uvaol, ceras) para confirmar la conformidad con la categoría asignada (UE, 2011).

Introducción

Tabla 3.1-4. Características de los aceites de oliva.

Categoría	Ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) y ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs)	Acidez (%) (*)	Índice de Peróxido mEq O ₂ /kg (*)	Ceras mg/kg (**)	Monopalmi-tato de 2 glicérido (%)	Estigmastadieno mg/kg (1)	Diferencia ECN42 (HPLC) y ECN42 (cálculo teórico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Evaluación orgánica Métrica Mediana del defecto (Md) (*)	Evaluación orgánica Métrica Mediana del atributo frutado (Mf) (*)
1. Aceite de oliva virgen extra	Σ FAMES + FAEEs ≤ 75 mg/kg o 75 mg/kg < Σ FAMES + FAEEs ≤ 150 mg/kg y (FAEEs/FAMES) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Aceite de oliva virgen	-----	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Aceite de oliva lampante	-----	> 2,0	-----	≤ 300 (3)	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 si % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	-----	-----	-----	Md > 2,5 (2)	-----
4. Aceite de oliva refinado	-----	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % % ≤ 1,1 si % ácido palmítico total > 14 %	-----	≤ 0,3	-----	≤ 1,10	≤ 0,16	-----	-----
5. Aceite de oliva (compuesto exclusivamente por aceites de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes)	-----	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total > 14 %	-----	≤ 0,3	-----	≤ 0,90	≤ 0,15	-----	-----
6. Aceite de orujo de oliva crudo	-----	-----	-----	> 350 (4)	≤ 1,4	-----	≤ 0,6	-----	-----	-----	-----	-----
7. Aceite de orujo de oliva refinado	-----	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	-----	≤ 0,5	-----	≤ 2,00	≤ 0,20	-----	-----
8. Aceite de orujo de oliva	-----	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	-----	≤ 0,5	-----	≤ 1,70	≤ 0,18	-----	-----

(1) Suma de isómeros que podrían separarse (o no) mediante columna capilar.

(2) O cuando la mediana de los defectos es inferior o igual a 3,5 y la mediana del atributo frutado es igual a 0.

(3) Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de oliva lampante si los alcoholes alifáticos totales son inferiores o iguales a 350 mg/kg o si el porcentaje de eritrodil y uvaol es inferior o igual a 3,5.

(4) Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de orujo de oliva crudo si los alcoholes alifáticos totales son superiores a 350 mg/kg y si el porcentaje de eritrodil y uvaol es superior a 3,5.

Fuente: UE, 2011.

3.1.6. Composición química del aceite de oliva virgen extra.

- **Fracción saponificable.**

Representa la mayor parte del peso total, entre 98 y 99 %. Está formada por una mezcla de triglicéridos (ésteres naturales de ácidos grasos y de glicerina) y ácidos grasos libres (Tabla 3.1-5). El AOVE es rico en ácido oléico (ácido graso monoinsaturado) representando entre el 55 y 85 % del contenido de ácidos grasos y entre 5 a 8 % de ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico) (Maggio et al., 2009). Los dos ácidos grasos poliinsaturados presentes en el aceite de oliva (C18:2 omega-6 y C18:3 omega-3) son los conocidos como ácidos grasos esenciales; el nivel del omega-3 se aplica como parámetro para comprobar la autenticidad del aceite de oliva (Casal et al., 2010).

Tabla 3.1-5. Perfil de ácidos grasos de algunos aceites de consumo humano.

Acido Graso	Oliva virgen extra ⁴	Palma refinado ³	Palma ¹	Aguacate (*PF) ²	Camelia (PF) ²	Calabaza (PF) ²	Soja ²	Sésamo(PF) ²	Maiz ⁵	Girasol ⁵	Cacahuete ⁵
C12:0 Láurico		Nd	1,0						Nd	Nd	
C14:0 Mirístico		9,2	1,2						Nd	Nd	
C16:0 Palmítico	9,4	33,8	36,2	14,1	9,3	11,5	10,1	9,4	14,1	12,7	13,0
C18:0 Esteárico	1,7	3,7	3,1	0,4	1,9	5,6	3,9	5,6	2,3	3,7	3,0
C20:0 Araquídico	0,3	0,3		0,1	<0,1	0,4	0,3	0,6			
C22:0 Behénico				<0,1	<0,1	0,1	0,3	0,1			
SATURADOS	11,4	47,0	41,5	14,7	11,4	17,6	14,6	15,7	16,4	16,4	16,0
C16:1 Palmitoleico	0,4	0,2		5,7	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,00	<0,1
C18:1 ω9 Oleico	80,7	39,7	45,8	69,1	79,1	37,7	24,4	41,8	33,5	24,8	50,4
C20:1 ω9 Eicosaenoico			0,2	0,2	0,4	0,1	0,2	0,2			
C24:1		0,1									
MONOINSATURADOS	81,1	40,0	46,0	75,0	79,9	37,9	24,8	42,1	33,6	24,8	50,5
C18:2 Ω6 Linoléico	6,3	10,9	11,7	9,6	8,4	44,0	52,8	41,3	49,4	54,0	33,4
C18:3 Linolénico	0,6	0,3		0,6	0,3	0,2	7,3	0,7	0,6	4,8	0,1
POLIINSATURADOS	6,9	11,2	11,7	10,2	8,7	44,2	60,1	42,0	50,0	58,8	33,5

*PF Prensado en frío

Fuentes: ¹ Marcano et al., 2010; ² Haiyan et al., 2007; ³ Azlan et al., 2010; ⁴ Sun-Waterhouse et al., 2011; ⁵ Silva, et al., 2010.

Tabla 3.1-6. Componentes de la fracción insaponificable del aceite de oliva.

Compuesto	Cantidad o proporción	Función
Hidrocarburos terpénicos	180-800 mg/100g	
Escualeno	125-750 mg/100g	Quimiopreventivo
Carotenos		
B-carotenos	0,085-0,496 mg/100g	Provitamina antioxidante A
Licopeno	Tr*	Antioxidante
Alcoholes alifáticos	10-20 mg/100g	
Alcoholes triterpénicos	100-300 mg/100g	Olor
Eritrodiol		Antioxidante y antiinflamatorio
Alcoholes diterpénicos	150-800 mg/100g	
Fitol		
Clorofilas	0,1-1 mg/100g	
Feofitina (producto de descomposición)	0,2-24 mg/100g	Autooxidación
Esteroles	80-260 mg/100g	Induce Hipocolesterolemia
β -sitosterol	95-97 %	
Campesterol	2-3 %	
Estigmasterol	1-2 %	
5-Avenasterol		
Tocoferoles	7-30 mg/100g	
α -tocoferol	90-95%	Vitamina E
β - γ -tocoferol	$\leq 10\%$	Actividad antioxidante
δ -tocoferol	Tr	($\delta > \gamma > \beta > \alpha$)
Compuestos fenólicos	50-800 mg/kg (expresado como ácido caféico)	
Tirosol		Antioxidantes
Hidroxitirosol		Propiedades organolépticas
Compuestos aromáticos		Responsables del sabor (gusto y olor)
Alifáticos y aromáticos hidrocarburos, alcoholes, alcoholes alifáticos, terpenos oxigenados, aldehídos, cetonas, éteres, derivados furánicos, derivados tiofénicos, ésteres		

*Tr = traza

Fuente: Mataix y Barbancho, 2008.

- **Fracción insaponificable (0,5 a 1,5 %).**

Comprende otras muchas sustancias fundamentales como: terpenos (escualeno), esteroides, alcoholes, pigmentos (clorofilas, carotenos), tocoferoles (vitamina E) y polifenoles. Varios de estos componentes minoritarios tienen un gran valor biológico, otros representan el factor principal del aroma (flavor) y algunos son eficaces antioxidantes que protegen el aceite contra el enranciamiento (Tabla 3.1-6).

3.1.7. Distribución y contenido de sustancias antioxidantes en el aceite de oliva virgen extra.

El AOVE contiene sustancias con propiedades antioxidantes como los polifenoles, tocoferoles, carotenoides, escualeno y clorofilas. Las clorofilas se encuentran en concentraciones en torno a los 20 mg/kg, el β -caroteno aproximadamente en 8,4 mg/kg. También están presentes el α -, β -, γ -tocoferol, este último es por mucho el isómero predominante (> 96 %), en una concentración que ronda los 130 mg/kg, y es el más activo biológicamente (Gambacorta et al., 2010; Jacomelilla et al., 2010; Krichene et al., 2010).

Los polifenoles son una de las clases más significativas de antioxidantes en el AOVE, se encuentran en concentraciones muy variables que oscilan en un rango de 50 a 1500 mg/kg (Cerretani et al., 2009; Allalout et al., 2008; Samaniego et al., 2007, 2010).

A pesar de la baja proporción que representan en la composición total del AOVE, la presencia de polifenoles en el aceite de oliva contribuye a las características sensoriales como son, el amargor (oleuropeína y sus derivados), la astringencia, la pungencia (1-(+)-acetoxypinoresinol) y a la actividad biológica (Gutiérrez-Rosales et al., 2003), también es responsable de la resistencia del AOVE frente a la autoxidación y a la polimerización.

En el AOVE originario de diversas regiones mediterráneas se ha detectado la presencia de sustancias fenólicas que son clasificadas como derivados del feniletanol (hidroxitirosol y tirosol), ácidos fenólicos, principalmente derivados del ácido hidroxicinámico y de los ácidos *p*-hidroxibenzóico y *p*-hidroxifenilacético; vanillina, y los ácidos vanilínico, ferúlico, clorogénico, *p*-

Introducción

cumárico, y caféico, secoiridoides (decarboximetil-oleuropeina aglicona, oleuropeina aglicona, lingstrósido aglicona, oleocantal o decarboximetil-lingstrósido aglicona; lignanos ((+)-pinoresinol, 1-(+)-acetoxipinoresinol), y ácido elenólico. algunos de ellos se pueden encontrar a nivel de trazas (Allalout, A., et al., 2008; Carrasco-Pancorbo et al., 2009; Cerretani et al., 2009; Jacomellia et al., 2010; Gill et al., 2010).

Los fenoles mayoritarios son el tirosol y el hidroxitirosol en porcentajes del 71 % y 18 % de los fenoles totales, respectivamente. De entre los diversos fenoles presentes en este aceite, *o*-difenoles como el hidroxitirosol y el ácido caféico despliegan una fuerte actividad antioxidante (Krichene et al., 2010).

La concentración de antioxidantes está fuertemente influenciada por interacciones genotipo-ambiente de factores como el cultivar, clima, localización, también por factores culturales como la aplicación de fertilizantes, el grado de maduración del fruto al momento de la recolección, las condiciones y tecnología seleccionadas para realizar la extracción (temperaturas, tiempos, sistemas de extracción) o por las mezclas que se suelen realizar para la obtención de aceites de oliva (Dag et al., 2009)

Los aceites refinados carecen totalmente de sustancias polifenólicas y del resto de compuestos presentes en la fracción insaponificable (Vekiari y Koutsaftakis, 2002).

Conforme transcurre la maduración se observa que los aceites extraídos de frutos progresivamente más maduros son más pobres en fenoles totales, *o*-difenoles y flavonoides; esta reducción también se acompaña de la reducción de la capacidad antioxidante y del contenido de α -tocoferol (Bejaoui et al., 2010).

La latitud en la que crecen los olivos tiene un efecto significativo en la composición del aceite. Tiene impacto en la concentración del ácido oléico, clorofilas, β -Caroteno, fenoles, sobre la estabilidad oxidativa, y sobre la actividad antirradicalaria; de manera que los aceites procedentes de olivos cultivados en mayores latitudes presenta magnitudes superiores a los cultivados en latitudes inferiores (Issaoui et al., 2010).

Durante el proceso de obtención del AOVE El contenido de polifenoles disminuye continuamente desde el inicio (trituration) hasta el final del mezclado tanto en la extracción por prensado como por centrifugación. Entre las causas probables de esta reducción se considera la exposición al oxígeno atmosférico y a enzimas como la fenoloxidasa, mientras que las temperaturas mayores que se manejan durante el mezclado favorecen la disolución de los fenoles en el agua.

La reducción durante la separación de fases por centrifugación es provocada por el arrastre de los polifenoles disueltos en el agua de proceso que se agrega para facilitar el mezclado en esta versión moderna del procedimiento de extracción (Vekiari y Koutsaftakis., 2002; Yorulmaz et al., 2011). Durante el almacenamiento decrecen los índices de calidad del AOVE; sin embargo la concentración de tocoferoles y derivados de la oleuropeina reducen la velocidad de esta reducción (Rovellini et al., 2012).

3.2. Generalidades de la patata.

3.2.1. Origen de la patata.

La patata (*Solanum tuberosum* L.) es originaria de la zona andina del Sur de América que comprende los países de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile. Se considera que en Perú los incas cultivaban esta hortaliza desde hace 2000 años. Posteriormente, hacia principios de 1500, con la llegada de los españoles el cultivo se extendió hasta Europa. Durante el periodo comprendido entre 1600 a 1845 la patata se constituyó como la principal fuente alimentaria de Irlanda, siendo los inmigrantes de este país quienes la llevaron a Norteamérica hacia 1700 (SAGARPA, 1998).

3.2.2. Descripción botánica de la patata.

La patata (*Solanum tuberosum*) pertenece a la familia *Solanaceae*. Es una dicotiledónea herbácea, a veces considerada como una planta perenne debido a su capacidad para reproducirse vegetativamente, aunque es de cultivo anual. Los colores varían según el cultivar. En la superficie de los tubérculos están los ojos, de los que surgen los brotes.

Las áreas principales en el tubérculo maduro del exterior hacia el interior son el peridermo, la corteza, la zona perimedular vascular cilíndrica, y la médula central. El peridermo tiene de 6 a 10 capas celulares de espesor y cumple una función protectora; en la corteza se localiza el parénquima vascular con gran contenido de almidón; la médula se localiza en el centro del tubérculo y está integrado por células que contienen menos almidón que las de área vascular (Jadhav y Kadam, 2004).

- **Variedades.**

Los expertos han desarrollado miles de variedades, muchas de las cuales van quedando obsoletas por la aparición de otras con mayor rendimiento y adaptabilidad. Las variedades se pueden diferenciar por el color de la epidermis y la pulpa, la resistencia a enfermedades, la duración del ciclo de cultivo y los requerimientos nutritivos.

Las variedades antiguas de patata tienen los ojos más profundos, tienden a ser ásperas e irregulares en la forma y, tienen poca resistencia a las enfermedades o plagas de insectos. Los cultivares modernos suelen ser de forma redondeada, con la piel amarilla o rosada, la pulpa blanca o amarilla y los ojos poco profundos. En los países de la altiplanicie andina también se conocen variedades tradicionales con estas formas, pero además existen muchas otras de piel púrpura, azul o bicolor, de carne azulada, violeta o amarilla y de formas alargadas, curvas o casi esféricas (Jadhav y Kadam, 2004).

3.2.3. Producción de patata.

- **Producción mundial.**

Hasta inicios del decenio de 1990 casi la totalidad de las patatas se producían y consumían en Europa, América del Norte y en los países de la antigua Unión Soviética. Desde entonces se ha producido un espectacular aumento de la producción de papa en Asia, África y América Latina (Fig. 3.2-1), donde la producción aumentó de menos de 30 millones de toneladas a principios del decenio de 1960 a más de 290 millones en 2011.

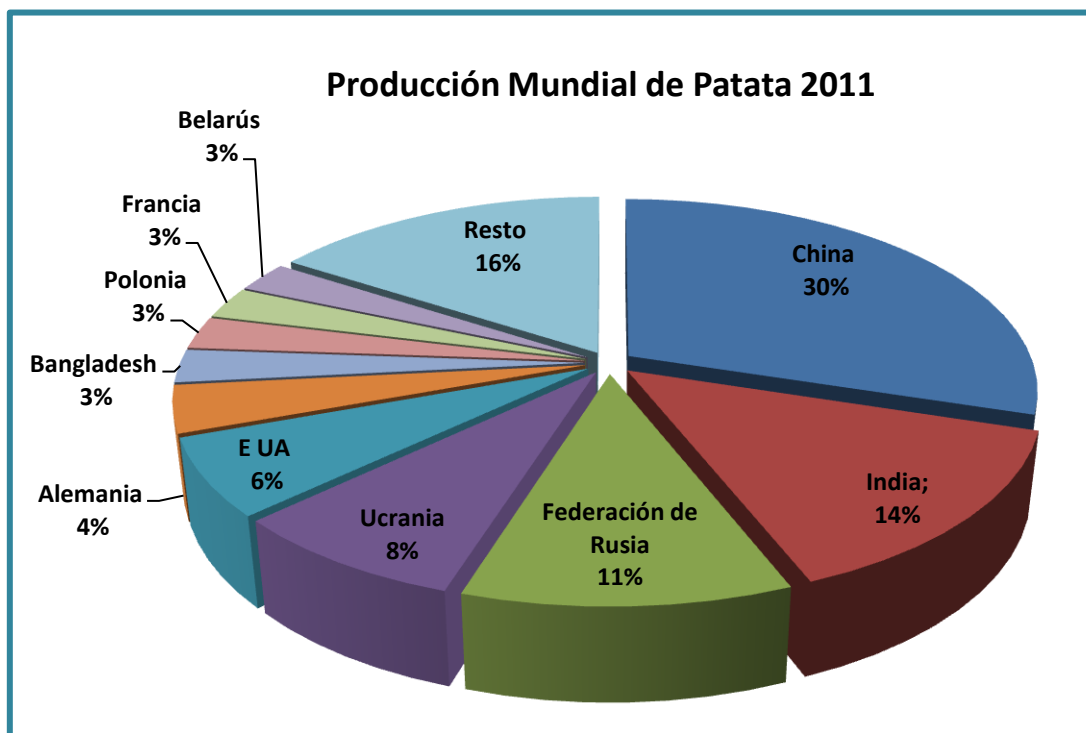


Figura 3.2-1. Principales países productores de patata en 2011 (FAO, 2011).

En 2005, por primera vez, la producción de la patata del mundo en desarrollo excedía la del mundo desarrollado. China se ha convertido en el primer productor mundial y, poco menos de la mitad de todas las patatas se cosechan hoy en China y la India (FAO, 2011).

- **Producción Nacional.**

Los datos de la producción de patatas durante el 2010-2011 presentados en el anuario de estadísticas 2011 por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente; indican que en España se produjeron 2,29 millones de Tonelads de patata; de las que un 82 % se destinaron a la venta en fresco, y el resto al consumo humano (14 %), animal (3 %) y como semilla (0,6 %). La Comunidad Autónoma con mayor producción fue Castilla y León (38 %), seguida de Galicia (22 %), Andalucía (15 %), Castilla la Mancha (4 %), La Rioja (4 %) y finalmente, la producción del conjunto formado por el resto de Comunidades (17 %) (Fig. 3.2-2).

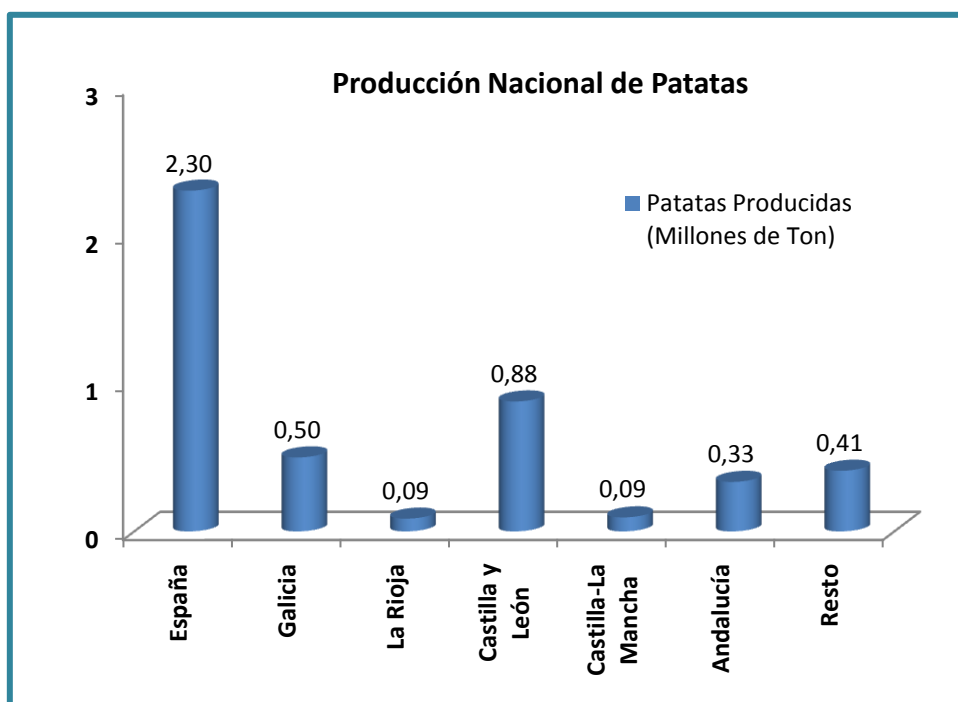


Figura 3.2-2. Producción nacional y primeras comunidades productoras de patatas en España (MAPA, 2011).

3.2.4. Composición química de la patata.

La composición química de la patata depende de la variedad, almacenamiento, etapa de crecimiento y condiciones de cultivo. Los carbohidratos constituyen aproximadamente el 80 % (63-86 %) de los sólidos totales y el almidón es el principal carbohidrato. Su contenido depende de la temperatura de almacenamiento, enfermedades y fertilización. Los principales azúcares incluyen la sacarosa, glucosa y fructosa y se han detectado trazas de cetoheptosa, melibiosa, melecitosa y rafinosa. el contenido de azúcares aumenta con el almacenamiento a bajas temperaturas y la germinación. La concentración de azúcar es mayor en el centro del tubérculo que en la región exterior.

Las patatas frescas contienen entre 1-2 % de fibra dietética. Está constituida por: celulosa, hemicelulosa y sustancias pécticas. las pectinas varían entre un 0,7-1,7 %. la piel contiene 10 veces más. la hemicelulosa se encuentra en una proporción del 1 %. El almidón resistente se encuentra en poca cantidad en la patata cruda pero constituye un 20-25 % del peso de la fibra total en la patata cocinada. La digestibilidad del almidón en patatas crudas es baja pero aumenta considerablemente durante la cocción o procesado (Navarre et al., 2009).

El contenido de nitrógeno de la patata es del 1-2 % del peso seco y depende de tipo de cultivo y de las condiciones medioambientales. La fracción proteica constituye hasta dos tercios del nitrógeno total y se encuentra como aminoácidos libres. La asparragina y glutamina constituyen casi la mitad de los aminoácidos totales.

La cantidad de lípidos es pequeña, de un 0,1 % del peso fresco. Sin embargo, son una buena fuente de vitaminas como ácido ascórbico, tiamina, niacina y piridoxina. El contenido en vitamina C en las patatas frescas puede alcanzar los 30 mg/100g. Este valor disminuye en el almacenamiento y durante el procesado. Es también buena fuente de magnesio y hierro y la disponibilidad de este último es superior al de otras hortalizas. posee poca cantidad de fósforo, calcio y sodio pero no de potasio. También posee cobre, cromo, molibdeno y selenio y se considera una fuente excelente de flúor (Jadhav y Kadam, 2003; Scurrah et al., 2007).

Las patatas se consideran una fuente de proteínas de alta calidad, carbohidratos, vitamina C, B₆, B₃ y ciertos minerales como potasio, fósforo y magnesio (Subar et al., 1998). Además de estos nutrientes las patatas poseen una cantidad significativa de fitoquímicos antioxidantes (Al-Saikhan et al., 1995; Lewis et al., 1998; Morris et al., 2004; Andre et al., 2007; Tosun and Yucesan., 2008).

Los tubérculos contienen altas cantidades de inhibidores de las proteasas. Los tratamientos térmicos (escaldado, cocción y horneado) destruyen la mayor parte de la capacidad inhibitoria de estas sustancias (Burlingame et al., 2009). Las lectinas de las patatas aglutinan eritrocitos, pero existen pocos estudios sobre su repercusión en el valor nutritivo (Friedman 2006).

La patata posee sustancias tóxicas o antinutritivas entre las cuales destacan los glicoalcaloides esteroides, α -solanina y α -chalcona se localizan principalmente en la piel y en los brotes y en mucha menor proporción en la pulpa (Liang et al., 2008). Estos compuestos se producen por lesión mecánica y por condiciones medioambientales y no se destruyen en la cocción, horneado o fritura.

3.2.5. Distribución y contenido de sustancias antioxidantes en la patata.

De forma característica, las hortalizas tienen alta calidad biológica atribuida al contenido de compuestos antioxidantes como la vitamina C, ácido fólico, fenoles y β -carotenos y a su riqueza en constituyentes minerales básicos. Estas características y los efectos promotores de la salud asociados, motivan recomendar un incremento del consumo hortalizas (Frossard et al., 2000; Kalt, 2005; Kawashima and Soares, 2003; WHO/FAO report 2003).

En la patata los fenoles se encuentran en concentraciones que varían entre 85 a 156 mg EAG/100g m.h. que se identifican principalmente en la cáscara y en los tejidos adyacentes (alrededor del 50 % de los compuestos fenólicos); sitio que además muestra una actividad antioxidante superior a la del resto del tubérculo (Tomás-Barberán et al., 2000; Kähkönen et al., 1999). La actividad antioxidante total es mayor en las variedades de pulpa roja, menor en las de blanca y amarilla, y las de pulpa color naranja muestran una actividad intermedia.

La CA hidrofílica predomina sobre la lipofílica, pero en variedades rojas la segunda representa una fracción importante de la capacidad antioxidante total. Es por esto que en la patata el contenido de fenoles totales (principales responsables de la actividad antioxidante hidrofílica) está altamente correlacionado con los valores de capacidad antioxidante total cuantificados por los métodos DPPH y ORAC; por lo tanto, este parámetro puede funcionar como un indicador fiable de la actividad antioxidante en distintas variedades de patata (Teow et al., 2007).

En variedades de patatas de cáscara roja se acumulan glicósidos de pelargonidina y peonidina. En ambas antocianidinas un residuo de rutinosil está enlazado en la posición 3 y un residuo glucosil en la 5. Ambos pigmentos están acilados con los ácidos p-cumárico y ferúlico.

En relación con los derivados de ácidos fenólicos, los tubérculos contienen principalmente derivados del ácido caféico, aunque también están presentes los ácidos ferúlico, p-cumárico, sinápico y vanílicico. Los derivados del ácido caféico están concentrados en la parte externa del tubérculo, en una delgada capa de tan solo 1 a 2 mm de grosor. Dependiendo del cultivar el contenido de ácido caféico varía de 163 a 280 mg/kg b.f.; el ácido ferúlico (de 13 a 28 mg/kg), p-cumárico (de 0.5 a 4 mg/kg), sinápico (de 0.5 a 8 mg/kg) y el ácido vanílicico (de 5 a 16 mg/kg) están presentes en cantidades mucho menores (Navarre et al., 2011; Rajarathnam et al, 2011).

El ácido clorogénico es el componente predominante en la patata (22-71 mg/kg). el ácido criptoclorogénico (11 mg/kg), ácido neoclorogénico (6 mg/kg) y el ácido isoclorogénico (ácido 4,5-dicafeoilquínico) (3 mg/kg) también están presentes en cantidades inferiores. También se ha comprobado que la distribución de los derivados del ácido caféico en el tubérculo no es uniforme, se distribuye en concentraciones decrecientes desde la sección externa hacia la interna (Matilda and Hellstrom, 2007; Navarre et al., 2011).

Los antioxidantes lipofílicos de las patatas están representados por los carotenos, compuestos que son deseables desde el punto de vista nutricional. Los más abundantes en este tubérculo son la luteína y la zeaxantina, por ello la patata puede ser particularmente importante en el mantenimiento de la salud ocular y en la reducción del riesgo de degeneración macular asociada al envejecimiento (Chucair et al., 2007; Tan et al., 2008).

Los carotenoides complementarios varían entre cultivares, pero la violaxantina y la luteína suelen ser los más frecuentes. Las coloraciones de la pulpa amarillas-naranja de algunas patatas son atribuidas a la presencia de carotenoides. Las coloraciones naranja se atribuyen a la zeaxantina (Brown et al., 2005), mientras que la concentración de Luteína se correlaciona bien con la intensidad de la coloración amarilla. Las patatas de variedades blancas usualmente contienen menos carotenoides que los cultivares amarillos o naranja. Un estudio encontró que las variedades blancas tienen entre 27-74 g/100g m.h. de carotenoides (Iwanzik et al., 1983). Un estudio de 74 variedades andinas autóctonas se encontraron concentraciones de carotenoides totales que variaban entre 3 a 36 µg/g m.h. (Andre et al., 2007).

3.3. Generalidades de la berenjena.

3.3.1. Origen de la berenjena.

La berenjena es originaria de las zonas tropicales y subtropicales asiáticas. Se cultivó desde la antigüedad en la India, Birmania y China, y hacia el año 1200 ya se cultivaba en Egipto. En la Edad Media fue introducida por los árabes a través de la Península Ibérica y de Turquía, para posteriormente extenderse por el Mediterráneo y resto de Europa. Fue en el siglo XVII cuando

se introdujo en la alimentación, tras ser utilizada en medicina para combatir inflamaciones cutáneas y quemaduras (FAO, 2006). Son populares entre la población de países asiáticos y algunos europeos como Italia y España, en Estados Unidos de Norteamérica están ganando popularidad rápidamente entre la gente que gusta de la comida italiana; puede consumirse hervida, frita o en salsas. (Nisha et al., 2009).

3.3.2. Descripción botánica de la berenjena.

Las berenjenas (*Solanum melongena* L.) pertenecen a la familia de las hortalizas dulcamaras (Solanaceae) que incluye los tomates, los pimientos y las patatas. Es una planta anual y herbácea, aunque sus tallos presentan tejidos lignificados que le dan un aspecto arbustivo. Puede rebrotar en un segundo año si se cuida y poda de forma adecuada, sin embargo la producción se reduce y la calidad de los frutos es menor. La parte que se aprovecha para el consumo humano es una baya alargada o globosa, de color negro, morado, blanco, blanco jaspeado de morado o verde. Presenta pequeñas semillas de color amarillo (FAO, 2006).

- **Variedades**

Las variedades de berenjena que se comercializan se han incrementado rápidamente en los últimos años. La calidad típica de la berenjena tipo Americana se basa en su uniformidad de forma (ovalada a globosa), firmeza y color de la piel púrpura oscuro. Otros índices de calidad son tamaño, ausencia de defectos de formación, manejo, pudrición y un cáliz verde de apariencia fresca. Los grados de calidad son No. 1, No. 2 y No. 3. La distinción entre grados se basa solamente en tamaño, apariencia externa y firmeza (FAO, 2006).

Otras variedades de berenjena son:

- Japonesa (Japanese): elongada, delgada, color púrpura claro a oscuro, muy percedera.
- Blanca (White): pequeña, de forma ovalada a globular, de piel delgada.
- Mini-Japonesa (Mini-Japanese): pequeña, elongada, con vetas de diferentes tonalidades de púrpura y violeta.
- China (Chinese): elongada, delgada, de color púrpura claro.

3.3.3. Producción de Berenjena.

- **Producción mundial**

Desde hace más de 30 años los grandes productores de berenjena en el mundo están localizados en el continente asiático. En el 2011 la producción de China y la India representó el 87 % de producción mundial, contribuyendo el primero con casi dos tercios del volumen total cosechado (Fig. 3.3-1).

Desde 1980 China ha mantenido un crecimiento acelerado en los volúmenes de producción desde cifras que sobrepasaban los 3 millones de toneladas anuales, hasta la actualidad con más de 27 millones de toneladas y, aunque la producción de la India le seguía de cerca, desde el año 2000, su crecimiento no ha podido igualar al de China por lo que tiene una participación un poco por debajo de la tercera parte de la cosecha mundial (FAO, 2011).

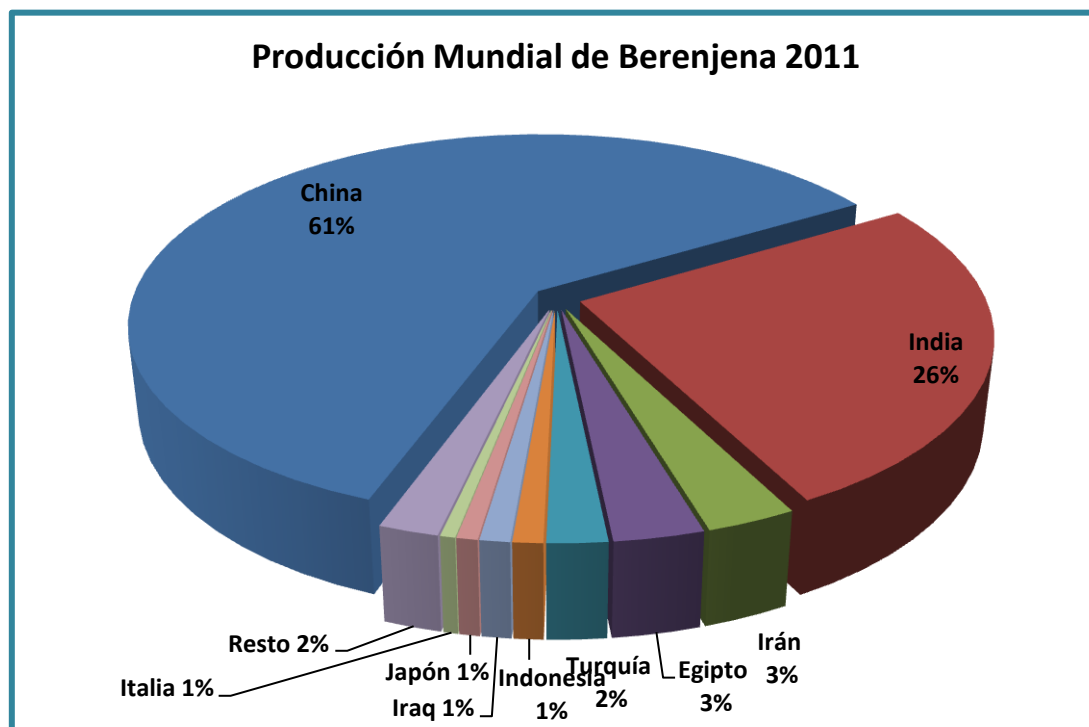


Figura 3.3-1. Principales países productores de berenjena en 2011 (FAO, 2011).

- **Producción Nacional.**

Los datos de la producción de Berenjenas durante el 2010-2011 (MAPA, 2011a); muestran que en España se produjeron 190.000 toneladas; de las que un 95 % se destinaron a la venta en fresco, y el resto al consumo humano directo (1 %), al consumo animal (0,5 %) y el 3,4 % se destinó a la venta para su transformación. La Comunidad Autónoma con mayor producción fue Andalucía con un 85 %, seguida por Cataluña (3,5 %), Valencia (3,5 %), Navarra (1,7 %) y Murcia (1,3 %); el resto de las comunidades contribuyeron con el 4,3 % restante (Fig. 3.3-2).

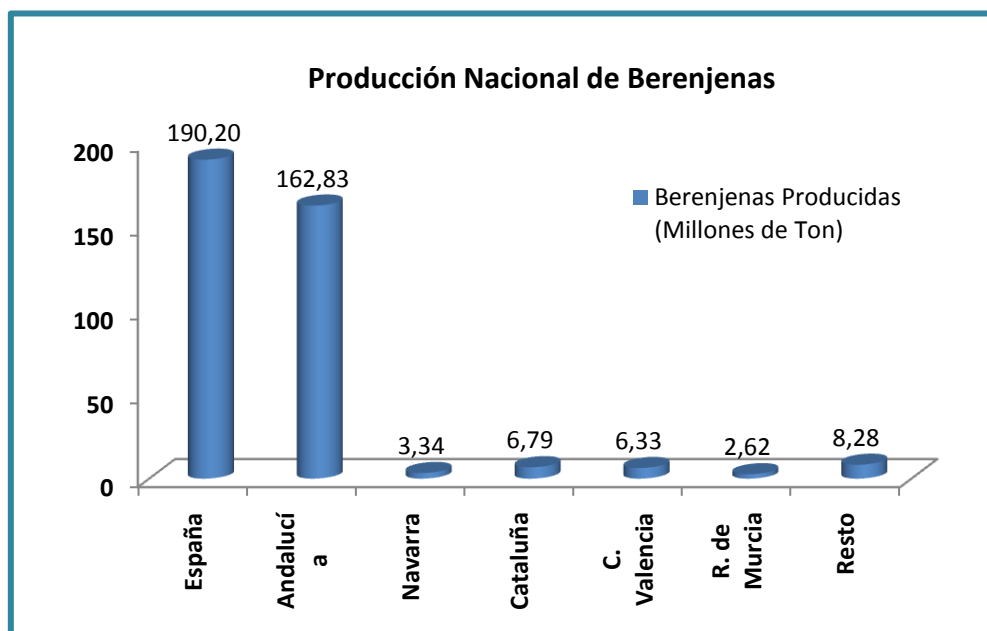


Figura 3.3-2. Producción nacional y primeras comunidades productoras de berenjena (MAPA, 2011a).

3.3.4. Composición química de la berenjena.

Es una fuente rica de vitaminas y fibra dietética y de potentes fitonutrientes (Das et al., 2011). La acumulación de sólidos solubles totales alcanza el máximo seis semanas después del establecimiento del fruto (Menella, 2010). La composición química de la berenjena cruda se muestra a continuación en la Tabla 3.3-1.

Tabla 3.3-1. Composición química en 100 g de berenjena cruda.

Nutriente	Contenido
Carbohidratos (%)	5,2 ± 0,8
Proteínas (%)	1,9 ± 0,4
Grasa (%)	0,4 ± 0,05
Fibra (%)	1,5 ± 0,02
Ácido oxálico (mg)	20 ± 4
Calcio (mg)	15 ± 2
Magnesio (mg)	14 ± 4
Fósforo (mg)	42 ± 2
Sodio (mg)	4 ± 0,02
Hierro (mg)	1 ± 0,05
Cobre (mg)	0,22 ± 0,01
Potasio (mg)	2,4 ± 0,04
Azufre (mg)	39 ± 3,2
Cloro (mg)	48 ± 2
Vitamina (A/U.I.)	100 ± 3
Tiamina (mg)	0,05 ± 0,01
Rivoflavina (mg)	0,15 ± 0,004
β-Caroteno (μg)	0,82 ± 0,1
Vitamina C (mg)	15 ± 1,2
Energía (Cal)	20 ± 2,2

La berenjena puede contener altas concentraciones de sustancias tóxicas para los seres humanos como los glicoalcaloides esteroideos (Menella et al, 2010). Se ha recomendado un valor de seguridad establecido para la patata en 200 mg/100g m.s. de glicoalcaloides que también se aplica para la berenjena (Jones and Fenwick, 2006), sin embargo la presencia de agliconas diferentes a las de la patata (Solamargina y Solasonina) hace necesario ajustar este límite (Hall et al., 2006; Shiu et al., 2007). El contenido total de glicoalcaloides se incrementa conforme avanza la maduración; se mantiene por debajo de los límites en frutos inmaduros y con maduración comercial (0,92 a 25,05 y 2,75 a 88,96 mg/100g m.s.), sin embargo, hay un incremento progresivo en el estadio de madurez fisiológica (2,75 a 468,76 mg/100g m.s.) llegando a alcanzar y hasta superar los límites.

3.3.5. Distribución y contenido de sustancias antioxidantes en la berenjena.

Los frutos de la berenjena (*Solanum melongena*) contienen potentes fitonutrientes antioxidantes como el ácido ascórbico en concentraciones que fluctúan entre los 56 – 129 g/100g m.s. (Hanson et al., 2006) y compuestos fenólicos como los ácidos caféico, clorogénico y flavonoides. Pero es una fuente pobre de provitamina A y vitamina E, con valores medios de 27-100 U.I. y 0,30 mg/100g respectivamente (Vinson et al., 2001; Nisha et al., 2009; Das et al., 2011; Hanson et al., 2006). De entre todas las hortalizas es catalogada como una de las 10 especies con mayor capacidad captadora de radicales superóxido atribuida principalmente al contenido de compuestos fenólicos (Nisha et al; 2009).

El contenido de fenoles totales cambia según la variedad en estudio, el estadio de crecimiento y las condiciones de crecimiento. Se han descrito contenidos de fenoles totales que oscilan entre los 49 a 107 mg/100g, siendo mayor en las variedades de piel oscura y tamaño pequeño y reduciéndose en aquellas de color verde claro (Nisha et al, 2009; Wetwitayaklung and Phaechamud, 2011). También es mayor en las hortalizas cultivadas con prácticas orgánicas respecto a las convencionales.

La fracción analizada también es un factor que condiciona el contenido de antioxidantes de las hortalizas. En términos generales es en la piel y en las hojas en donde se acumula mayor cantidad de sustancias antioxidantes respecto a la pulpa o los tallos (Ji et al.; 2011).

En la piel de la berenjena el contenido medio de ácido ascórbico es de 51,88 mg/100g m.h., 90,65 mg/100g m.h el de fenoles, y 11,64 mg/100g m.h. el de flavonoles. Entre las sustancias antioxidantes de la pulpa predominan compuestos polares y no figuran los flavonoles pero, los valores de ácido ascórbico y fenoles, alcanzan 12,93; 21,13 mg/100g m.h. respectivamente (Ji et al.; 2011).

Del total de fenoles en la pulpa, son tres conjugados del ácido hidroxicinámico los que representan la mayor proporción, son los ésteres del ácido monocateoilquínico: la n-cafeoilputrescina, el ácido 3-acetil-5 cafeoilquínico y el ácido clorogénico o ácido 5-cafeoilquinico, este último es el principal ácido fenólico ya que constituye aproximadamente el 90 a 95 % de los fenoles totales. La fracción restante se conforma por derivados de los tres

predominantes, por otros isómeros del ácido cafeoilquínico y por trazas de tres flavonolglucósidos adicionales: la quercetin-3-glucósido, la quercetin-3-ramnósido y la miricetin-3-galactósido (Singh et al; 2009).

Recientemente se ha encontrado variedades como el *S. incanum* y el *S. melongena* en las que un par de derivados del ácido cafeoilquínico en el que se alcanza una concentración más alta, entre el 15 al 25 %, del total de conjugados del ácido hidroxicinámico; el Ácido 3-Malonil-5-cafeoilquínico y el ácido 4-cafeoil-5-malonilquínico con actividad captadora de radicales libres 4 veces menor que la del flavonol dihidrato de quercetina; pero con una actividad quelante del Hierro entre 3 a 6 veces superior que la de ese compuesto (Ma et al, 2011).

Los extractos de la pulpa tienen actividad antioxidante dosis-dependiente respecto a la prevención de la oxidación de los lípidos LDL; y la inhibición de la oxidación mediada por el ion cúprico de estas lipoproteínas se correlaciona con el contenido de ácido clorogénico (Singh et al; 2009). A su vez se ha demostrado que la eficacia o potencia de los ácidos cafeoilquínicos es muy dependiente de su estructura, es decir, de la posición de los hidroxilos del ácido quínico que están esterificados con el ácido caféico o enlazados con otras fracciones (Ma et al, 2011).

Las antocianinas constituyen un importante grupo de pigmentos polifenólicos naturales con potentes propiedades antioxidantes, están implicadas en la inhibición de la generación de radicales hidroxilo y en la actividad como captador de radicales superóxido. En la pulpa de las berenjenas están ausentes, pero en la piel de las variedades verdes y negras se cuantifican en concentraciones que varían de los 0,048 a los 0,756 mg/100 m.s. respectivamente.

La delfinidina ha sido identificada como la antocianina mayoritaria en la berenjena, pudiendo ser clasificada en dos subgrupos de acuerdo a la antocianina detectada en la piel del fruto: las de tipología que presentan delfinidin-3-rutinosido y las que contienen nasunina (Azuma et al., 2008; Menella et al., 2012). En el análisis de extractos de la piel de berenjena aparecen dos picos cromatográficos que han sido identificados como derivados de delfinidina, el más grande de ellos es la delfinidina 3-rutinósido que representa un 88 % del área total y el segundo es el diglicósido monoacilado con un 3,5 % (Li et al., 2012), la glicosilación en la posición C5 transforma a este último en un pigmento estable con potencial en la industria alimentaria (Hernández-Herrero y Frutos, 2011).

Introducción

En berenjenas de la variedad italiana *esculentum* se aislaron tres antocianinas, de las que solo se identificó la delfinidin-3-rutinósido por ser la más importante (Todaro et al., 2009), sin embargo, en cuatro variedades de berenjena de la india encontró la nasunina (delfinidin-3-cumaroilrutinosido-5-glucosido) como antocianina mayoritaria en porcentajes que variaron entre el 69,1 a 87,7 % (Nisha et al., 2009). También se han hecho un seguimientos del contenido de nasunina en otros estudios para determinar si algunos tratamientos domésticos se asocian a cambios importantes en su composición.

Existe una correlación lineal entre el contenido de fenoles totales de los extractos de berenjena y la actividad antioxidante (DPPH, poder reductor del hierro) (Nisha et al., 2009). En extractos acuosos, el valor FRAP se correlaciona significativamente con los contenidos de ácido ascórbico, fenoles o flavonoides, pero son los fenoles los responsables de la mayor capacidad antioxidante *in vitro*. En el estudio de 33 variedades de berenjenas americanas se obtuvo una correlación lineal significativa ($r = 0,10$) entre el contenido de ácido ascórbico y la actividad captadora de radicales superóxido en extractos metanólicos, y en el caso de los extractos acuosos fue significativa pero baja ($r = 0,34$) (Hanson et al., 2006). Se ha establecido que respecto a la mayoría de hortalizas, los extractos de las pieles de la berenjena morada exhiben gran capacidad de captar tanto los aniones superóxido como el radical hidroxilo (Kaneyuki et al., 1999).

3.4. Generalidades del tomate.

3.4.1. Origen del tomate.

El tomate (*Lycopersicon esculentu*) es originario de América del Sur, de la región andina (Perú, Ecuador, Bolivia y Chile) y el proceso de domesticación fue llevado a cabo en México. El nombre procede del náhuatl “xictli”, ombligo y “tomatl”, tomate (SAGARPA, 2010). Fue introducido en Europa a mediados del siglo XVI y a principios del siglo XIX se comenzó a cultivar comercialmente. Ahora es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El tomate en fresco se consume principalmente en ensaladas, cocido o frito. En mucha menor escala se utiliza como encurtido (SAG, 2005).

3.4.2. Descripción botánica del tomate.

Pertenece a la familia de las Solanáceas. Cuenta con un tallo principal largo con ramificaciones, hojas alternas de 15 a 45 cm de longitud, de color verde y ásperas al tacto. El fruto es una baya de pulpa tierna predominantemente alcalina debido a su contenido mineral. Es de color rojo, rosado, amarillo o verde (rojo más común) y de forma redonda, achatada o alargada. Presenta varios tamaños dependiendo de la variedad (FAO, 2006).

- **Variedades**

Existen diversas clasificaciones para agrupar esta hortaliza, de acuerdo a su forma se distinguen cuatro variedades principales (SAGARPA, 2010):

- Cherry (cereza). Es pequeño y de piel delgada. Se agrupan en ramilletes de 15 a más de 50 frutos. Tiene sabor dulce. Existen de color rojo y amarillo.
- Saladette (Roma). Variedad italiana para conserva de tomate pelado, fruto pequeño bi o trilocular, forma de pera, tamaño homogéneo de los frutos.
- Pera. Utilizado en la industria conservera para elaborar tomate pelado.
- Beef. Llamado tomate bola o para ensalada, es de gran tamaño y baja consistencia.

3.4.3. Producción de tomate.

- **Producción mundial.**

La producción de la hortaliza se ilustra por medio de la Fig. 3.4-1. España ocupa el noveno lugar entre los productores más importantes de tomate a nivel mundial, y es China (como ocurre con otros cultivos importantes) el país que está al frente de la producción a escala mundial con más de un tercio del total cosechado, en segundo lugar está la India y en tercero Estados Unidos de Norteamérica (FAO, 2011).

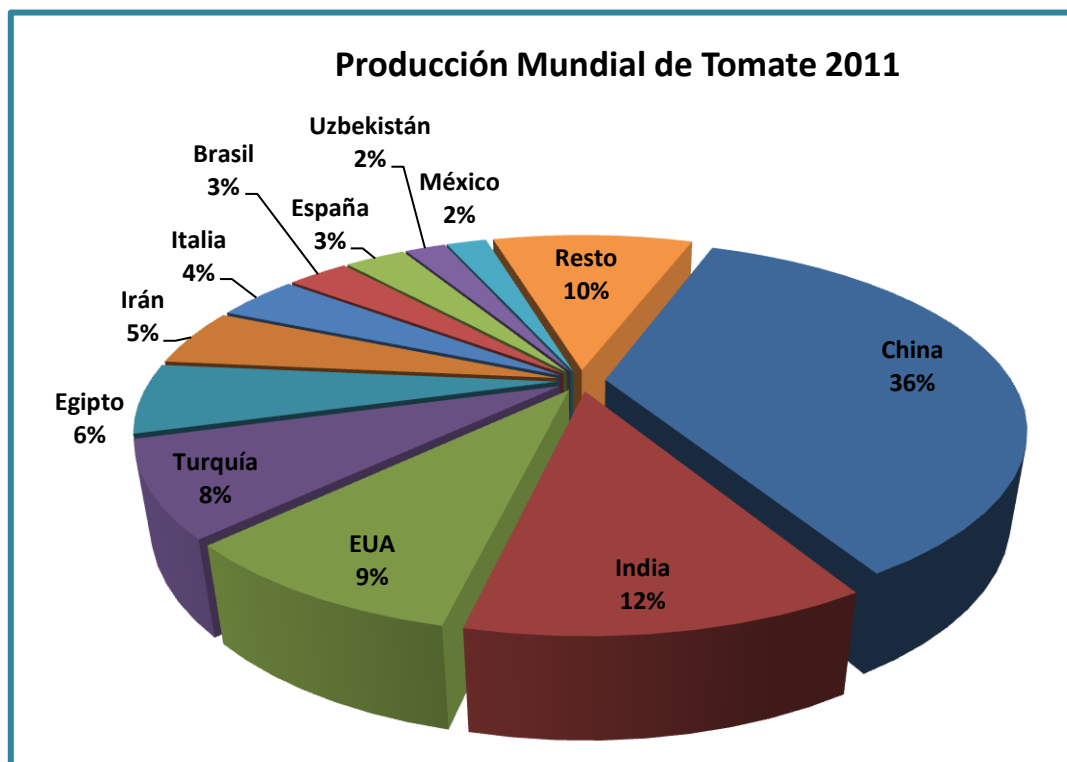


Figura 3.4-1. Principales países productores de tomate en 2011 (FAO, 2011).

- **Producción nacional.**

En España, la producción total es de 4 millones de toneladas, destinadas en buena parte a la exportación. Los tomates se cultivan. Del total cultivado, el 2 % se dedica para el propio consumo en fresco, se destina a la venta el 42 % y un 53 % es transformado en concentrados, zumos, salsas como el ketchup, pulpa, tomate triturado, tomate pelado, confitura.

Los tomates frescos están presentes en el comercio prácticamente durante casi todo el año. (ETSIA, 2008). A pesar de que España es un líder mundial en la producción de tomate, tal producción recae principalmente (Fig. 3.4-2) en las comunidades de Extremadura (38 %) y Andalucía (35 %) haciendo desigual el reparto de la producción dentro del territorio español (Macua, et al. 2011)

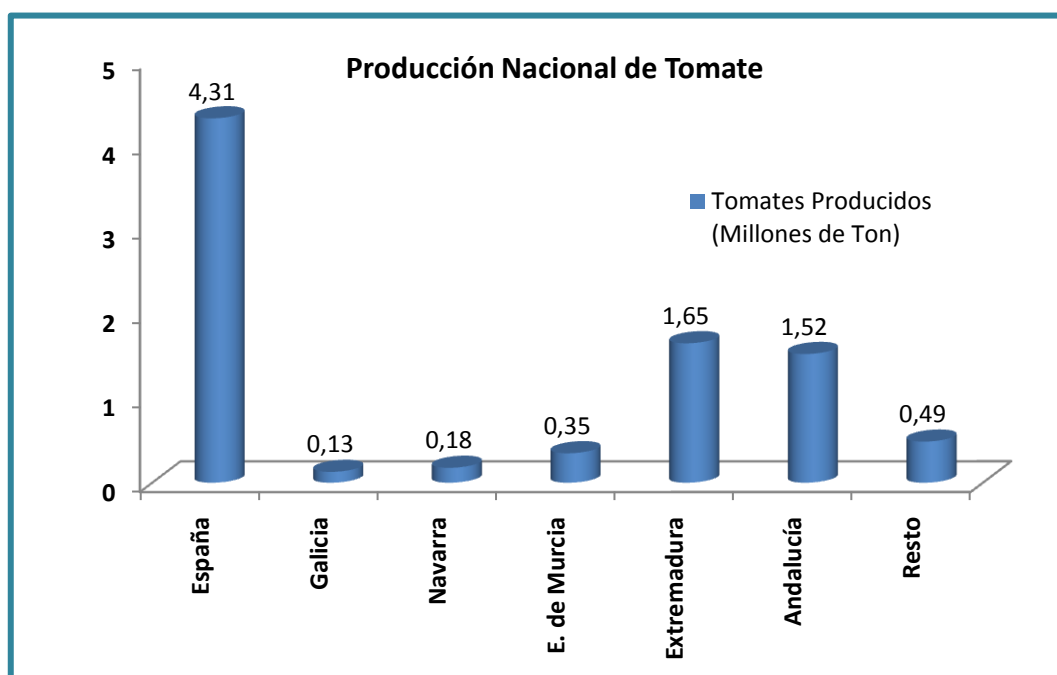


Figura 3.4-2. Producción nacional y primeras comunidades productoras de tomate en España (MAGRAMA, 2011).

3.4.4. Composición química del tomate.

Los tomates se caracterizan por un perfil nutricional (Tabla 3.4-1) que también incluye diferentes compuestos bioactivos. En la cutícula del tomate hay un contenido de fibra dietética total de 84,16 %, la mayor fracción está constituida por fibra insoluble (71,82 %) compuesta principalmente por hemicelulosa. La fibra de la piel retiene 6,76 g de agua/g (capacidad captadora de agua).

Desde un punto de vista tecnológico puede contribuir a estabilizar los sistemas alimentarios, mejorando la densidad del producto y minimizando el colapso, tiene potencial como agente texturizante que contribuye a la sensación bucal y reduce el contenido de lípidos. Desde el punto de vista nutricional la fibra del tomate incrementa la ingesta diaria de compuestos indigestibles con un efecto benéfico en la función intestinal (Navarro-González et al., 2011).

Tabla 3.4-1. Composición química en 100 g de tomate crudo.

Nutriente	Contenido
Agua (%)	94
Hidratos de Carbono (%)	3
Proteínas (%)	1
Lípidos (%)	0,3
Potasio (mg)	258
Sodio (mg)	3
Calcio (mg)	10
Hierro (mg)	0,6
Fósforo (mg)	24
Vitamina C (mg)	26
Vitamina A (mg retinol)	207
Tiamina (mg)	0.06
Riboflavina (mg)	0.04
Niacina (µg)	28

Fuente: Ramos-Belmán K. et al. 2010.

3.4.5. Distribución y contenido de sustancias antioxidantes en el tomate.

Las frutas y verduras han sido consideradas como alimentos de alto valor nutricional en gran parte por su contenido de vitaminas, tocoferoles y carotenoides, por ello se recomienda su consumo como una fuente natural y potente de antioxidantes (Kim et al., 2007; Word Cancer Research Fund, 2007). La presencia en el tomate de estos antioxidantes, lo posicionan como un aporte significativo a las necesidades diarias de compuestos fenólicos, carotenoides y vitamina C (Toor et al., 2005). De acuerdo a la USDA (2007), de la CA del tomate, el equivalente a 266 µmo E. Trolox/100 g corresponde a la actividad de los antioxidantes hidrofílicos, 23 µmo Eq. Trolox/100 g a los lipofílicos, y presentan un contenido medio de fenoles totales de 80 mg E. Ac. Gálico/100g.

Los principales antioxidantes del tomate son los carotenoides. El contenido de carotenoides (todos los isómeros cis y trans) incluye luteína, licopeno y β-caroteno en rangos de concentración que varía de 24,07 a 261,86 µg/g m.s. El licopeno es el principal caroteno (80 % del total) y es responsable del color rojo del tomate (Rosales et al., 2011; Tedeschi et al., 2011).

El contenido de fenoles totales está en el rango de 4,2 a 6,0 mg/g m.s., se incluyen flavonoles (kaempferon-3-o-glucósido, rutina y quercetina), flavanonas (naringenina), ácidos hidroxicinámicos (ácido caféico, ácido clorogénico, hexósido-o-caféico y ácido ferúlico,) y ácidos fenólicos (protocatequico, gálico, gentísico, p-cumárico), (Rosales et al., 2011; Vallverdu-Queralt et al., 2011a).

El tomate, sin duda, ha asumido el estatus de un alimento funcional teniendo en cuenta la abrumadora evidencia epidemiológica para la reducción del riesgo de ciertos tipos de cánceres (Binoy et al., 2004). El consumo de tomate y productos de tomate se ha asociado con un menor riesgo de desarrollar cáncer digestivo y de próstata. (Gómez Romero et al., 2007).

La capacidad antioxidante evaluada por DPPH se correlacionó bien con el contenido de carotenos totales. También hay una correlación positiva entre el contenido de fenoles totales y los valores de antioxidantes determinados por el método FRAP y el ORAC (Rosales et al., 2011; Vallverdu-Queralt et al., 2011b). La capacidad antioxidante de la fracción hidrosoluble se correlacionó con los niveles de los principales antioxidantes (fenoles y vitamina C), pero no se atribuye solo a la suma de ambas clases. Es posible que la correlación dependa también de los efectos sinérgicos entre todos ellos y de sus interacciones con otros constituyentes de la fracción (Tedeschi et al., 2011).

Diversos elementos influyen en la composición química del tomate como factores ambientales (temperatura, radiación solar y el déficit hídrico entre otros), y las prácticas de cultivo (la selección del cultivar, el estado de maduración en el momento de la cosecha, el sistema de riego, etc.) e intervienen en una mejora de la calidad nutricional y del contenido de polifenoles, carotenos y vitamina C (Li et al., 2011). Las variaciones en el perfil de compuestos fenólicos y la CA hidrofílica son de gran importancia agronómica entre las variedades de tomate (variabilidad genética); dichos patrones son tan característicos, que en la actualidad se postula su aplicación como marcadores taxonómicos (Tedeschi et al., 2011; Vallverdu-Queralt et al., 2011a).

La concentración de los principales antioxidantes también muestra un patrón diferenciado entre las estructuras internas y externas del fruto (Helmja et al., 2008). En la pulpa del tomate hay una concentración de fenoles 33 % superior que en el pericarpio; pero es máxima en las semillas. El pericarpio representa el 68 % de la masa del tomate, la pulpa (sin semillas) el 28 %, y las semillas

Introducción

el 3 %. Es en la primera estructura en donde se encuentra la mayor cantidad de fenoles (Ozgen et al., 2012). En la cutícula del fruto hay licopeno y el principal fenol es la rutina, seguida de la naringenina, derivados de la rutina y del ácido clorogénico, pero la capacidad captadora de radicales libres es baja debido a que los fenoles presentes se encuentran unidos a la pared celular cuticular (Navarro-González et al., 2011).

A lo largo de la maduración se verifican cambios en el contenido de fenoles y en la capacidad antioxidante de los tomates. En estadios tempranos, cuando el fruto ha completado la maduración pero presenta color verde, los valores toman los niveles más bajos de capacidad antioxidante (FRAP y TEAC) que se incrementan progresivamente durante la maduración postcosecha hasta alcanzar el máximo nivel cuando el fruto presenta un color rojo. La tendencia en la concentración de fenoles es contraria a la de la capacidad antioxidante y es más marcada en el tejido de la pulpa (Ozgen et al., 2012).

Las operaciones de transformación industrial y doméstica como son la elaboración de zumos, ketchup, gazpacho, o el almacenamiento de los productos derivados del tomate (zumos y ketchup) provocan variaciones en el perfil cualitativo y cuantitativo de fenoles.

El procesamiento genera variaciones en el perfil fenólico principalmente en el ácido protocatequico-o-hexósido, apigenina y sus formas glicosidadas, en la quercetina-o-dihexósido, el kaempferol-c-hexósido y el eriodictiol-o-diexósido (Vallverdú et al., 2011c). Durante el almacenamiento hay una disminución del contenido de polifenoles totales y de la capacidad antioxidante después de 6 meses (Ketchup 7 % y zumo 12 %). El descenso más significativo de fenoles individuales se observa en las concentraciones de quercetina, seguida del ácido caféico y el ácido ferúlico, mientras que los polifenoles glicosilados son más estables durante el almacenamiento. Los valores de capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) disminuyen paralelamente al contenido de polifenoles (Vallverdu-Queralt et al., 2011b).

3.5. Generalidades de la calabaza.

3.5.1. Origen y descripción botánica de la calabaza.

La calabaza (*Cucurbita*) es originaria de América del Sur, es miembro de la familia Cucurbitaceae, una de las mayores familias del reino vegetal, que consiste de un gran número de especies vegetales comestibles. Se les clasifica como variedades de las especies *Cucurbita máxima*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata* y *Cucurbita mixta* de acuerdo a la textura y forma de los frutos (Shi et al., 2013). La variedad usada en este estudio fue *C. moschata* (“Butternut”).

Los frutos de la calabaza son aprovechados como hortalizas, tanto en estados de maduración completa como inmaduros. Los frutos inmaduros son conocidos como “calabacines” y los maduros “calabazas”, ambos son consumidos en todo el mundo (Oloyede et al., 2012).

3.5.2. Producción de calabaza.

- **Producción mundial**

En el 2011 se produjeron en el mundo aproximadamente 21 millones de Toneladas de calabaza; China fue el principal productor con casi 7 millones de Toneladas abarcando la tercera parte de la cosecha mundial (Fig. 3.5-1), le siguieron India y la Federación Rusa. España ocupó el décimo tercer lugar con un volumen de 340 mil toneladas.

- **Producción Nacional.**

Los datos de la producción de calabazas durante el 2010-2011 (MAGRAM, 2011); muestran que en España se produjeron 53.000 toneladas; de las que un 78 % se destinaron a la venta en fresco, y el resto al consumo humano directo (2,5 %), al animal (2,17 %) y el 17 % se destinó a la venta para su transformación. La Comunidad Autónoma con mayor producción fue Canarias con un 41 %, seguida por la comunidad Valenciana (28 %), Andalucía (9,6 %), Castilla y León (8,7 %) y Murcia (3,8 %), el resto de las comunidades contribuyeron con el 4,6 % (Fig. 3.5-2).

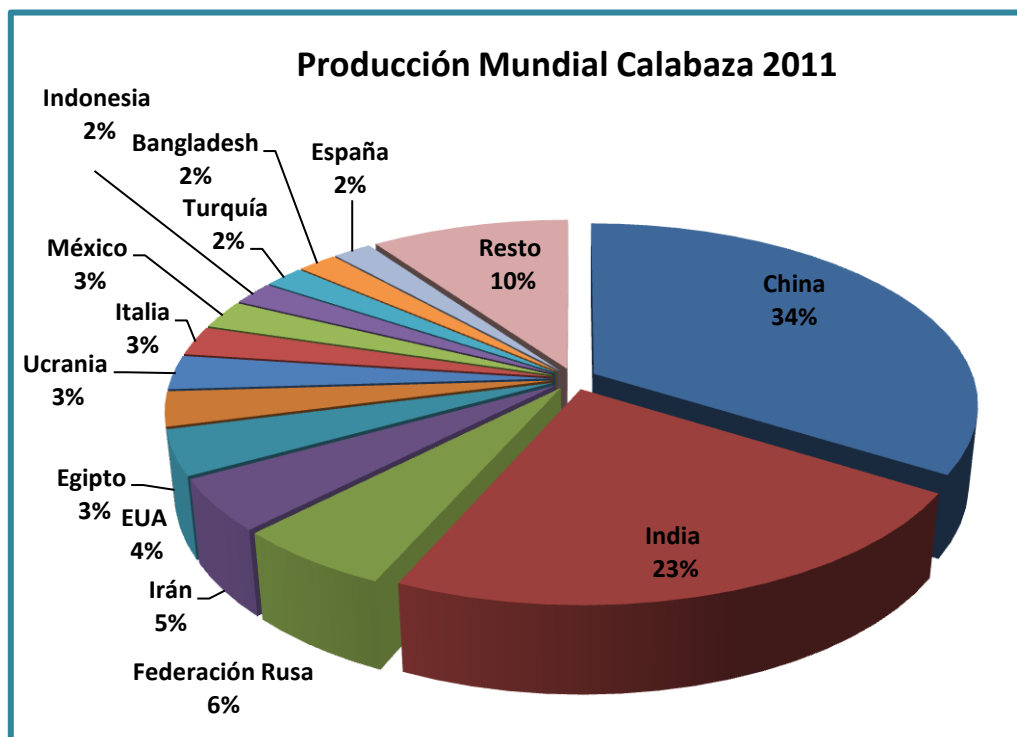


Figura 3.5-1. Principales países productores de calabaza (FAO, 2011).

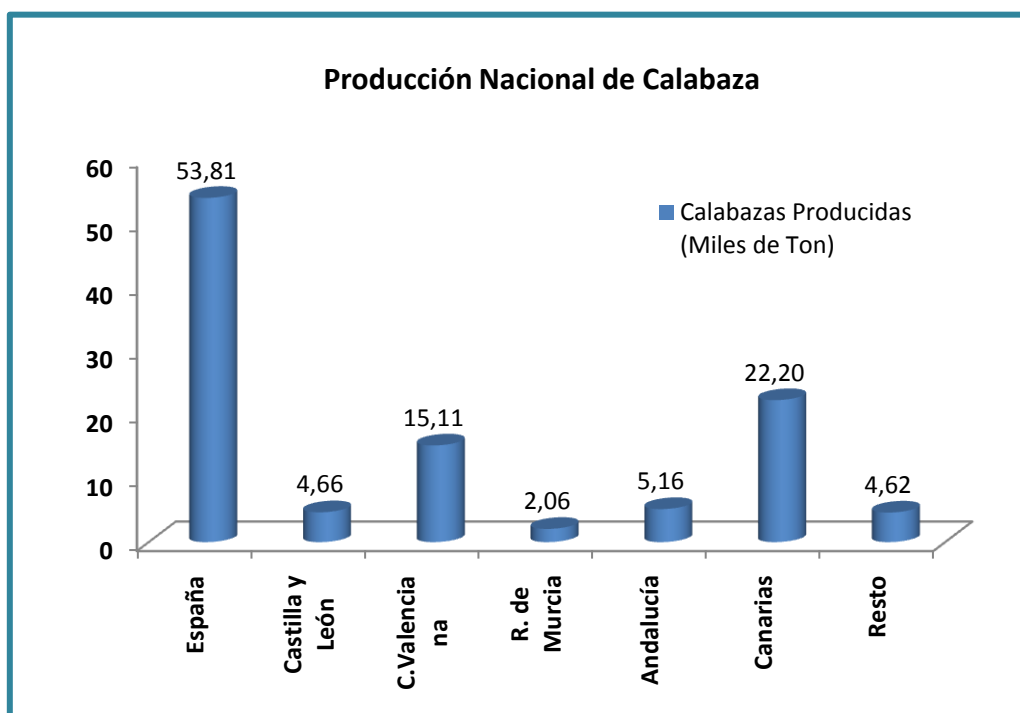


Figura 3.5-2. Producción nacional y primeras comunidades productoras de calabaza en España (MAPA, 2011).

3.5.3. Composición química de la calabaza.

Por su composición química (Tabla 3.5-1), la calabaza, es una hortaliza con un perfil nutritivo más balanceado que la mayoría de hortalizas de cultivo, en donde resalta el elevado contenido de proteínas. Los frutos maduros tienen un contenido de humedad entre 80–96 % y pesan entre 1 a 2,5 kg. El contenido de proteína varía entre 0,6 a 1,8 g/100g m.s., mientras que el de carbohidratos es de 4,6 a 5,6 %. El bajo contenido de colesterol la hace apropiada en la dieta de pacientes obesos e hipertensos (FAO, 2010; Guineá et al., 2011).

Tabla 3.5-1. Composición química en 100 g de calabaza cruda.

Nutriente	Contenido
Humedad (%)	80-96
Proteína (%)	0,6-1,8
Lípidos (%)	0,0-0,2
Extracto crudo (%)	0,5-1,3
Cenizas (%)	0.8-1,4
Carbohidratos (%)	4,6-5,6
Azúcares reductores (g)	2,4
Azúcares no reductores (g)	2,3
Acidez (mg)	20
Carotenoides (mg)	2
Vitamina A (mg)	280
Vitamina C (mg)	12
Vitamina E (mg)	1

Es rica en polisacáridos constituidos por cuatro tipos de monosacáridos, D-glucosa, D-galactosa, L-arabinosa, xilosa y ácido D-glucurónico. Tienen la propiedad de reducir la respuesta metabólica a la glucosa y de mejorar el metabolismo lipídico; estos polisacáridos se pueden añadir a la dieta especial de diabéticos como sustituto del azúcar (Adams et al., 2011; Zheng et al., 2011).

La calabaza está constituida por un 73 % de pulpa y 27 % de cáscara; estas estructuras también han sido estudiadas como una fuente alterna de pectina con propiedades funcionales útiles e importantes efectos biológicos. Puede llegar a contener un 14,4 % de pectina con una estructura que incluye ácido urónico, galacturónico, ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa, manosa, glucosa y galactosa (Kostálová et al., 2012; Kostálová et al., 2013).

Introducción

Las semillas son fuente de ácidos grasos insaturados, antioxidantes y fibra con actividades anti-aterogénicas y hepatoprotectoras, contienen 44,1 % de ácido oléico, 34,7 % de linoléico y 15,9 % de palmítico (Makni et al., 2008); 18:2 n-6, ω -6 a los que se les atribuyen efectos benéficos sobre la salud y como coadyuvantes en la prevención de enfermedades crónicas (Kumar et al., 2006).

El aceite de la semilla es rico en tocoferoles con predominio de α -tocoferol, contiene esteroides siendo el β -sitosterol el mayoritario, en éste se han detectado seis ácidos fenólicos el protocatequico, caféico, siríngico, vanillico, p-cumárico y ferúlico (Reziga et al., 2012).

3.5.4. Distribución y contenido de sustancias antioxidantes en la calabaza.

La calabaza es rica en carotenoides con elevado valor nutricional protector y promotor de la salud (Gonçalves et al., 2007). Las estructuras características de los carotenoides son sistemas de dobles enlaces conjugados que tienen al menos dos grupos hidroxilo, lo que influye sobre sus propiedades químicas, bioquímicas y físicas.

El contenido total de carotenoides de la calabaza presenta la siguiente composición: 43 % de α -trans- β -caroteno, 28 % de luteína y ésteres de luteína, 20 % de α -caroteno y 9 % de al-cis- β -caroteno; también hay pequeños porcentajes de luteína y anteraxantina. el perfil general de carotenoides puede variar ampliamente tanto en su distribución cualitativa como en la cuantitativa, cuando se comparan diferentes cultivos, e incluso, entre frutos del mismo cultivo (Kurz et al., 2008; Shi et al., 2013).

El contenido de polifenoles en extractos etanólicos de calabaza es bajo respecto a hortalizas como pimientos verdes, espinacas o pepinos (Ali et al., 2011; Dhar et al., 2011; Takebayashi et al., 2013). Sin embargo, se ha encontrado una correlación significativa entre la capacidad antioxidante (DPPH) y el contenido de flavonoides y fenoles totales en esta hortaliza.

El contenido de fenoles y flavonoides puede variar por la influencia de factores diversos como la variedad, la estación del año, luz, clima, grado de maduración; también está influido en parte por presiones ejercidas por insectos y microorganismos, por el uso diferencial de pesticidas y fungicidas, entre otras (Javaherashti et al., 2012).

La fertilización altera la composición química proximal y el perfil de antioxidantes. Las tasas máximas de fertilización reducen la composición proximal en un 62 % y el contenido de antioxidantes en un 79 % tanto en los frutos inmaduros como en los maduros. Por ello, se recomienda que para obtener un mayor beneficio para la salud, los frutos de calabaza han de ser cultivados con la aplicación de poco o ningún fertilizante (Jaeger et al., 2012).

A la vez, la maduración es un factor que también condiciona el perfil proximal y de antioxidantes. En los frutos maduros la concentración de fenoles totales es un 71 % superior que la de los frutos jóvenes. Las concentraciones de flavonoides, antocianinas y proantocinidinas son respectivamente 4,5 % 14 % y 17 % superiores en los frutos maduros que en los jóvenes. Pero la magnitud de la capacidad antioxidante (DPPH) se mantiene estable durante la maduración (Oloyede et al., 2012).

4. ELABORACION CULINARIA DE ALIMENTOS.

4.1. Naturaleza del proceso de cocción.

En el ámbito de la tecnología culinaria, se define como cocción a cualquier proceso térmico que se aplique para la elaboración de un plato cocinado. La aplicación de calor se realiza con el fin de modificar las características sensoriales (textura, sabor y aroma) de los alimentos y mejorar su palatabilidad. Las temperaturas empleadas contribuyen a la reducción de la carga microbiana, a la destrucción de enzimas, y según la técnica aplicada, a la disminución de la actividad de agua (Ordóñez et al., 1998).

La cocción representa un tratamiento térmico del alimento donde el calor incrementa la movilidad de las moléculas y le aporta la energía suficiente para que reaccionen entre ellas y se transformen. Puede considerarse como una operación capaz de transformar de modo físico y/o químico el aspecto, la textura, la composición y el valor nutritivo de un alimento mediante la acción del calor, con el fin de satisfacer los sentidos de la vista, del gusto y del olfato (Bello, 1998).

En la cocción existen dos procesos bien diferenciados:

1) **Procesos primarios:**

Son de naturaleza física e intervienen los mecanismos de transferencia de energía y de masa.

Transferencia de energía: Resulta de la llegada del calor a la superficie del alimento y de su propagación hacia el interior.

El aporte de calor a la superficie del alimento está condicionado por los materiales que actúan como medios de transferencia de calor, específicamente por su conductividad térmica, que puede definirse como la resistencia que opone un material a la conducción de calor. Mientras que la transferencia desde la superficie del alimento hasta el interior depende de la conductividad térmica de éste. La conductividad térmica de un alimento varía dependiendo de

Introducción

características intrínsecas como su estructura celular, la proporción de aire atrapado entre las células, el contenido de agua y la composición química, de ahí se desprende que cada alimento requiera de un tratamiento térmico a una temperatura específica durante tiempos controlados para conseguir las características organolépticas óptimas (Fellows. 2007).

Transferencia de masa: Como consecuencia del incremento de temperatura, se originan movimientos moleculares en el interior del alimento y, en muchas ocasiones, intercambio de componentes entre el alimento y el medio que lo rodea. Son de destacar las pérdidas de masa por evaporación superficial de agua. Puede ser de tal intensidad que provoca una corriente migratoria de moléculas desde el interior del alimento hacia la superficie que reemplazan a las perdidas por evaporación. Con ello, la difusión de líquido también arrastra hacia el exterior moléculas de otros componentes que se encuentran en disolución (Tscheuschner, 2001).

Algunos factores determinantes de la velocidad de transferencia de masa por pérdida de agua superficial durante el proceso de cocción son:

- La temperatura de la superficie del alimento
- La temperatura del medio (que puede ser el aire).
- La humedad relativa de ese medio.
- La velocidad a la que se mueve el medio.
- La actividad de agua en el alimento (humedad relativa en equilibrio con el medio).

2) Procesos secundarios:

Son de naturaleza física y química. La cantidad de calor recibido por los alimentos durante el tratamiento térmico modifica los sistemas fisicoquímicos y las estructuras químicas de sus componentes con posibles reacciones entre ellos. Estos fenómenos físicos y químicos producidos durante la cocción afectan la calidad organoléptica, nutritiva y sanitaria. Una vez que el calor incrementa la temperatura del alimento, se originan procesos básicos del cocinado como el reblandecimiento de fibras, la coagulación de las proteínas, la disolución de los compuestos químicos, la liberación de jugos y cambios en los factores de apariencia y sabor. La mayor parte de estos cambios cualitativos se aceleran cuando aumenta la temperatura, de manera que tiempos excesivos y temperaturas demasiado elevadas provocan cambios que pueden ser negativos para la calidad del alimento (Mc Gee, 2004; Myhrvold et al., 2011).

En el alimento se producen dos tipos de cambios (Bello, 1998):

Cambios de naturaleza física, externos y visibles, que atañen a la apariencia, textura y flavor del producto, con una clara repercusión visual, olfativa y gustativa (Tabla 4.1-1).

Cambios de naturaleza química, que afectan a la composición molecular del alimento y se relacionan tanto con su valor nutritivo, como con su seguridad microbiológica. A medida que aumenta el grado de transformación mayores suelen ser las modificaciones del valor nutritivo. El grado de modificación depende del nutriente considerado, del alimento o sistema alimenticio particular y de la mayor o menor intensidad del proceso tecnológico aplicado. Aunque con la aplicación de las técnicas de cocción no se modifica sustancialmente el valor nutritivo de los alimentos (Gil, et al., 2010).

Tabla 4.1-1. Cambios de naturaleza física, externos y visibles en los alimentos.

Tipos de Cambio	Causas
En el volumen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pérdidas de agua de constitución por deshidratación superficial (en alimentos horneados). ▪ Pérdidas de materia grasa por fusión. ▪ Aumento del volumen por rehidratación (pastas, legumbres, arroces y todos los productos deshidratados).
En la coloración	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alteración molecular a consecuencia de ionización dependiente del pH. ▪ Caramelización de los mono- y disacáridos presentes. ▪ Pardeamiento en estructuras proteicas, que han coagulado a consecuencia de una desnaturalización.
En la consistencia	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Coagulación de las proteínas desnaturalizadas, con el consiguiente endurecimiento (proporcional a la duración de la cocción). ▪ Gelatinización del almidón, con espesamiento de la fase líquida por aumento de la viscosidad. ▪ Dextrinización (Endurecimiento del almidón en medio seco). ▪ Reblandecimiento de la celulosa (cocción de legumbres).
En el sabor y aroma	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Captación de sabores. ▪ Liberación de sustancias volátiles. ▪ Desarrollo de sabores como resultado de reacciones químicas. ▪ Volatilización de sustancias aromáticas. ▪ Solubilización de sustancias sápidas.

Un gran número de reacciones químicas se desencadenan y progresan durante las operaciones de cocción, entre ellas se destacan la reacción de Maillard (pardeamiento no enzimático), la reacción de Strecker, la oxidación de ácidos grasos, la caramelización, e incluso, la carbonización de de azúcares, grasas y proteínas.

El resultado de las reacciones químicas que tienen lugar durante la cocción es el desarrollo de colores pardos típicos en la superficie de los alimentos, así como la generación de una gran cantidad de compuestos aromáticos y sápidos (aldehídos, cetonas, lactonas, alcoholes, ésteres, etc.) que contribuyen dependiendo de la composición original del producto y de la temperatura y el tiempo de calentamiento, al sabor y olor característico de los alimentos tratados (Fennema, 2000). En los alimentos fritos hay que considerar que el producto final también contiene compuestos volátiles procedentes del aceite de fritura (Boskow, 2004).

En general, todas estas operaciones de cocinado mejoran la digestibilidad de los alimentos y contribuyen a la destrucción de algunos factores antinutritivos presentes de forma natural en ciertos alimentos, como por ejemplo los inhibidores de proteasa en la soja, o glicoalcaloides en las patatas y las berenjenas (Menella et al, 2010; Hall et al., 2006; Shiu et al., 2007).

4.2. Clasificación de las técnicas de cocción según el medio de transferencia de calor.

La cocción es un proceso por el que se alcanza, dentro del alimento, la temperatura necesaria para conseguir efectos culinarios específicos. Para ello se pueden aplicar diversos sistemas de tratamientos térmicos (Tablas 4.1-2, -3, -4 y -5). El proceso de cocción se considera precisado cuando se establecen los perfiles de las temperatura y de humedad que van desde el exterior del alimento hasta su interior, tales perfiles quedarán definidos por el conjunto de unos parámetros tecnológicos, ajustados a las condiciones de cada sistema y de cada producto (Bello, 1998).

Tabla 4.1-2. Clasificación y descripción de las cocciones en medio graso.

Técnica de Cocción	Modalidades	Características	Equipos	Fuente de calor	Aplicaciones	Efectos
Cocciones en medio graso	Salteado (<i>pequeña fritura</i>)	Cocción total o parcial en poca cantidad de cuerpo graso calentado a fuego vivo. Mejora la palatabilidad, dora la superficie y proporciona un flavor atractivo. Método rápido.	<u>Domésticos:</u> Sartenes planos con bordes bajos (facilitan el desprendimiento de vapores).	Gas ciudad, gas propano, electricidad o inmersión de resistencias eléctricas. Debe asegurarse la homogeneidad y regularidad en los sistemas de calor.	<u>Alimentos:</u> Toda clase de alimentos crudos o cocidos en piezas pequeñas. <u>Grasas de fritura:</u> Las estables frente al efecto del calor. Aceites de oliva, cacahuete, girasol, germen de maíz, multivegetal, manteca de cerdo, grasa de riñón de buey o ternera, sebo de vaca, grasas artificiales sólidas	<u>Alimento:</u> El brusco contacto con el baño de aceite caliente le ocasiona: Coagulación de las proteínas superficiales, caramelización del almidón y favorece la reacción de Maillard. Desarrolla una costra superficial que impide la salida del vapor de agua, así el alimento se cuece a 100°C. Se reduce el contenido acuoso de la parte interna y por ende se concentran los nutrientes. Se deshidrata la parte externa de la corteza con desarrollo del color.
	Fritura	Nivel de aceite escaso que ha de renovarse en el proceso. El producto se fríe en la porción sumergida y el resto por el vapor del interior.	<u>Domésticos:</u> Sartenes o recipientes de poca profundidad <u>Industriales:</u> Sartenes abatibles o basculantes de acero inoxidable con bordes bajos (20-25 cm).		<u>Alimentos:</u> Toda clase ya sea crudos, parcialmente cocidos o con preparaciones previas (enharinado, rebozado, empanado). <u>Grasas de fritura:</u> Las estables frente al efecto del calor. Aceites de oliva, cacahuete, girasol, germen de maíz, multivegetal, manteca de cerdo, grasa de riñón de buey o ternera, sebo de vaca, grasas artificiales sólidas.	<u>Aceite:</u> Como resultado del calentamiento: Sufre una hidrólisis de triglicéridos con liberación de ácidos grasos. Reacciona con el oxígeno del aire con formación de productos de oxidación. Forma enlaces cruzados entre ácidos grasos oxidados y da lugar a sustancias poliméricas y ácidos grasos cíclicos.
	* Fritura profunda (<i>gran fritura</i>)	Alimento sumergido en aceite (óptima relación tamaño/volumen). Renovar el aceite durante proceso. Calentamiento rápido y uniforme. La fritura ocurre en toda la superficie.	<u>Industriales:</u> Freidoras continuas o discontinuas, con rejillas contenedoras, filtros y termostatos. En acero inoxidable, evitar cobre, aleaciones y galvanizados.			

(*) Técnica incluida en el estudio.

Introducción

Tabla 4.1-3. Clasificación y descripción de las cocciones en medio acuoso.

Técnica de Cocción	Modalidades	Características	Equipos	Fuente de calor	Aplicaciones	Efectos
Cocciones en medio acuoso	Cocer o hervir	Cocción por inmersión en medio acuoso. Debe mantenerse una cantidad de líquido suficiente y minimizar las pérdidas por evaporación. El tiempo depende de la calidad y volumen del alimento.	Marmitas clásicas: Es un generador de calor capaz de calentar un recipiente profundo o cuba. Pueden ser fijas o basculantes, a presión normal de trabajo o con sobrepresión (marmita exprés)	<p><u>Directas:</u></p> <p>Con los focos de calor bajo la cuba:</p> <p>Electricidad con resistencias blindadas.</p> <p>Las de gas butano y gas ciudad con quemadores.</p>	<p>Arroz, legumbres, pastas alimenticias, verduras de hojas.</p> <p>Productos que requieren cocciones prolongadas.</p> <p>Las frutas se cuecen en jarabe, así el jarabe penetra en la fruta y el agua de constitución pasa al jarabe junto con sustancias solubles,</p>	<p><u>Alimento</u></p> <p>Cuando se introducen los alimentos en agua aún fría hay intercambio de sustancias en ambos sentidos, entre el alimento y el medio por procesos de ósmosis. A los 70°C coagulan las proteínas superficiales y se detiene la migración. Ocurre hidratación de almidones, Conversión del colágeno en gelatina. Las fibras musculares absorben agua, se fragmentan y se ablandan, también las fibras celulósicas y las macromoléculas de almidón. También degrada sustancias tóxicas. Cuando el medio líquido tiene elevada concentración de sustancias disueltas aparece una presión osmótica que se opone a la salida de compuestos del alimento.</p>
	Dependiendo de la temperatura inicial del medio de cocción se divide en:	<p>*Agua en ebullición</p> <p>y</p> <p>Agua caliente</p>	Construidas en acero inoxidable o aluminio laminado de gran espesor.	<p><u>Indirectas:</u></p> <p>Por intercambio de calor desde una cámara de calentamiento aplicada en el exterior de la cuba y que contiene un fluido intermediario caliente (agua o vapor)</p>	<p>Carnes magras. En caldo corto para volátiles y pescados.</p> <p>Productos de humedad alta y flavor suave en recipientes sin tapar. Se hierven con agua productos con humedad alta y flavor fuerte</p>	<p>Cuando se introducen los alimentos en agua a partir de los 70°C, coagulan las proteínas superficiales y se dificulta el intercambio entre el alimento y el medio. E minimizan las pérdidas de sales minerales y vitaminas hidrosolubles</p> <p><u>Agua de cocción:</u></p> <p>Se enriquece con nutrientes y compuestos aromáticos y de sabor.</p>

(*) Técnica incluida en el estudio.

Tabla 4.1-3. Clasificación y descripción de las cocciones en medio acuoso (continuación).

Técnica de Cocción	Modalidades	Características	Equipos	Fuente de calor	Aplicaciones	Efectos
Cocciones en medio acuoso	Escaldar o blanquear	Cocción incompleta. Con tratamientos térmicos muy cortos. Sirve para inactivar sistemas enzimáticos y es considerada una operación previa. Se le llama <i>sancochado</i> cuando el tratamiento es más prolongado.	Marmitas clásicas: Es un generador de calor capaz de calentar un recipiente profundo o cuba. Pueden ser fijas o basculantes, a presión normal de trabajo o con sobrepresión (marmita exprés)	<u>Directas:</u> con los focos de calor bajo la cuba: Electricidad con resistencias blindadas. Las de gas butano y gas ciudad con quemadores.	<u>Alimentos:</u> Toda clase crudos o cocidos en piezas pequeñas. Para suavisar el flavor fuerte de algunos alimentos como col, cebolla, nabo, despojos. <u>Medio líquido:</u> Agua, caldo corto, jarabe o vapor de agua normal o sobrecalentado.	<u>Alimentos:</u> Puede enriquecerse con otras sustancias aportadas por el medio. <u>Medio líquido:</u> Gana en nutrientes y en sustancias sápidas.
	Escalfar	Cocción lenta mediante un líquido acuoso, justamente por debajo de su punto de ebullición durante un tiempo justo para evitar la sobreccocción.	Construidas en acero inoxidable o aluminio laminado de gran espesor	<u>Indirectas:</u> Por intercambio de calor desde una cámara de calentamiento aplicada en el exterior de la cuba y que contiene un fluido intermediario caliente (agua o vapor)	<u>Alimentos:</u> Aquellos con bajo contenido acuoso. Piezas grandes de pescados y volatería. Carnes, aves <u>Medio líquido:</u> Agua, caldo, fumet, leche, jarabe, etc.	<u>Alimentos:</u> Textura más tierna, más digerible. Aumenta el flavor, la jugosidad, la blandura y los rendimientos. Absorbe agua y se rehidrata. O bien, alimentos ricos en agua pierden alguna cantidad.
	Cocción al vapor Cocción mediante vapor de agua que directamente los alimentos.	A presión normal A presión elevada	Temperaturas próximas a 100°C El proceso más rápido. Ahorra trabajo. Temperaturas (110 y 120°C) en función de la presión	Marmitas a vapor sin presión (vapor húmedo o saturado) Marmitas a vapor con presión (vapor seco o sobrecalentado). Con cerrado hermético, válvulas de seguridad, control de presión, purgas de aire y Evacuación de condensados.	 intermediario caliente (agua o vapor)	<u>Alimentos:</u> Productos delicados filetes de pescado, piezas de carne. Productos húmedos y ricos en almidón. Pelado de frutas y tomates

Introducción

Tabla 4.1-4. Clasificación y descripción de las cocciones en medio no líquido.

Técnica de Cocción	Modalidades	Características	Equipos	Fuente de calor	Aplicaciones	Efectos	
Cocciones en medio no líquido	Con fuego directo	Asar a la parrilla	Calor procede de fogón al aire libre que se transmite por radiación hacia el alimento. Temperaturas entre 600 y 900°C. Cocción rápida.	Parrilla de acero, hierro fundido, acero inoxidable, acero cromado o aleación de hierro, cromo y níquel.	Brazas de carbón, resistencias eléctricas, tubos de cuarzo, roca volcánica calentada, gas, cerámica refractaria, porcelana.	<p><u>Alimentos:</u> de primera. Principalmente piezas de carne delgadas y tiernas de mamíferos o aves.</p> <p>Pero también</p> <p>Pescados y Vegetales.</p>	<p><u>En carnes:</u> Desnaturalización de proteínas a los 65°C por encima de 75°C se endurecen. El colágeno se transforma en gelatina a los 56°C. Grasa muscular funde en la carne y le da jugosidad.</p>
		Asar a la plancha	Los alimentos se calientan por conducción desde la placa caliente. Flama en contacto con la plancha. Temperaturas hasta de 1100°C. Cocción rápida	Plancha lisa Plancha nervada de acero, hierro fundido, acero inoxidable, acero cromado o aleación de hierro, cromo y níquel.		<p><u>En general:</u> Formación de costra superficial, crujiente y coloreada. Los productos de las reacciones de Maillard y caramelización contribuyen al flavor.</p>	
	Con fuego indirecto	Asar al horno	En un recinto cerrado, el calor se transfiere tanto por radiación como por convección. Formación de una costra externa. Temperaturas entre 150 y 200°C Cocción lenta	Hornos clásicos o de convección natural (hornos de calor estático). Hornos de convección forzada con impulsor de aire.	Electricidad, gas propano, gas ciudad o leña.	<p><u>Alimentos:</u> de primera. Piezas de carne de mamíferos y aves de mayor volumen.</p> <p>Pescados y vegetales</p>	<p>Concentración y retención de nutrientes por pérdida de agua.</p>

Tabla 4.1-5. Clasificación y descripción de las cocciones mixtas.

Técnica de Cocción	Modalidades	Características	Equipos	Aplicaciones	Efectos	
Cocciones mixtas El calor se transmite al alimento a través de un medio que puede contener tanto agua como grasa, provenientes de un líquido añadido, o aportados por el mismo alimento, o por los ingredientes con que se elabora.	*Rehogar	Cocción parcial o total. El alimento pasa bajo fuego débil, por una sartén con poca cantidad de aceite. Interviene del agua aportada por el propio alimento.	El alimento no toma color.			
	Sofreír	Sinónimo del rehogado	El alimento se dora ligeramente.			
	Braseado	Cocción prolongada con temperaturas regulares y lentas. Técnica laboriosa. Para humedecer se añade un fondo concentrado, así no se fuerza la salida de las sustancias del alimento por ósmosis. Se consumen el sólido y la salsa.	Recipiente hermético (<i>brasera</i>) de dimensiones justas para que la pieza se mantenga siempre cubierta por líquido.	Grandes pieza de animales adultos y de pescados, verduras escaldadas y refrigeradas.	Al inicio se forma una corteza. El calor contrae las fibras musculares y concentra los jugos en el centro. Estos se comprimen hasta que el agua se transforma en vapor y disocia las fibras. Los jugos se difunden hacia el exterior por capilaridad y pasan a la salsa al mismo tiempo que penetran algunos compuestos en el alimento (fenómenos de expansión).	
	Guisado	Se obtienen preparaciones económicas y variadas.		Alimentos en trozos. Volátiles, caza, pescados, carne de segunda y tercera (ricos en tejido conectivo).	Concentración de sustancias favorecida por la coagulación de las proteínas superficiales y la caramelización de azúcares (formación de costra). En seguida ocurren fenómenos de expansión.	
	Ragoût (Francia) Carbonada (Bélgica) Osso bucco (Italia)		Cocer a cubierto en un líquido ligado, lentamente y de modo regular alimentos previamente salteados y dorados.			
	Estofado	Cocción del alimento con poca grasa y con el líquido de constitución de los ingredientes de la preparación. Se consume el sólido y el líquido.	A partir de ingredientes crudos	A fuego lento y sin tapar hasta que los alimentos desprendan agua. Se continúa con el alimento tapado a temperatura moderada y constante.	Recipientes altos y estrechos provistos de tapadera.	Verduras, carnes
			En su jugo			Los alimentos desprenden jugos y grasa que contribuyen a la cocción. Se reduce al mínimo la pérdida de sustancias solubles y se conservan al máximo los sabores. El alimento se impregna de los aromas que se concentran en el interior del recipiente.

(*) Técnica incluida en el estudio.

4.3. Efecto de la elaboración culinaria sobre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante de las hortalizas.

En relación al efecto del cocinado sobre la ingesta diaria de la capacidad antioxidante total, se considera que, por lo general son destructivos para los compuestos antioxidantes; sin embargo en algunos casos se incrementa significativamente la capacidad antioxidante total respecto al alimento crudo (Wu et al., 2004). La gravedad del daño a las sustancias antioxidantes provocado por tratamientos culinarios como la fritura, la cocción al vapor o por hervido es diferente según se evalúen compuestos lipofílicos o hidrofílicos.

En un estudio en zanahoria (*Daucus carota* L.), calabacines (*Cucurbita pepo* L.) y brócoli (*Bassica oleracea*, var. *Botrytis caput* L.), Miglio y colaboradores (2008) observaron que la utilización de medios de transferencia de calor apolares, por ejemplo el aceite durante la fritura, favorece la difusión desde las hortalizas de compuestos como luteína, α -caroteno y β -caroteno y afecta en menor medida la concentración de antioxidantes solubles en agua como los polifenoles. Por el contrario, durante el hervido migra una mayor cantidad de antioxidantes hidrofílicos (polifenoles como el ácido clorogénico, caféico y cumárico) hacia el medio de cocción, afectando en menor extensión (respecto a la fritura) a los antioxidantes solubles en grasas. Simultáneamente se observa una mayor conservación de β -caroteno en el calabacín respecto a la zanahoria, esta tendencia la atribuyeron a la mayor termoestabilidad de los carotenos asociados a cloroplastos.

El tipo de cocinado también puede afectar la capacidad antioxidante total, por ejemplo, los alimentos cocidos al vapor muestran mayor capacidad que los hervidos, lo que se atribuye a la menor lixiviación de fitoquímicos hacia el agua de cocción. Sin embargo, algunos fitoquímicos incrementan su biodisponibilidad cuando la comida se cocina (Lako et al., 2007).

En el estudio de la aplicación de microondas, rehogado y hervido de 6 variedades japonesas de pimientos Chuah et al., (2008), encontraron una reducción significativa de la actividad antioxidante solo con el hervido durante 5 minutos y una reducción adicional cuando el tiempo se prolongó a 30 minutos. Las variedades rojas mostraron resistencia al deterioro durante el tiempo que excedió los 5 minutos de ebullición, y las verdes, por su parte, incrementaron la actividad antioxidante (agua de cocción + tejidos) respecto a la medida en la hortaliza fresca.

Se ha propuesto que los incrementos en la actividad antioxidante observados en varias hortalizas tras el hervido, pueden ser el resultado de la inactivación térmica de las enzimas oxidativas y de la destrucción de las paredes celulares promoviendo la liberación de potentes antioxidantes. El modo en que se presentó la reducción en las concentraciones de fenoles totales y ácido ascórbico coincidió con lo ocurrido con la actividad antioxidante, aunque en estos casos, la suma de las concentraciones (agua de cocción + tejidos) no superó la de las hortalizas frescas.

Se ha observado que los conjugados de quercetina son notoriamente resistentes a la degradación durante las operaciones normales de procesamiento y que las hortalizas que los contienen son una fuente importante de flavonoles aún después de hervidas, si se consumen junto con el líquido de cocción. Esta afirmación también es aplicable a la mayoría de sustancias antioxidantes y a la cuantificación de su actividad y es respaldada por los resultados de numerosos estudios que muestran que una cantidad importante es distribuida hacia el agua de cocción utilizada durante los tratamientos hidrotérmicos, y que la sumatoria de las concentraciones del sustrato sólido procesado y el líquido de cocción, no solo igualan, sino que también puede superar la de los vegetales sin procesar (Chuah et al., 2008).

También se recomienda reducir la cantidad de agua y el tiempo de cocción para obtener los beneficios óptimos de los compuestos bioactivos. La gravedad de las pérdidas durante los tratamientos hidrotérmicos están relacionadas con la proporción hortaliza/agua, con el tiempo de cocción y con el área superficial expuesta a la lixiviación. Así, durante la vaporización en donde no tiene lugar contacto alguno con agua líquida, se induce el menor efecto reductivo en los componentes hidrosolubles, seguida por el escaldado y el hervido (Volden et al., 2004; 2009).

El escaldado es el tratamiento menos severo frente a la pérdida de vitamina C y causa menos pérdidas de polifenoles que el hervido; pero en ambos tratamientos, las pérdidas son más severas cuando se habla de vegetales muy fragmentados o de hojas. El hervido, por sí solo, reduce considerablemente los contenidos de sustancias antioxidante, pero la pérdida se intensifica si está precedido por la congelación (Sikora et al., 2008).

Las pérdidas de polifenoles durante los tratamientos térmicos también pueden deberse al enlace covalente entre fenoles oxidados y proteínas o aminoácidos, así como también a la polimerización de fenoles oxidados (Friedman, 1996).

4.4. Efecto de la elaboración culinaria sobre el Aceite de Oliva.

El AOVE tiene una alta estabilidad durante la fritura por inmersión de hortalizas elaboradas en el hogar o en otros usos en donde se aplican temperaturas de fritura. Cuando se le compara con otros aceites vegetales como el de girasol, algodón, maíz y soja, el aceite de oliva tiene una tasa de alteración significativamente más baja. La mayor estabilidad a la oxidación térmica explica el por qué este aceite puede usarse repetidamente en operaciones de fritura antes de que alcance el punto de rechazo de aproximadamente 25 % de compuestos polares totales.

Una explicación de la resistencia del aceite de oliva al deterioro rápido a elevadas temperaturas es la presencia de antioxidantes naturales en la fracción insaponificable. Esos antioxidantes son el tocoferol, escualeno y principalmente el avenasterol, este último conocido como factor antipolimerizante (Boskow, 1999).

La aplicación de calentamiento por microondas puede inducir alteraciones oxidativas en el AOVE y se ha encontrado que la concentración de polifenoles disminuye progresivamente durante el tratamiento con microondas después de 15 minutos de calentamiento (temperatura final 313,4°C). Las concentraciones pueden llegar hasta niveles no detectables cuando el contenido de fenoles en el aceite fresco es más bajo, por ejemplo en aceites de oliva (13 mg/kg de aceite). Tras 15 min de tratamiento las concentraciones de hidroxitirosol, tirosol, y ooleuropein aglicona, cayeron hasta 6, 38 y 0 % respectivamente. Los o-difenoles parecen ser más resistentes a la exposición a microondas; los secoridoides permanecen invariables y los lignanos no presentaron descenso significativo. El ácido elenólico por ser altamente termolábil, disminuye significativamente con el tiempo de tratamiento hasta desaparecer tras 12 minutos (Cerretani et al., 2009)

Durante la fritura se espera que la concentración causada por la pérdida de agua junto con la absorción de AOV incremente la concentración de polifenoles en las hortalizas fritas, mientras que, se espera el resultado opuesto con la pérdida de polifenoles debida a la oxidación (Kalogeropoulos, 2007),

Durante la fritura de calabacines, patatas, pimientos y berenjenas se cuantificó la cantidad de aceite absorbida que varió de 5,5 % en el caso de pimientos verdes y calabacines a 35,9 % para las berenjenas, por ser estas últimas las hortalizas más porosas. En el caso de la fritura de hortalizas rebozadas (harina o mezcla de harina + agua) la absorción se verifica principalmente en la cubierta harinosa (Kalogeropoulos et al., 2007)

Durante la fritura por inmersión de chips de patata en el rango de temperaturas de 150 a 190°C se midieron cantidades de aceite absorbido que promediaron 41 % para el aceite de oliva; este porcentaje superó al de los aceites de girasol, soja, cacahuete, colza (36,8 %) y de palma. Y se incrementó hasta 46,64 % cuando se practicó la fritura a la menor temperatura del rango (150°C) (Kita et al., 2007).

Durante la fritura el α -tocoferol presente en el AOVE migra hacia las hortalizas, lo que resulta en un enriquecimiento de las hortalizas con esta vitamina. El incremento sigue una relación lineal con la cantidad de AOVE absorbido, llegando a ser de entre 6-30 veces respecto a los vegetales frescos (calabacines, patatas, pimientos verdes y berenjenas) que por su naturaleza contienen cantidades insignificantes. Incluso la cantidad de tocoferol que se cuantificó en el aceite absorbido llegó a ser 1.6-6 veces mayor que la cantidad remanente en el aceite de fritura (Kalogeropoulos et al., 2007)

En términos generales, el procedimiento de fritura provoca la pérdida parcial de polifenoles originalmente presentes en el AOVE y un enriquecimiento de las hortalizas fritas. En aceites sometidos a fritura se ha identificado la quercetina adicionalmente a los fenoles presentes en el aceite fresco (Kalogeropoulos et al., 2007).

II. OBJETIVOS

Objetivos

1. OBJETIVOS.

Los compuestos fenólicos son un grupo de sustancias que se encuentran exclusivamente en los alimentos de origen vegetal, constituyen poderosos antioxidantes con un papel protagonista en la captación de radicales libres, combatiendo así el estrés oxidativo. Al garantizar un aporte continuo en la dieta, se complementa la actividad de las defensas endógenas, ayudando con ello a la prevención de enfermedades crónico-degenerativas asociadas con estilos de vida oxidantes. El aceite de oliva virgen extra (AOVE) es un alimento básico de la dieta española y un aporte importante de fenoles cuya acción es esencial en los beneficios a la salud que proporciona la Dieta Mediterránea. La patata, el tomate y la berenjena también son alimentos básicos en la dieta española, y la calabaza por su parte, es de consumo frecuente pero poco estudiada y España es uno de los principales productores mundiales. La primera destaca como fuente importante de carbohidratos complejos, y el resto de ellas como aporte de vitaminas, minerales y compuestos bioactivos no nutritivos.

La mayoría de alimentos han de ser sometidos antes de su consumo a un proceso de cocción con el objetivo de transformar mediante la acción del calor el aspecto, la textura, la composición, y de mejorar la disponibilidad de los principios nutritivos y no nutritivos. En general se considera que los métodos de cocinado pueden ejercer un efecto negativo sobre los compuestos antioxidante al destruirlos en mayor o menor medida.

Por lo antes expuesto nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Determinar los efectos de la aplicación de cuatro técnicas culinarias de elaboración sobre los parámetros bromatológicos de cuatro hortalizas, AOVE y agua.
2. Determinar los efectos de la aplicación de cuatro técnicas culinarias de elaboración sobre el contenido de fenoles totales e individuales en el agua y en los extractos metanólicos de cuatro hortalizas y AOVE.
3. Determinar a través de cuatro métodos, los efectos de la aplicación de cuatro técnicas culinarias sobre la capacidad antioxidante en el agua y en los extractos metanólicos de cuatro hortalizas y AOVE.
4. Establecer similitudes entre cuatro hortalizas de la dieta mediterránea procesadas por cuatro técnicas culinarias.
5. Determinar si cada técnica culinaria posee un perfil particular de parámetros bromatológicos, fenoles y capacidad antioxidante que las distinga entre sí.

Objetivos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTUDIO DEL EFECTO DE TRATAMIENTOS CULINARIOS EN EL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL AOVE Y HORTALIZAS.

1.1. Técnicas culinarias aplicadas en la elaboración de las hortalizas.

1.1.1. Material.

- **Muestras.**

Se ha analizado aceite de oliva virgen extra (AOVE), por la importancia que representan para España como productor mundial y una serie de verduras representativas de la dieta mediterránea española como la patata, calabaza, berenjena, y tomate. Adicionalmente, al AOVE se le reconoce por su aporte de fenoles a la dieta y por el papel que desempeña en las técnicas culinarias tradicionales como medio de transferencia de calor y como ingrediente.

Las muestras de AOVE fueron adquiridas en una tienda de autoservicio de la localidad de Granada, España, en presentación de garrafrones de 5 l. Una vez adquirido, el aceite fue distribuido en frascos de vidrio color ámbar con capacidad de 500 ml y la operación de cierre se hizo bajo una corriente de Nitrógeno. Los frascos se mantuvieron cubiertos con papel aluminio y en refrigeración a 4°C hasta el momento de procesarlo. Antes de tomar las alícuotas cada envase se estabilizó a temperatura ambiente y se agitó su contenido para homogeneizarlo.

Las patatas, aptas para cocción y fritura de la variedad “Ambra” y la calabaza de la variedad “Butternut” también fueron adquiridas en una tienda de autoservicio local en presentación de saco de 3 Kg, la primera; y como piezas individuales de 1,5 a 2 Kg la segunda. Las berenjenas de la variedad “Black Beauty” y los tomates de la variedad conocida como “para ensalada” fueron obtenidos a granel de un comercio local. Las muestras se adquirieron conforme se realizaban los diferentes ensayos, a fin de que fueran lo más frescas posibles y tras su adquisición eran directamente procesadas retirándole las semillas y /o la piel en algunos casos.

- **Material y aparatos.**

- Vasos de precipitado de 500 ml de cristal o plástico.
- Pera de decantación graduada de 500 ml de capacidad.
- Caso de acero inoxidable de 16 cm de diámetro con tapa (Monix, España).
- Inserto de acero inoxidable para fritura.
- Placa eléctrica Orthegoza PE-2612 con control de temperatura.
- Balanza con capacidad de 600 g y precisión de milésimas de gramo Cobos.
- Termómetro electrónico Crison modelo TM 65.
- Sonda termopar tipo K para temperaturas por inmersión Crison modelo 50 95.
- Sonda termopar tipo K para temperaturas por contacto Crison modelo 50 97.

1.1.2. Métodos de Aplicación de Técnicas Culinarias.

- **Fritura por inmersión.**

Fundamento

La fritura es un método de elaboración con temperaturas características que van entre los 170-180 °C, que remueve la humedad de la superficie del alimento y que puede calentarlo por encima del punto de ebullición a temperaturas que generan los sabores y colores propios de las reacciones de pardeamiento. La transferencia de calor hacia el alimento se realiza de la misma manera que en el hervido, esto es, por las corrientes de convección del líquido que en este caso es aceite caliente (Le Cordon Bleu 1996; Bello, 1998; Lawson, 1999; Mc Gee, 2004).

Procedimiento

En una olla de acero inoxidable limpia y seca con capacidad de 1.5 l se calentaron 600 g de AOVE fresco y nuevo hasta una temperatura de 180 °C medida con un termopar de inmersión “tipo K” a 3 cm de profundidad. Se distribuyeron 120 g de patata, calabaza, berenjena o tomate en el inserto y este se sumergió 3 cm en el aceite para freír los cubos de la hortaliza, hasta conseguir una textura suave y un aspecto dorado (10 min). El tiempo 0 fue el instante en que se alcanzaron los 180 °C (al introducir el alimento). Las temperaturas se registraron cada minuto hasta el final de la fritura y la masa del aceite residual se determinó restando el contenido de grasa de la fracción frita a la cantidad inicial de aceite. Del aceite residual y de la fracción sólida se tomaron las muestras para los análisis y la obtención de extractos.

- **Rehogado.**

Fundamento

Es una técnica de cocción mixta en la que se realiza una cocción parcial o total del alimento con poca cantidad de aceite y en donde también interviene el agua aportada por el propio alimento; el calor se aplica mediante un fuego débil.

Se le llama *soffrito* en italiano, o *soffregit* del catalán. Es un método en el que predomina el calentamiento de los alimentos por conducción desde una superficie caliente.

En esta técnica los alimentos finamente cortados y cubiertos con aceite se cocinan muy lentamente con calor suave (80-100 °C), tiene el propósito de desarrollar una base de sabor para platos que incluyen más ingredientes y generalmente se evitan o minimizan la deshidratación y el pardeamiento. El aceite tiene la función de mantener un contacto constante y uniforme con la fuente de calor, lubrica y evita que se pegue el alimento y además provee algo de sabor, en conjunto con las temperaturas suaves consiguen ablandar las hortalizas y desarrollar, concentrar y combinar los sabores (Bello, 1998, McGee, 2004; Le Cordon Bleu 1996).

Procedimiento

El procedimiento se cumplió de manera similar a la fritura, prescindiendo del inserto y utilizando 60 g de AOVE nuevo y fresco. La temperatura se determinó en la superficie inferior interna del recipiente con un termopar “tipo K” de contacto.

Cuando se alcanzó una temperatura de 80°C se depositaron los 120 g de cubos de patata, calabaza, berenjena o tomate. El contenido del recipiente se removió cada minuto durante 10 min hasta conseguir la cocción, un aspecto cristalino y una textura suave, evitando cualquier indicio de pardeamiento en la superficie y sin sobrepasar los 100 °C. En los ensayos se consideró como tiempo 0 el instante en que se alcanzó la temperatura de 80 °C (momento en que se introdujo el alimento). Simultáneamente, se registraron las temperaturas minuto a minuto hasta el final del rehogado. La masa del aceite residual se determinó restando el contenido de grasa de la fracción sólida rehogada a la cantidad inicial de aceite, de este aceite y de la fracción sólida se tomaron las cantidades necesarias para los análisis y la obtención de extractos.

- **Cocción.**

Fundamento

Es una técnica de cocción en medio acuoso que, en conjunto con la cocción al vapor, es uno de los métodos de elaboración de alimentos más simples, pues no requiere el control de la temperatura, porque el agua al hervir, ya sea con una flama alta o baja, no sobrepasará los 100 °C. Además, como el agua es un excelente transmisor de calor, también es uno de los métodos de cocción más eficientes ya que, la superficie completa del alimento se mantiene sumergido y en contacto con el medio de cocción, que es lo suficientemente denso para que sus moléculas choquen constantemente con el alimento y ceda rápidamente su energía. Una característica importante es que el agua disuelve y extrae compuestos de las células del alimento (Mc Gee, 2004).

Procedimiento

El inserto con los trozos de patata, calabaza, berenjena o tomate, fue sumergido en el recipiente cuando inició la ebullición de los 600 ml de agua destilada. La ebullición se retomó en el menor tiempo posible, y el calentamiento prosiguió con la olla cubierta durante 10 min hasta conseguir la cocción con una consistencia firme. En ambos ensayos se consideró como tiempo 0 el instante en que se alcanzó la temperatura de 100 °C. Simultáneamente, se registraron las temperaturas determinadas con el termopar sumergido 3 cm, minuto a minuto hasta el final de la cocción. Se calculó la masa del agua residual por diferencia entre la masa inicial y la final, de esta agua y de la fracción sólida cocida se tomaron las cantidades necesarias para las determinaciones del contenido de humedad, grasa y la obtención de extractos metanólicos.

- **Cocción en mezcla agua AOVE (Cocción AA).**

Procedimiento

En este caso el procedimiento fue exactamente el mismo que en el caso de la cocción en agua. Las diferencias básicas consistieron en:

- Emplear como medio de transferencia de calor una mezcla de 540 ml agua con 60 ml de AOVE, es decir, en relación 4,5:0,5.

- Una vez concluido el experimento y extraída la hortaliza procesada, el medio de cocción fue transferido a una pera de decantación protegida de la luz para efectuar una separación líquido/líquido que facilitara la recuperación del AOVE y del agua.
- **Escurreo y enfriamiento del material procesado.**

Al final de cada técnica culinaria aplicada en los ensayos; el vegetal procesado se dejó escurrir durante 5 min en el inserto de acero inoxidable en que fue manipulado, permitiendo que el exceso de aceite y/o agua retornaran al recipiente de elaboración. Enseguida el aceite, el agua y la hortaliza en turno fueron transferidos a vasos de precipitado protegidos de la luz, para dejarlos enfriar en refrigeración por separado hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Para determinar el efecto de la aplicación de 4 técnicas culinarias de uso frecuente en los hogares (fritura, rehogado, cocción, cocción en mezcla aceite/agua (cocción AA)) sobre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante del AOVE y las hortalizas, se trabajó en las condiciones descritas en la Tabla 1.1-1 (Bello, 1998; MCGee 2004). También se analizaron los alimentos en crudo, antes de ser sometidos a las técnica de cocinado elegidas.

Tabla 1.1.-1. Condiciones experimentales establecidas durante la aplicación de los tratamientos culinarios en estudio.

Condiciones	Alimento crudo	Fritura	Rehogado	Cocción	Cocción AA
Medio de cocción	N.a.	AOV	AOV	Agua	AguAAOVE
Cantidad de alimento (g)	N.a.	120	120	120	120
Cantidad de medio de cocción (g)	N.a.	600	60	600	600
Proporción Alimento: medio de cocción	N.a.	1:5	1:0.5	1:5	1:4,5:0,5
Tiempo (min)	N.a.	10	10	10	10
Temperatura (°C)	Ambiente	180	80 a100	100	100
Fracción de análisis	Alimento	Aceite, alimento	Aceite, alimento	Agua, alimento	Agua, aceite, alimento

Para las hortalizas, en cada bloque de experimentos, se hicieron tres repeticiones independientes de los ensayos con cada una de las técnicas culinarias, utilizando en cada repetición, fracciones del mismo lote de AOVE previamente caracterizado.

- **Técnicas de análisis practicadas.**

Se cuantificaron las siguientes variables y los incrementos respecto a los valores de los alimentos crudos se expresaron como porcentajes (%):

- Contenido de humedad del medio de cocción (AOVE y/o agua) y de la fracción sólida (%) (Sullivan y Carpenter, 1993).
- Contenido de grasa de la fracción sólida y del medio de cocción (%) (Sullivan y Carpenter, 1993).
- Concentración de fenoles totales en los extractos de la fracción sólida, en el agua y/o el AOVE ($\mu\text{g/g}$) (Singleton et al 1999).
- Perfil cualitativo y cuantitativo de sustancias fenólicas en los extractos de la fracción sólida, en el agua y/o el OVE ($\mu\text{g/g}$) (Escarpa-González, 2002).
- Capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de la fracción sólida y del agua o el AOVE por los métodos DPPH ($\mu\text{mol de Trolox/Kg}$) (Brand-Williams et al., 1993), ABTS (mmol de Trolox/Kg) (Pellegrini et al., 1999), FRAP ($\mu\text{mol de Trolox/Kg}$) (Benzie and Strain, 1996); DMPD (mmol de Trolox/Kg) (Fogliano et al., 1999).

- **Preparación de la muestra sólida.**

Las hortalizas una vez procesadas y enfriadas fueron homogeneizadas con un batidor manual hasta obtener una pasta con consistencia de puré.

1.2. Métodos de análisis de humedad, grasa y materia seca en las fracciones (fracción sólida y medios de cocción) tras la aplicación de las técnicas culinarias de elaboración.

1.2.1. Material.

- **Muestras.**

Una vez separadas y a temperatura ambiente se analizaron las 36 fracciones obtenidas tras la aplicación de las cinco técnicas culinarias de elaboración para conocer el contenido de grasa, humedad y materia seca en cada hortaliza (patata, calabaza, berenjena y tomate) y en los medios de cocción: aceite de oliva virgen extra y agua.

- **Reactivos.**

Los reactivos empleados en los análisis bromatológicos se recogen en la Tabla 1.2-1.

Tabla 1.2-1. Reactivos utilizados en la determinación de grasas, humedad y materia seca.

Nombre	Proveedor
Éter de petróleo	Panreac
Sulfato de sodio anhidro	Panreac

- **Material y aparatos.**

- Material de vidrio de calidad contrastada, necesario para gravimetría
- Cartuchos de extracción de grasas
- Balanza analítica con precisión de décimas de miligramo Metler AE200
- Estufa de desecación P-Selecta
- Desecador

Materiales y Métodos

- Sistema de extracción de grasas Soxhlet
- Baño de María P-Selecta, Presistern
- Rotaevaporador de vacío

1.2.2. Métodos.

- **Determinación del contenido de humedad en hortalizas y agua.**

Fundamento

Los procedimientos para determinar el contenido de humedad especificado en los estándares alimentarios generalmente involucran métodos de deshidratación térmica. El material es calentado bajo condiciones específicas y la pérdida de peso es considerada como una medida del contenido de humedad de la muestra. Para una determinación precisa, la tendencia es a secar los alimentos a la menor temperatura posible. Para prevenir la reabsorción de humedad después del secado, la muestra debe ser transferida rápidamente del horno hacia un desecador y pesada rápidamente, después de que la muestra haya alcanzado la temperatura ambiente (Sullivan y Carpenter, 1993; Pomeranz y Meloan, 1994).

Procedimiento

Se determinó por triplicado por el método gravimétrico manteniendo en una estufa de secado a $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ un pesafiltros previamente desecado, estabilizado y pesado con 10 g de muestra hasta que no se detectó variación de peso (24 h). El contenido de humedad se calculó restando al peso fresco el peso seco alcanzado y se expresó como porcentaje (AOAC, 1990).

- **Determinación del contenido de humedad en aceite de oliva virgen extra.**

Procedimiento

Se agitó fuertemente el frasco que contenía el aceite y se vertieron rápidamente 10 g en un pesafiltros previamente desecado ($105\text{ }^{\circ}\text{C}$), estabilizado y pesado. Se pesó la muestra con precisión de 1 mg. El pesafiltros con muestra se colocó en la estufa y se mantuvo durante 30 min y enseguida se dejó enfriar dentro de un desecador durante otros 30 min. Este tratamiento se repitió en operaciones sucesivas, hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas no excediera el 0.05 % (Panreac, s/f).

El contenido de humedad se calculó por triplicado restando al peso fresco, el peso seco alcanzado y se expresó como porcentaje.

- **Determinación del contenido de grasas en hortalizas crudas y procesadas.**

Fundamento

En esta técnica se considera que el extracto obtenido por extracción Soxhlet corresponde al contenido graso de la muestra. La extracción de muestras sólidas con disolventes, generalmente conocida como extracción sólido-líquido o lixiviación, es un método muy utilizado en la separación de analitos de muestras sólidas. El resultado representa el contenido de sustancias extraíbles, que mayoritariamente son grasas, aunque, también están reflejados pequeños contenidos de otras sustancias como las vitaminas liposolubles y pigmentos. El procedimiento puede aplicarse a distintos tipos de alimentos sólidos.

La extracción Soxhlet ha sido (y en muchos casos, continua siendo) el método estándar de extracción de muestras sólidas más utilizado desde su diseño en el siglo pasado, y actualmente, es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción (Sullivan y Carpenter, 1993; Pomeranz y Meloan, 1994).

Procedimiento

Se pesaron 5 g de muestra seca y homogeneizada con una precisión de ± 1 mg en un cartucho de extracción, se agregaron 2 g de sulfato de sodio anhidro y se cubrió la muestra con un trozo de algodón. El cartucho se colocó en la pieza media del dispositivo de extracción Soxhlet y a esta pieza se le ajustó un matraz redondo previamente desecado, estabilizado y pesado; en la parte superior se ajustó el refrigerante. Finalmente se montó el dispositivo sumergiendo hasta la mitad el matraz redondo en el baño María.

Se depositaron en el sistema 200 ml de Éter de petróleo y se hizo la extracción manteniendo el reflujo durante al menos 2 h. En seguida se retiró el matraz redondo del sistema y se evaporó el exceso de Éter en un rotavapor al vacío; después, el matraz con el residuo resultante se mantuvo en una estufa de desecación durante algunas horas para evaporar cualquier residuo de disolvente. Se tomó el peso final del matraz previamente enfriado dentro de un desecador.

El contenido de humedad se calculó por triplicado restando el peso del matraz vacío al peso del matraz con residuo y se expresó como porcentaje (AOAC, 1990).

1.3. Obtención de extractos metanólicos a partir de las fracciones obtenidas tras la aplicación de las técnicas culinarias de elaboración.

1.3.1. Materiales.

- **Muestras.**

Inmediatamente después de realizados los ensayos, se procedió a la molienda de la fracción sólida con un batidor manual y a la obtención de extractos metanólicos de cada una de las fracciones resultantes de la aplicación de las técnicas culinarias (Tabla 1.3-1). El agua utilizada durante la cocción fue la única fracción ensayada sin la adición de metanol; solo fue centrifugada durante 15 min a 8000 rpm para eliminar cualquier residuo sólido presente (Tabart et al., 2009).

Se almacenaron alícuotas de 7 ml de los extractos metanólicos y del agua centrifugada durante periodos que no superaron los 2 meses en condiciones de ausencia de luz y a -21°C hasta el momento del análisis.

- **Reactivos.**

Los reactivos para la obtención de extractos metanólicos se muestran en la Tabla 1.3-1.

Tabla 1.3-1. Reactivos utilizados en la obtención de extractos metanólicos en muestras de aceite y patata.

Nombre	Proveedor
Metanol HPLC	Panreac
Acetona	Panreac
Ácido clorhídrico	Panreac
Agua destilada	

- **Material y aparatos.**

- Material de vidrio de calidad contrastada, necesario para volumetría.
- Matraces aforados de 25 ml.
- Pipetas graduadas de 10 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Balanza analítica con precisión de décimas de miligramo Metler AE200.
- Tubos de centrífuga de 50 ml de capacidad con tapa.
- Batidor manual Taurus.
- Centrífuga Universal 32.
- Agitador oscilatorio Selecta.
- Congelador marca BRU.

1.3.2. Métodos.

- **Procedimiento de extracción de la fracción de AOVE.**

Fundamento

La dilución del AOVE previa a la extracción de antioxidantes (fenoles) no incrementa la concentración final de en los extractos; por este motivo, en este estudio el procedimiento se hizo directamente en el aceite. Sin embargo, la concentración de las soluciones metanólicas sí es un factor significativo que ha motivado el estudio de los rendimientos de extracción y se ha concluido que los extractos al 80 % optimizan esta operación respecto a los de 60 y 100 %.

En el aceite de oliva crudo o procesado se recomienda dividir el volumen total de la mezcla metanólica en más de una etapa de extracción, siendo suficientes dos para obtener el mayor rendimiento. (Montedoro et al., 1992; Samaniego, 2005).

Procedimiento

El procedimiento se basa en el recomendado por Montedoro et al., (1992) con algunas modificaciones realizadas a la metodología original. En un tubo de centrífuga de 50 ml con tapa y protegido de la luz, fueron diluidos 10 g de aceite en metanol al 80 % (1:1 p/v); la mezcla se mantuvo en agitación por 60 min a 200 rpm.

Enseguida se centrifugó a temperatura ambiente durante 15 min a 8000 rpm. El sobrenadante se recuperó con una pipeta Pasteur en un matraz aforado protegido de la luz, y en el aceite se repitió el procedimiento de extracción y separación. Finalmente, se combinaron las fracciones recuperadas y el volumen se ajustó a 25 ml con metanol al 80 %.

- **Procedimiento de extracción de las fracciones sólidas de hortalizas.**

Las extracciones se hicieron aplicando una modificación del método descrito por Saura-Calixto (1998) en 5 g de muestra sólida previamente molida, combinándola (1:2 p/v) con metanol absoluto acidificado (pH 2 con HCl 2 N) en un tubo de centrífuga de 50 ml, con tapa y protegido de la luz. La mezcla se mantuvo durante 60 min en agitación a 200 rpm seguida de centrifugación durante 15 min a 8000 rpm. El sobrenadante se recuperó en un matraz aforado protegido de la luz; y en el precipitado se repitió el procedimiento de extracción, usando en esta ocasión 10 ml de acetona al 70 %. Los sobrenadantes se combinaron y se ajustó el volumen a 25 ml con metanol.

1.4. Métodos de análisis para la concentración de fenoles totales en extractos metanólicos y agua.

1.4.1. Material.

- **Muestras.**

Se evaluaron un total de 144 muestras; 36 correspondieron a los experimentos de cada una de las 4 hortalizas. Cada bloque (patata, calabaza, berenjena y tomate) consistió en 12 muestras de extractos de aceites y 15 de extractos de hortalizas; en ambos casos tanto crudos como procesados con las diferentes técnicas de elaboración culinaria. El resto de muestras (nueve) fueron porciones del agua cruda y procesada durante los ensayos.

- **Reactivos.**

Se emplearon los siguientes reactivos en la determinación espectrofotométrica de los polifenoles totales (Tabla 1.4-1).

Tabla 1.4-1. Reactivos utilizados en la cuantificación de los polifenoles totales.

Nombre	Proveedor
Estándares de referencia	
Ácido gálico	Sigma
Reactivos	
Reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu	Merk
Carbonato de sodio	Panreac

- **Instrumentación y material.**

Espectrofotómetro UV-Vis Boeco S-22, Alemania.

Cubetas desechables para espectrofotómetro.

- Material de vidrio de calidad contrastada, necesario para volumetría (vasos de precipitado, pipetas aforadas, matraces).
- Pipetas Pasteur

1.4.2. Métodos.

- **Método para la determinación de Fenoles Totales.**

Fundamento

El método se basa en el carácter reductor de los polifenoles. Emplea como reactivo una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, en medio básico, que se reduce al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado es máxima en torno a los 725 nm, proporcional a la concentración total de polifenoles y se expresa como índice de Folin-Ciocalteu. Se trata la muestra con el reactivo de Folin-Ciocalteu en presencia de Na_2CO_3 (Vázquez et al., 1973).

El contenido de fenoles totales se midió en los extractos metanólicos de los alimentos investigados usando una modificación del método Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton et al. (1999).

Preparación de los reactivos

- Disolución patrón: Se disolvieron 17.6 mg de ácido gálico en 17.6 ml de agua milliQ para obtener una solución madre de 1 g/l.
- Disolución de carbonato sódico al 10 % (p/v): Se disolvieron 50 g de carbonato sódico en 500 ml de agua en ebullición, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Se preparó con antelación para evitar que la turbidez interfiriera con la lectura.
- Recta de calibrado: a partir de la disolución patrón de ácido gálico de 1 g/l, se tomaron volúmenes de 5, 10, 25 y 50 μ l, que fueron depositados en matraces aforados de 10 ml; enseguida, se diluyeron en 2,5 ml de agua milliQ y se añadieron 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se dejó reaccionar en oscuridad durante 5 min.

Finalmente, se añadió 1 ml de solución de carbonato de sodio al 10 % y se incubó a temperatura ambiente durante 90 min en oscuridad antes de hacer las lecturas a 700 nm usando agua milliQ como blanco. Las concentraciones resultantes de las diluciones descritas fueron de 0,5, 1, 2.5 y 5 μ g/ml respectivamente (Fig. 1.4-1).

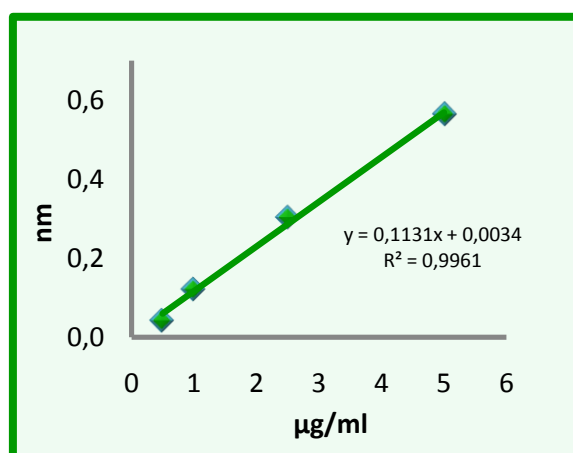


Figura 1.4-1. Recta de calibrado del ácido gálico.

Medida del contenido de fenoles totales

Se diluyó a 10 ml una alícuota del extracto metanólico; mezclando el volumen de extracto con 2,5 ml de agua milliQ y haciéndola reaccionar con 0,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu durante 5 min a temperatura ambiente y aislada de la luz. En seguida, se agregaron 2 ml de Carbonato de Sodio al 10 %; se ajustó el volumen con agua milliQ y se agitó manualmente hasta conseguir la homogeneidad. La muestra se incubó por 90 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió la absorbancia a 700 nm usando agua milliQ como blanco y ácido gálico como estándar.

El contenido de fenoles totales fue reportado como microgramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en masa húmeda (μg EAG/g m.h.) que fue calculada por interpolación a partir de la curva estándar de ácido gálico (Fig. 1.4-1).

1.5. Métodos de análisis por HPLC para fenoles en extractos metanólicos de AOVE, hortalizas y en el agua de cocción.

1.5.1. Material.

- **Muestras.**

Se evaluaron un total de 144 muestras, 36 correspondieron a los experimentos de cada una de las 4 hortalizas. Cada bloque consistió en 12 muestras de extractos de aceites y 36 de extractos de hortalizas; en ambos casos tanto crudos como procesados con las diferentes técnicas de elaboración culinaria. El resto de muestras (nueve) fueron porciones del agua cruda y procesada durante los ensayos

- **Reactivos.**

En la Tabla 1.5-1 se detallan todos los reactivos empleados en la identificación y cuantificación de fenoles en los extractos y muestras de agua por HPLC.

Tabla 1.5-1. Reactivos utilizados en las identificación y cuantificación de fenoles en los extractos y muestras de agua por HPLC.

Nombre	Marca
Estándares de referencia	
Ácido gálico	Sigma, Alemania
Hidroxitirosol	Síntesis propia
Tirosol (2-(4-hydroxyfenyl)etanol)	Fluka, Suiza
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	Fluka, Suiza
Acido <i>p</i> -Hidroxibenzóico	Sigma, USA
Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	Sigma, Inglaterra
Ácido clorogénico	Fluka, Suiza
Ácido caféico	Fluka, Suiza
Ácido vanílico (ácido 4-Hidroxi-3-metoxibenzoico)	Sigma, USA
Ácido siríngico	Fluka, Suiza
Ácido <i>p</i> -cumárico	Fluka, Suiza
<i>o</i> -vanillina (2-Hidroxi- <i>m</i> -anisaldeido; 2-Hidroxi-3-metoxi benzaldeido)	Fluka, Suiza
Ácido <i>o</i> -cumárico	Fluka, Suiza
Oleoeuropeína	Extrasynthèse, Francia
Pinorresinol	Sigma, Alemania
Rutina trihidratada	HWI Analytik GMBH pharma solutions, Alemania
Quercetina (3,3',4',5,7-didhidrato de pentahidroxiflavona)	Sigma-Aldrich, Alemania
Luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona)	Sigma, Alemania
Apigenina (4'5,7-trihidroxiflavona)	Sigma, Alemania
Ácido ferúlico	Fluka, Suiza
Reactivos HPLC	
Metanol	Panreac (Barcelona, España)
Agua bidestilada desionizada	Sistema Milli-Q de Millipore. Modelo R015 (Millipore, Gif Sur Yvette, Francia)
Ácido ortofosfórico (H ₃ PO ₄)	Panreac (Barcelona, España)

- **Instrumentación.**

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficacia Varian, Pro Star equipado con inyector automático, bomba binaria, detector UV y software System Control-Konik HPLC. Empleando una columna HPLC Tracer Extrasil ODS2 5 μm , 15 x 0.4 cm Teknokroma[®] (Barcelona, España).

- **Instrumentación y material de laboratorio.**

- Material de vidrio de calidad contrastada, necesario para volumetría.
- Unidades de filtración para jeringa Millipore, Millex,-GN, con membrana de Nylon para remoción de partículas finas.
- Filtros de uso único Osmonics inc, Magna, 0.45 micron, 47mm, 100/PK.
- Inserto Kimble Chromatography KG33, 0.25 l, 6mm, Scharlau (Barcelona, España).
- Viales automuestrador 12x32mm, 1.8 ml Kimble K633. Scharlau.
- Mocupipetas Transferpette[®], de 100, 200,500 y 1000 μl , Brand, (Alemania).
- Pipetas Pasteur 2ml, 150mm Pobel (Madrid, España).
- Balanza de precisión de sensibilidad de 0,1 miligramo, Mettler mod. AE-200 (Mettler, Toledo).
- Ultrasonido Ultrasons, J. P. Selecta. E.U.A.

En la Tabla 1.5-1 aparecen recogidos los estándares de referencia utilizados en el análisis de la fracción fenólica.

1.5.2. Método cromatográfico por HPLC.

Fundamento

Diversos compuestos antioxidantes naturales son fuertemente polares, requiriendo fases móviles muy acuosas para su separación exitosa. Por otra parte, algunos flavonoides son más bien no polares por lo que son necesarias fases móviles con una mayor concentración de modificadores orgánicos para llevar a cabo la elución. La mayoría de compuestos fenólicos son ácidos débiles, los cuales están más o menos disociados en las fases móviles dependiendo de su estructura, y en menor proporción, de la concentración de los solventes orgánicos en la fase móvil.

La retención en la HPLC en fase reversa generalmente disminuye con una mayor concentración y una baja polaridad del modificador orgánico en la fase móvil acuosa-orgánica, y con la mayor polaridad y grado de disociación de los analitos. Para mejorar la separación de compuestos con polaridades muy diferentes en una sola determinación, con frecuencia se usa un gradiente de elución con incrementos progresivos del modificador orgánico (Jandera, 2009)

El metanol es el solvente (modificador orgánico) empleado mayoritariamente en la fase móvil, es recomendado por muchos autores (Nierenberg et al., 1985; Epler et al., 1992), en comparación con el Acetonitrilo, que puede prolongar el tiempo de retención e incrementar la duración del análisis (Escrivá et al., 2002), al igual que el butanol, que permite conseguir la retención deseada e incremento en la solubilidad y selectividad frente a disolventes como el Cloroformo, Tetrahidrofurano y Acetato de Etilo.

Se identificó y analizó el contenido de fenoles presentes en los extractos de aceites y hortalizas y en las porciones de agua tanto crudos como procesados con las diferentes técnicas de elaboración culinaria de las cuatro hortalizas estudiadas mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) que presenta una mayor especificidad que los métodos colorimétricos y fluorimétricos (Gimeno et al., 2000). Los ácidos fenólicos, los polifenoles y sus formas glicosídicas y de agliconas son casi exclusivamente separadas por medio de HPLC en su modalidad de fase reversa (Jandera, 2009).

Condiciones Cromatográficas

Se empleó el método descrito por Escarpa-González (2002) con algunas modificaciones en el gradiente de solventes y la duración total de la prueba. En este método se utiliza una técnica de HPLC en fase reversa para el análisis de los fenoles más representativos de diferentes fuentes alimentarias.

La inclusión simultánea de estándares de compuestos fenólicos, compuestos fenólicos aislados de fuentes alimentarias y extractos reales representativos como última prueba en el análisis, permitió establecer un gradiente líquido único para la investigación de fenoles en muestras de diferentes fuentes alimentarias (Escarpa-González, 2002).

La inyección de la muestra una vez filtrada se hizo directamente.

Las fases móviles empleadas fueron:

A: Metanol B: Ácido orfosfórico (0,01 M)

Al emplear altas presiones es imprescindible evitar la presencia de partículas que puedan obstruir los caños y la formación de burbujas que puedan deteriorar el relleno de las columnas y que produzcan inestabilidad en la señal del detector (McNair et al., 1973). Para evitarlo, los solventes y las muestras a inyectar se filtraron y degasificaron al vacío, manteniéndolas en estas condiciones durante el tiempo de análisis. Se hizo siempre una inyección de 5 µl. El gradiente de elución se muestra en la Tabla 1.5-2.

El flujo de elución fue de 1.0 ml/min y la columna cromatográfica se mantuvo a temperatura ambiente (25-28°C).

Existe un control de la temperatura para evitar oscilaciones en la medida de la línea base y para obtener tiempos de retención constantes. La duración de cada análisis fue de 60 minutos. Los análisis se realizaron por duplicado, y la zona de longitud de onda estudiada ha sido a 280 nm (Escarpa and González, 2002), Careri y col. (1999) afirmaron que es en esta longitud de onda en donde los ácidos fenólicos y las flavanonas despliegan la máxima absorción y con ello se maximiza la sensibilidad de detección (Jandera, 2009).

Tabla 1.5-2. Gradiente de elución para la identificación y cuantificación de fenoles.

Tiempo (min)	Paso	Flujo (ml/min)	% Solvente A	% Solvente B
0	0	1	95	5
25	1	1	60	40
40	2	1	50	50
45	3	1	30	70
55	4	1	20	80
60	5	1	0	100

identificación y Cuantificación de Fenoles

Se preparó una disolución patrón de 1 mg/ml de cada uno de los estándares, empleando como disolvente Metanol, y se almacenó a temperatura de congelación a -20°C , en botes adecuados para evitar las posibles alteraciones.

La identificación de cada compuesto fenólico se realizó mediante la comparación del espectro del compuesto y del patrón correspondiente, y por contraste en el tiempo de retención. Se realizó además, la adición de los patrones a varias muestras problema, para comprobar el aumento de área de los picos cromatográficos. La cuantificación de un compuesto determinado en una muestra se hace en función de la señal de área que da dicho compuesto a la longitud de onda correspondiente a su máximo de absorbancia en el cromatograma.

En el presente trabajo se empleó la técnica del estándar externo. Para cada fenol se prepararon soluciones madre (1 mg/ml) y a partir de ellas, se diluyeron en metanol disoluciones de concentraciones menores y crecientes a fin de construir las correspondientes curvas de calibrado para el componente a cuantificar (Fig. 1.5-1). La Figura 1.5-1 es un ejemplo de la recta de calibración obtenida para el ácido gálico, después de inyectar en el HPLC las disoluciones obtenidas a partir de la solución madre.

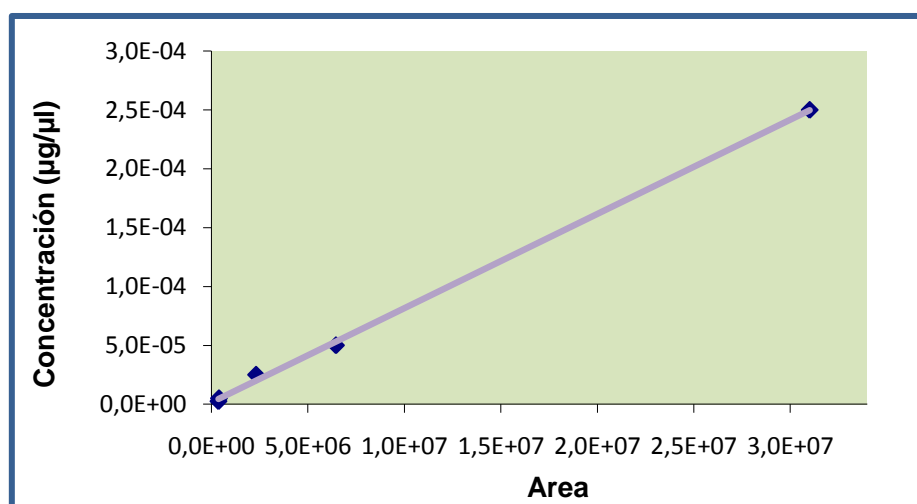


Figura 1.5-1. Ejemplo de la curva de calibrado del patrón de ácido gálico.

El principio de esta técnica es que la concentración de un producto es proporcional al área del pico cromatográfico correspondiente. A partir de las correspondientes ecuaciones de las rectas obtenidas para cada fenol (Tabla 1.5-3) se procede a cuantificar el compuesto anteriormente identificado.

Tabla 1.5-3. Ecuaciones de regresión de las rectas de calibrado, límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

Compuesto	Concentración (ppm)	Ecuación*	Coefficiente de correlación (r^2)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	Recuperación (%)
Ácido gálico	0,5-250	$y = 642659 x + 88669$	0,999	5×10^{-2}	0,01	96,36
Hidroxitirosol	0,5-250	$y = 220783 x - 619118$	0,997	6×10^{-3}	0,03	98,11
Dihidroxibenzóico	0,5-250	$y = 313665 x - 787896$	0,994	2×10^{-2}	0,05	99,87
Tirosol	0,5-250	$y = 76673 x - 219003$	0,997	6×10^{-3}	0,05	97,45
Ácido hidroxifenilacético	0,5-250	$y = 120118 x - 502152$	0,995	2×10^{-2}	0,1	96,43
Ácido hidroxibenzóico	0,5-250	$y = 314814 x - 251369$	0,999	2×10^{-2}	0,02	97,43
Ácido clorogénico	0,5-250	$y = 363369 x - 492718$	0,997	5×10^{-3}	0,03	100,03
Ácido vanillico	0,5-250	$y = 422480 x - 988891$	0,99	3×10^{-3}	0,06	99,43
Ácido caféico	0,5-250	$y = 637289 x - 10^6$	0,999	2×10^{-2}	0,01	98,12
Ácido siríngico	5-100	$y = 300780 x - 10^6$	0,996	0,3	0,01	96,45
Ácido p-cumárico	1- 250	$y = 859813 x - 10^6$	0,996	6×10^{-3}	0,03	98,45
o-vanillina	0,5-250	$y = 156614 x - 346301$	0,999	5×10^{-3}	0,05	97,99
o-cumárico	0,5-250	$y = 769246 x - 4 \times 10^6$	0,999	1×10^{-3}	0,01	98,65
Oleoeuropeína	0,5-250	$y = 34917 x + 67875$	0,999	6×10^{-3}	0,05	100,62
Rutina	0,5-250	$y = 94055 x - 199773$	0,999	1×10^{-3}	0,02	96,54
Luteolina	0,5-250	$y = 308028 x - 702392$	0,996	3×10^{-3}	0,05	98,34
Apigenina	0,5-250	$y = 321407 x - 3 \times 10^6$	0,996	4×10^{-3}	0,02	99,31
Pinorresinol	0,5-250	$y = 128457x - 579875$	0,995	6×10^{-3}	0,05	96,43

^a $y = ax + b$, y = concentración del compuesto expresada en mg/ μ L, x = área

1.6. Métodos para evaluar la actividad antioxidante en extractos metanólicos de AOVE y hortalizas y en el agua de cocción.

1.6.1. Material.

- **Muestras.**

Se evaluaron un total de 144 muestras; 36 correspondieron a los experimentos de cada una de las 4 hortalizas. Cada bloque (patata, calabaza, berenjena y tomate) consistió en 12 muestras de extractos de aceites y 15 de extractos de hortalizas; en ambos casos tanto crudos como procesados con las diferentes técnicas de elaboración culinaria. El resto de muestras (9) fueron porciones del agua cruda y procesada durante los ensayos.

- **Reactivos.**

Los reactivos utilizados en la cuantificación de la capacidad antioxidante por los métodos DPPH, ABT, FRAP y DMPD se listan a continuación (Tabla 1.6-1).

- **Instrumentación.**

Las medidas se realizaron con lector de placas Marca BMG Labtech, FLUOstar Omega. Con el programa Omega Control y MARS Data Analysis Software. Empleando placas microtiter de 96 pocillos (350 µl).

- **Instrumentación y Material de Laboratorio.**

- Micropipetas de 2-20, 50-100, 100-1000 y 1000 a 5000 µl.
- Matraces aforados de 10, 5 y 1 ml.
- Agitador vortex (Ovan).
- Viales Ependorf 1,5 ml bv.
- Balanza de precisión (sensibilidad 0,1 mg), Mettler mod. AE-200 (Mettler, Toledo).

Tabla 1.6-1. Reactivos utilizados en las determinaciones de la capacidad antioxidante por los métodos DPPH, ABTS, FRAP y DMPD.

Reactivo	Marca
Estándares de referencia	
Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)	Aldrich, Alemania
Reactivos	
DPPH	
Carbonato de sodio	Panreac
Acido gálico	Sigma
Metanol HPLC	Panreac
2,2-Difenil-1-Picryl hidrazil (DPPH)	Aldrich
ABTS	
Etanol absoluto HPLC	Panreac
Sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfónico)	Sigma
Ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic (Trolox)	Aldrich
FRAP	
Acetato de Sodio trihidratado	Panreac, España
Acido acético glacial	Panreac, España
TPTZ (2,4,6-tris(2 -piridil)-S-triazina)	Fluka, Suiza
Acido clorhídrico	Panreac, España
Cloruro férrico hexahidratado	Panreac, España
Metanol HPLC	Panreac, España
DMPD	
Acetato de sodio anhidro	Panreac, España
Acido acético glacial	Panreac, España
DMPD (dicloruro de 4-amino-N,N-dimetil fenilenediamina)	Sigma, Suiza
Cloruro férrico anhidro	Panreac, Sintesis. España

- **Expresión de los resultados.**

Los métodos que miden la capacidad antioxidante, y emplean el valor de capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) al expresar sus resultados se basan en la habilidad de las moléculas antioxidantes para captar un radical (Pellegrini et al., 2003). En los métodos ABTS, DPPH, FRAP y DMPD la capacidad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición y a partir de este dato se calculó la TEAC, que se define, como la concentración Trolox que tiene la misma actividad antioxidante que una concentración 1 mM de la sustancia a ensayar (Pellegrini et al., 1999; 2001). El Trolox es un análogo hidrosoluble de la vitamina E, se usa como estándar antioxidante por ser soluble en fases acuosas y orgánicas (Arnao et al., 2001a).

El ensayo de la decoloración de TEAC se utiliza para la evaluación de la actividad antioxidante de compuestos puros, mezclas de antioxidantes, muestras complejas tales como plantas medicinales, plasma de sangre y tejido orgánico, alimentos y bebidas (Ivekovic et al., 2005).

Para todos los métodos, se determinó la curva de calibrado en cada placa representando distintas concentraciones de Trolox frente a las variaciones de absorbancia del radical correspondiente, obteniendo así regresiones lineales (Figs. 1.6-1, -2, -3 y -4).

El valor Trolox de los extractos de la muestra se calculó una vez que se consiguió el estado de equilibrio en la reacción del ABTS, DPPH, FRAP y DMPD, estableciendo en primer lugar, el porcentaje de inhibición de la absorbancia con la ecuación (1). El valor del porcentaje de inhibición se interpoló en las curvas de calibración respectivas para obtener la cantidad de antioxidante (Trolox) que provoca una inhibición equivalente a la de la muestra problema. Con la ecuación (2) se calculó la capacidad antioxidante como TEAC; y enseguida la capacidad antioxidante total de la muestra en masa fresca.

$$(1) \quad \% \text{ Inhibición} = \frac{Abs_i - Abs_f}{Abs_{is}} \times 100$$

$$(2) \quad CA = \text{Inhibición} \times fd \times 1000$$

En donde:

Inhibición Inhibición de la oxidación del radical DPPH' (%)

Abs_i Absorbancia inicial a 515 nm de la solución metanólica de Trolox a 60 s.

Abs_f Absorbancia final a 515 nm de la solución metanólica de Trolox con la muestra a los 15 minutos de reacción.

CA Capacidad antioxidante de la muestra (TEAC en mmol Trolox/l; TAA en $\mu\text{mol/g m.h.}$).

fd Factor de dilución del extracto metanólico

El valor TEAC se expresó en mmol Trolox/l y la capacidad antioxidante total (CA) en $\mu\text{mol Eq. Trolox/g m.h.}$

Revisar unidades en ABTS y DMPD

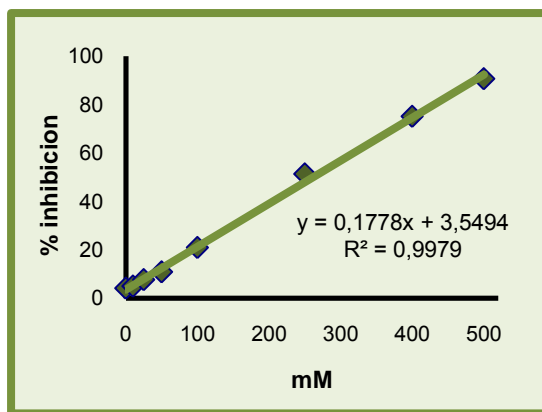


Figura 1.6-1. Recta de calibrado del Trolox. Método ABTS.

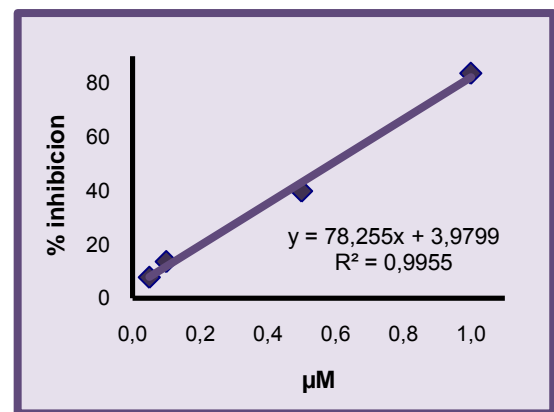


Figura 1.6-2. Recta de calibrado del Trolox. Método DPPH.

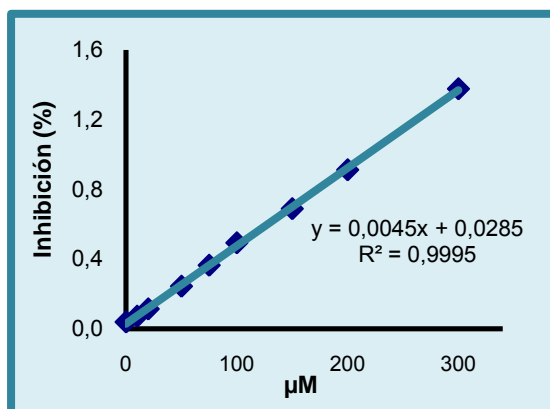


Figura 1.6-3. Recta de calibrado del Trolox. Método FRAP.

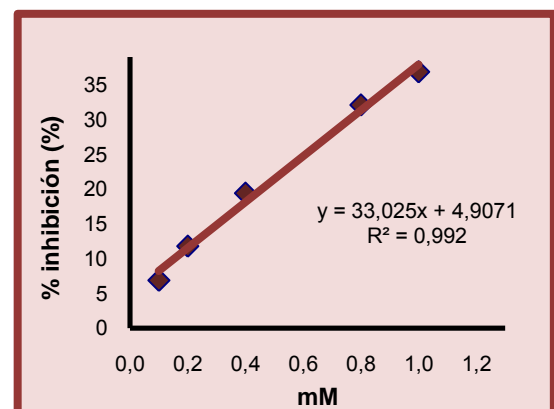


Figura 1.6-4. Recta de Calibrado del Trolox. Método DMPD.

1.6.2. Métodos.

- **Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).**

Fundamento

Se evalúa la actividad antioxidante de los extractos y del agua a través de un radical coloreado, el DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), disuelto en solución metanólica. Se siguió como referencia el método descrito por Brand-Williams y col. con algunas modificaciones, evaluando la actividad antioxidante total de una muestra o un patrón por la disminución de la absorbancia del radical a 515 nm, que es proporcional a los compuestos antioxidantes que contiene la muestra o patrón empleado (Brand-Williams et al., 1995).

El radical DPPH[•] tiene un máximo de absorción a 515 nm, pero dicha absorción desaparece en presencia de un antioxidante (AH) (Fig. 1.6-5) ó un radical (R[•]):

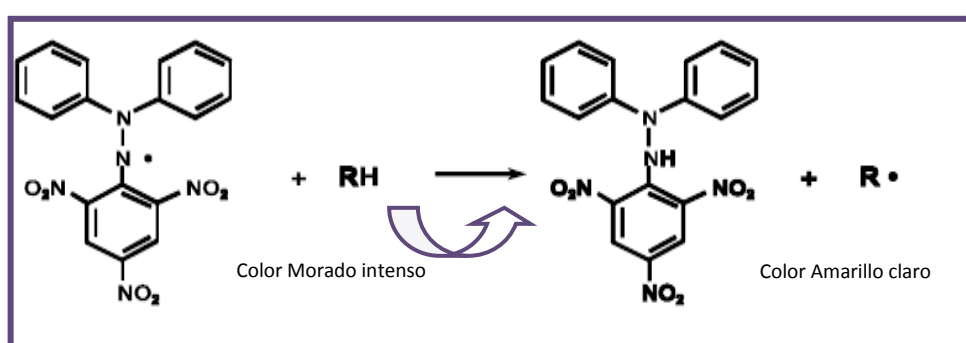
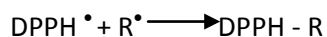


Figura 1.6-5. Reacción del antioxidante con el radical DPPH[•]

Se realiza una medida continua de la absorbancia hasta que alcanza valores prácticamente constantes, lo que indica que la reacción ha llegado al equilibrio (Lavelli 2002). El DPPH[•] ya se comercializa como radical estable.

Preparación de los reactivos

- Solución metanólica 0.06 mM de DPPH. 2.3 mg de DPPH[•] fueron aforados a 100 ml con metanol (Brand-Williams et al., 1995). El radical así preparado es estable durante 12 h a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se comercializa ya estable, lo que facilita su preparación en el momento del análisis. A pesar de lo expuesto, en cada elaboración se hizo un espectro de absorción del radical entre 400 y 900 nm para corroborar el pico de máxima absorción a 515 nm. Solución madre de Trolox. Se preparó una disolución madre de 2 mM a partir de la que se hicieron disoluciones de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 y 2 mM en metanol.

Para elaborar la curva estándar (Fig. 1.6-2) referida al porcentaje de inhibición respecto a las diferentes concentraciones de Trolox, se tomó el dato de la absorbancia de un volumen de 280 μ l de disolución de DPPH (0.06 mM) con 20 μ l de la solución patrón de Trolox con la concentración 0 (Fig. 1.6-6). Al valor de absorbancia referido se le restaron los valores de la absorbancia de volúmenes idénticos de solución de DPPH al que se les añadieron 20 μ l de las diferentes concentraciones de Trolox tras los 15 minutos de reacción, momento en que se alcanzó el equilibrio (Fig. 1.6-7), se obtuvo así el porcentaje de inhibición y con él la capacidad antioxidante total expresada como TEAC.

Procedimiento

En las primeras dos filas de la placa microtiter fueron depositados 20 μ l de soluciones de trolox de concentraciones crecientes por duplicado para obtener la curva estándar. En el resto de pocillos se analizaron las muestras, para lo que fue agregado el mismo volumen de muestra del extracto adecuadamente diluido en metanol (1:2, 1:5, 1:10, 1:20).

Una vez que fue preparada la placa, se determinaron los cambios en la absorbancia en el lector de placas programado con las siguientes condiciones: inyección de un volumen de reactivo de 280 μ l, seguido de un periodo de agitación y la posterior lectura a 515 nm en 43 ciclos distribuidos en un tiempo de 15 minutos momento en el que finalizó la reacción y la gráfica del descenso de la absorbancia contra el tiempo formó de una meseta (Fig. 1.6-7).

Con el valor de absorbancia obtenido una vez que transcurrió el tiempo de reacción se hicieron los cálculos pertinentes para determinar el porcentaje de inhibición y la capacidad antioxidante total por interpolación a partir de la curva de calibración de Trolox. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

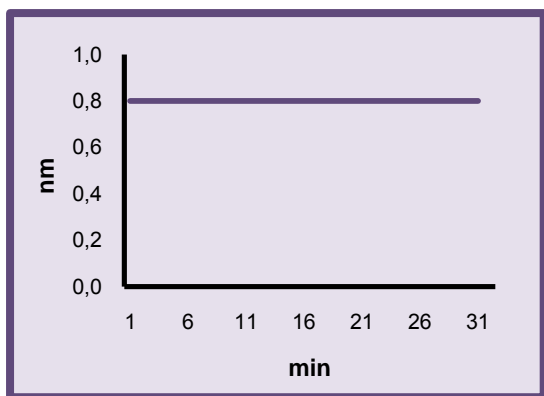


Figura 1.6-6. Medida de la absorbancia del radical DPPH.

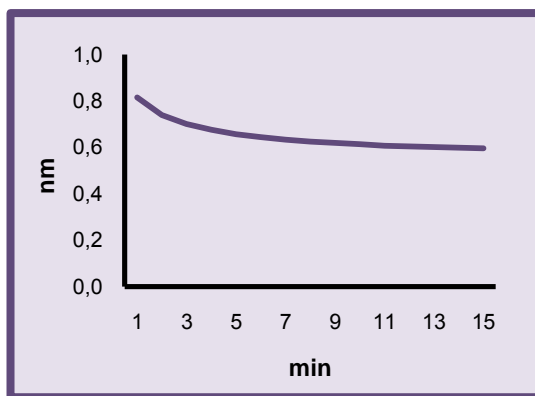


Figura 1.6-7. Medida de la absorbancia en el ensayo con radical DPPH y extracto.

- **Método ABTS (Ácido 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)).**

Fundamento

La capacidad antioxidante de una sustancia se puede medir por la habilidad de capturar el radical sintético ABTS^{•+}, compuesto cromóforo muy estable, soluble en agua y con un máximo de absorción a 340 nm. Los compuestos antioxidantes suprimen su absorbancia en un grado y una duración dependiente de su capacidad.

El radical catiónico es de color verde-azulado, con un espectro de absorción en el intervalo ultravioleta-visible (Pellegrini et al., 1999) al añadir la sustancia antioxidante, la concentración del radical disminuye y se puede medir el descenso de absorbancia producido (Fig. 1.6-8). Se emplea un ensayo de “post-adición”; es decir, se forma el radical en ausencia de la muestra a analizar hasta obtener una absorbancia estable para evitar que los componentes de muestra puedan reaccionar con los reactivos lo que conllevaría una sobreestimación de la capacidad antioxidante (Cano et al., 1998; Prior et al., 2005).

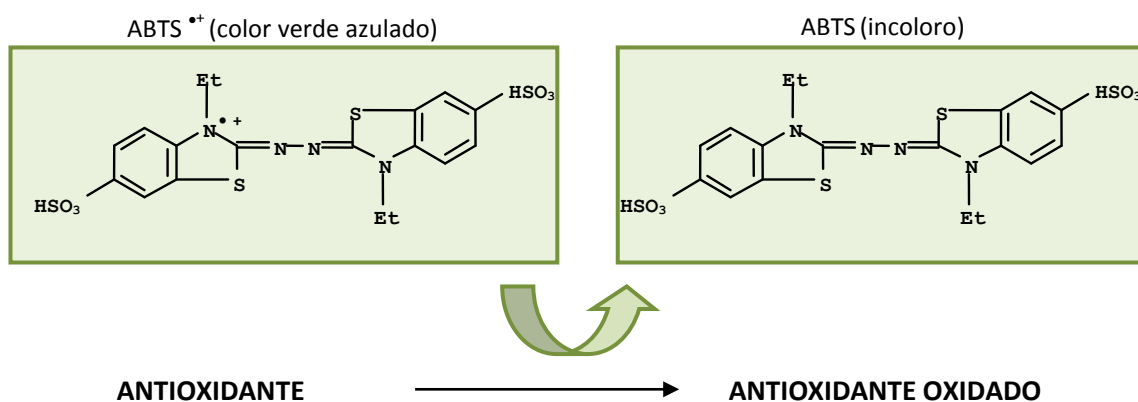


Figura 1.6-8. Reacción del antioxidante con el radical ABTS^{•+}

Preparación de los reactivos

- Disolución de ABTS: Se pesaron 0.096 g de sal amónica cristalizada de ABTS y se aforan a 25 ml con agua desionizada, obteniendo así una concentración final de 7 mM ABTS en solución acuosa.
- Disolución de persulfato potásico: para conseguir una concentración final de 140 mM se pesaron 0,945 g de $K_2S_2O_8$ y se aforan a 25 ml con agua desionizada.
- Preparación del radical $ABTS^{\bullet+}$: Se hizo reaccionar el ABTS y el persulfato potásico. Se partió de un volumen de 25 ml de 7 mM de ABTS y de 88 μ l de 140 mM de $K_2S_2O_8$, la reacción estequiométrica es de 1:0.5, la oxidación del ABTS es inmediata, pero la absorbancia máxima y estable no se alcanza hasta las 6 horas. La mezcla se mantuvo en oscuridad de 12 a 16 h a temperatura ambiente. El radical catiónico es estable durante 2 días almacenado en oscuridad. La solución se diluyó en etanol (1:150), hasta que su absorbancia fuera de 0.70 ± 2 a 734 nm.
- Solución madre de Trolox. Se preparó una disolución madre de 5 mM de Trolox en etanol a partir de la que se hicieron disoluciones de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,4 y 0,5 mM en etanol.

Para elaborar la curva estándar (Fig. 1.6-1) referida al porcentaje de inhibición respecto a las diferentes concentraciones de Trolox. Se tomó el dato de la absorbancia de un volumen de 300 μ l de disolución de ABTS (1:100) con 15 μ l de la solución patrón de Trolox con la concentración 0 (Fig. 1.6-9). Al valor de absorbancia referido se le restaron los valores de la absorbancia tras los 30 min de reacción de volúmenes idénticos de solución de ABTS al que se le añadieron 15 μ l de las diferentes concentraciones de Trolox, momento en que se alcanzó el equilibrio (Fig. 1.6-10); se obtuvo así el porcentaje de inhibición y con él la capacidad antioxidante total expresada como TEAC

Procedimiento

Se ensayaron distintas diluciones de los extractos de cada ensayo buscando la linealidad de la respuesta. La muestra se diluyó para satisfacer que la concentración de antioxidantes en la muestra diluida fuera tal que se encontrara dentro de un intervalo de respuesta lineal.

En las primeras dos filas de la placa microtiter se depositaron por duplicado 15 μ l de cada una de las soluciones de Trolox de la curva estándar. En el resto de pocillos se analizaron las muestras de extractos, para lo que fue agregado el mismo volumen de muestra del extracto adecuadamente diluido en etanol (1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50).

Una vez que fue preparada la placa, se hicieron determinaciones consecutivas del incremento de absorbancia en el lector de placas programado con las siguientes condiciones: inyección de un volumen de reactivo de 300 μ l, seguido de un periodo de agitación y la posterior lectura a 734 nm en 16 ciclos distribuidos en un tiempo de 30 minutos momento en el que finalizó la reacción y la gráfica del descenso de la absorbancia contra el tiempo formó de una meseta (Fig. 1.6-10) (Pellegrini et al., 1999; 2001; Villaño et al, 2004).

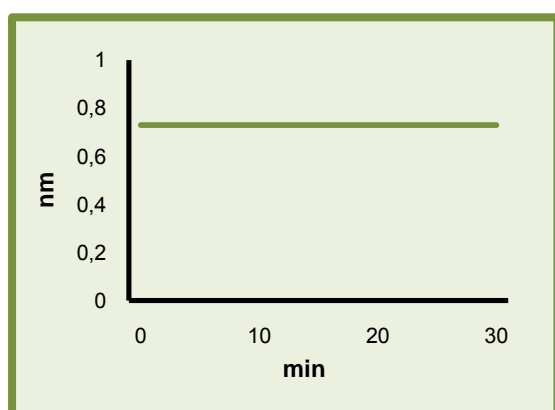


Figura 1.6-9. Medida de la absorbancia del radical ABTS.

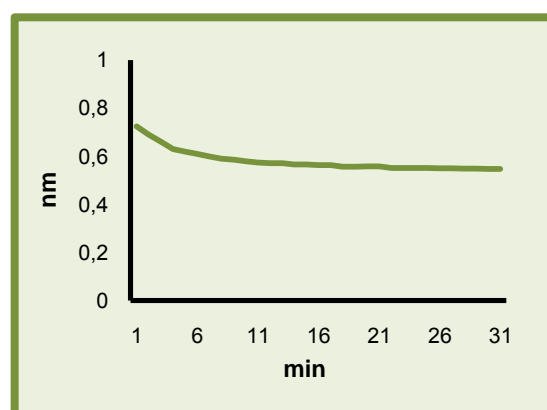


Figura 1.6-10. Medida de la absorbancia en el ensayo con radical ABTS y extracto.

Con la lectura de absorbancia obtenida al minuto 30 se calculó el porcentaje de reducción en la concentración del radical; esta reducción se cuantificó por interpolación de los valores de absorbancia en la curva de calibrado que relaciona el porcentaje de pérdida de absorbancia y la concentración del antioxidante de referencia (Trolox). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

- **Método FRAP (2,4,6-tripiridil-S-triazina).**

Fundamento

Este método mide la habilidad del hierro como agente reductor a pH básico del complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe^{3+} - TPTZ) a la forma ferrosa (Fe^{2+} - TPTZ) desarrollando una intensa coloración azul. La variación de la absorbancia a 593 nm está directamente correlacionada con la potencia de reducción del antioxidante donador de electrones presente en la reacción (Benzie and Strain, 1996)

Preparación de los reactivos

- Tampón acetato 0,3 M pH=3,6. Se diluyeron 2,4609 g de acetato de sodio trihidratado en un matraz de 100 ml con agua desionizada. El pH se ajustó a 3,6 con ácido acético glacial.
- TPTZ (2, 4, 6 – tripiridil-S-triazina) 10 mM en HCl 40 mM. Se aforaron 0,03123 g de TPTZ y se aforaron a 10 ml con solución de HCl 40 mM. Para la preparación del HCl 40mM se diluyeron 333 μl de HCl 37 % v/v en 100 ml de agua desionizada.
- Cloruro férrico hexahidratado 20mM. Se pesaron 54,06 mg y se aforaron a 10 ml con agua desionizada.

Preparación del radical

- El radical fue elaborado al momento del análisis mezclando el tampón acetato, la solución de TPTZ y el cloruro férrico en proporción 10:1:1.
- Solución madre de Trolox. Se preparó una disolución madre 2 mM de Trolox en metanol para hacer disoluciones de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,4 y 0,5 mM. La elaboración de la curva estándar (Fig. 1.6-3) del porcentaje de inhibición respecto a las concentraciones de Trolox se realizó con el dato de la absorbancia de un volumen de 225 μl de disolución de FRAP con 30 μl de la solución patrón de Trolox con la concentración 0 (Fig 1.6-11). Al valor de absorbancia referido se le restaron los valores de la absorbancia de volúmenes idénticos de la solución de FRAP tras 10 minutos de reacción con los 30 μl de las disoluciones de Trolox, momento en que se alcanzó el equilibrio (Fig. 1.6-12); así se obtuvo el porcentaje de inhibición y con él se calculó la capacidad antioxidante total.

Procedimiento

En las primeras dos filas de la placa microtiter se depositaron por duplicado 30 μ l de soluciones de Trolox de concentraciones crecientes para obtener la curva estándar. En el resto de pocillos se depositó el mismo volumen de las muestras de extractos adecuadamente diluidas en metanol (1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50; 1:100).

Una vez que fue preparada la placa, se cuantificó la absorbancia en el lector de placas programado con las siguientes condiciones: inyección de un volumen de reactivo FRAP de 225 μ l, seguido de un periodo de agitación y la posterior lectura a 593 nm en 23 ciclos distribuidos en un tiempo de 10 min momento en el que finalizó la reacción y la gráfica del incremento de la absorbancia contra el tiempo, formó una meseta (Fig. 16.12).

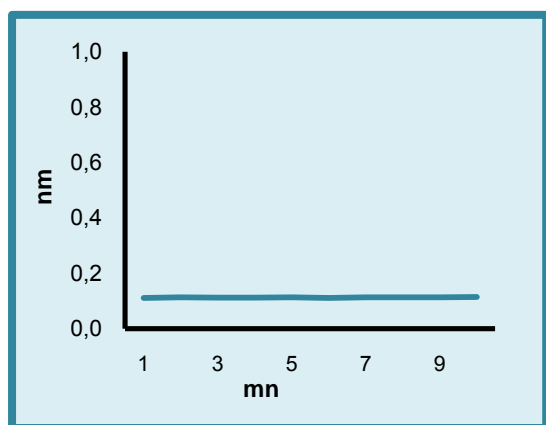


Figura 1.6-11. Medida de la absorbancia del radical FRAP.

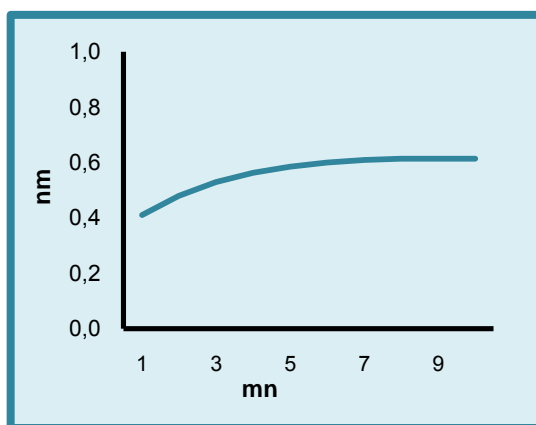


Figura 1.6-12. Medida de la absorbancia en el ensayo con radical FRAP y extracto.

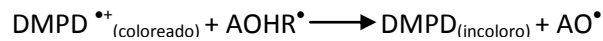
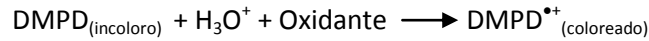
Con el valor de absorbancia obtenido una vez que transcurrió el tiempo de reacción se hicieron los cálculos pertinentes para determinar el porcentaje de inhibición y la capacidad antioxidante total por interpolación a partir de la curva de calibración de Trolox. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

- **Método DMPD (dicloruro de 4-amino-N,N-dimetil fenilendediamina).**

Fundamento

Se basa en la utilización del cromógeno dicloruro de 4-amino-N,N-dimetilfenilendediamina, denominado por las siglas DMPD, compuesto que no presenta absorción espectrofotométrica en el campo del visible, mientras que en ambiente ácido y en presencia de un oxidante disponible adquiere una intensa coloración rosa. El DMPD forma en ese caso un radical catiónico estable

fuertemente coloreado que presenta un pico de absorbancia máximo a 505 nm. Los compuestos antioxidantes son capaces de transferir un átomo de hidrógeno al radical produciendo una decoloración de la solución y una caída de la absorbancia proporcional a la concentración (Fogliano et al., 1999).



Preparación de los reactivos

- Tampon acetato 0,1 M pH=5,25. Se pesaron 0,8203 g de acetato de sodio anhidro y se aforaron a 100 ml con agua desionizada. El pH se ajustó a 5,25 con ácido acético glacial.
- DMPD 100 mM. Se pesaron 209 mg de DMPD y se aforaron a 10 ml con agua desionizada.
- Cloruro férrico 0,05 M. Se pesaron 811 mg de cloruro férrico anhidro y se aforaron en 100 ml de agua desionizada.

Preparación del radical

- El orden de adición de los reactivos fue: tampón – DMPD – FeCl₃. A 8 ml de tampón se les agregaron 100 µl de DMPD y 20 µl de solución de cloruro férrico. Se llevó a un volumen final de 10 ml con tampón. Para un desarrollo homogéneo de la coloración, el preparado fue conservado a 4 °C durante 10 minutos. La concentración 1 mM del radical debe mostrar una absorbancia entre 0,8 a 1 u.a. a 505 nm.
- Solución madre de Trolox. Se preparó una disolución madre de 4mM de Trolox en metanol a partir de la que se hicieron disoluciones de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1 y 1,5 mM en metanol. Para elaborar la curva estándar (Fig. 1.6-4) del porcentaje de inhibición respecto a la concentración de Trolox, se tomó el dato de la absorbancia de un volumen de 300 µl de disolución de DMPD con 15 µl de la solución con la concentración 0 (Fig 1.6-13). Al valor de absorbancia referido se le restó la absorbancia de volúmenes idénticos de DMPD con 15 µl de las disoluciones de Trolox tras 10 minutos de reacción, momento en que se alcanzó el equilibrio (Fig. 1.6-14). Así se obtuvo el porcentaje de inhibición.

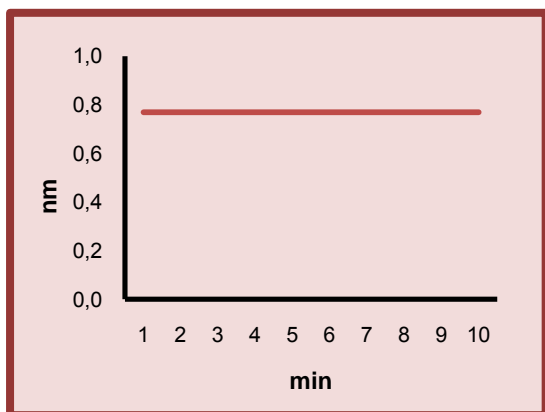


Figura 1.6-13. Medida de la absorbancia del radical DMPD.

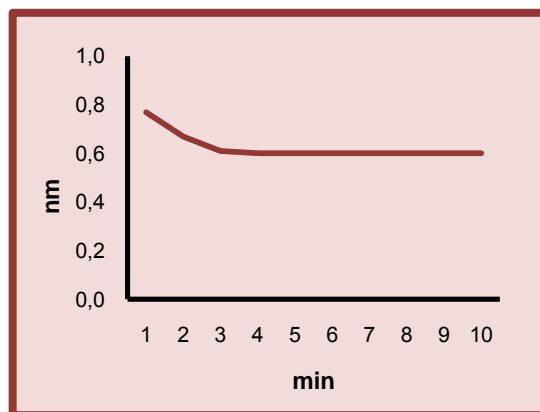


Figura 1.6-14. Medida de la absorbancia en el ensayo con radical DMPD y extracto.

Procedimiento

En las primeras dos filas de la placa microtiter se depositaron 15 μ l de soluciones de Trolox de concentraciones crecientes por duplicado para obtener la curva estándar. En el resto de pocillos se analizaron las muestras, agregando el mismo volumen de muestra del extracto adecuadamente diluido en agua (1:2, 1:5, 1:10, 1:20).

Una vez que fue preparada la placa, se determinó la CA por el método DMPD en el lector de placas programado con las siguientes condiciones: inyección de un volumen de reactivo de 300 μ l, seguido de un periodo de agitación y la posterior lectura a 505 nm en 8 ciclos distribuidos en un tiempo de 10 min, momento en que finalizó la reacción y la gráfica del descenso de la absorbancia contra el tiempo formó de una meseta (Fig. 1.6-14).

Con el valor de absorbancia obtenido una vez que transcurrió el tiempo de reacción se hicieron los cálculos pertinentes para determinar el porcentaje de inhibición y la capacidad antioxidante total por interpolación a partir de la curva de calibración de Trolox. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

1.7. Determinaciones complementarias en el aceite de oliva virgen extra crudo.

1.7.1. Material.

Muestras

El AOVE andaluz utilizado en los ensayos de las técnicas de culinarias de elaboración fue adquirido en una tienda de autoservicio local en presentación de un garrafón de 5 l. Para evitar la oxidación acelerada, el volumen de aceite fue distribuido en frascos de vidrio color ámbar con capacidad de 500 ml y la operación de cierre se hizo bajo una corriente de nitrógeno. Los frascos se mantuvieron cubiertos con papel aluminio y almacenados en refrigeración a 4°C.

Para asegurar que los parámetros químicos relacionados con la calidad oxidativa del aceite se mantenían dentro de los límites establecidos para el AOVE, se analizó el aceite de los frascos almacenados conforme eran utilizados en los experimentos. Los tiempos que permanecieron las muestras en almacenamiento hasta su análisis se muestran en la Tabla 1.7-1.

Antes de tomar la alícuota para cada determinación se estabilizó uno de los envases a temperatura ambiente y se agitó su contenido para homogeneizarlo. Todas las determinaciones que se describen a continuación se realizaron por triplicado.

Tabla 1.7-1. Tiempos de almacenamiento del aceite utilizado en los experimentos.

No. de muestreo	Tiempo de almacenamiento (días)
1	0
2	42
3	49
4	54
5	57

1.7.2. Métodos para la determinación del estado de oxidación del aceite.

- **Determinación de la acidez titulable del aceite de oliva virgen extra.**

El método utilizado fue el descrito en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas L248 del 5 de septiembre de 1991. Reglamento (CEE) No. 2568/91 de la comisión del 11 de julio de 1991. Modificado de acuerdo al Reglamento (CEE) No. 1989/2003 del 6 de noviembre de 2003. L295 del 13 de noviembre de 2003.

Reactivos

Fueron utilizados los siguientes reactivos de calidad analítica (Tabla 1.7-2):

Tabla 1.7-2. Reactivos utilizados para la determinación de la acidez titulable.

Nombre	Proveedor
Alcohol etílico (95 a 96 %)	Panreac
Éter dietílico	Panreac
Fenoltaleína	Panreac
Hidróxido de potasio	Panreac

Material y aparatos

- Material de vidrio de calidad contrastada, necesario para volumetría.
- Matracas Erlenmayer de 250 ml.
- Pipeta graduada de 25 ml.
- Bureta de 25 ml con graduación de 0.1 ml.

Fundamento

El grado de acidez se define como el porcentaje de ácidos grasos libres. Para su determinación, la muestra se disuelve en una mezcla de disolventes; y previamente a la valoración con una solución valorada de KOH se neutraliza la acidez propia del disolvente agregando unas gotas de hidróxido de potasio (KOH) hasta un ligero tinte rosa, esto con el fin de eliminar posibles interferencias (Fennema, 2000).

Preparación de los reactivos

- Disolución alcohólica de fenolftaleína 1 %. Se pesó 1 gr de fenolftaleína y se diluyó hasta 100 ml con alcohol etílico al 96 %.
- Mezcla de éter dietílico y etanol (1:1). Para cada muestra, al momento de la determinación, se mezclaron 25 ml de éter con 25 ml de alcohol y 3 ó 4 gotas de fenolftaleína (el éter dietílico es muy inflamable y puede formar peróxidos explosivos; debe utilizarse con precaución). La mezcla se neutralizó añadiendo gota a gota solución de KOH 0.1N hasta un color rosa tenue.
- Solución acuosa de hidróxido de potasio 0.1 N. Se pesó con precisión de 0.001 g la cantidad de hidróxido de potasio resultante de la expresión:

$$p = \frac{P.M. \times N_d \times V}{1000 \times rmin}$$

En donde:

p	Peso de hidróxido de potasio (g).
N_d	Normalidad deseada.
V	Volumen que se desea preparar (ml).
$rmin$	Riqueza mínima garantizada de KOH (tanto por uno).
$P.M.$	Peso molecular del KOH (g/Mol)

El KOH se disolvió en la mínima cantidad posible de agua destilada y enseguida se enrazó al volumen final deseado. La disolución preparada tiene una caducidad de 15 días y fue incolora, y se desechó si presentó color amarillento.

Procedimiento

En un Erlenmayer tarado se pesaron 10 g de aceite con precisión de centígramo se vertieron los 50 ml de mezcla alcohol/éter en el matraz que contenía el aceite y se agitó hasta la disolución total del aceite en la mezcla. Sin dejar de agitar, se valoró con la solución de hidróxido potásico 0.1 N, hasta el viraje del indicador (la coloración rosa de la fenolftaleína debió persistir al menos durante 10 s). Para una serie de determinaciones se efectuó el enrase de la bureta antes de cada ensayo.

El resultado que se expresó como porcentaje de ácido oleico, se calculó con la siguiente fórmula:

$$Acidez = \frac{V \times N_t \times 282}{10 \times p}$$

En donde:

V	Volumen de KOH 1 N gastados (ml).
N_t	Normalidad teórica de la solución de KOH.
282	Peso molecular del ácido en que se expresó el resultado (ácido oléico).
p	Peso de la muestra utilizada (gr)

- **Método para la Determinación del índice de peróxidos del AOVE.**

Material

El método utilizado fue el descrito en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas L248 del 5 de septiembre de 1991. Reglamento (CEE) No. 2568/91 de la comisión del 11 de julio de 1991. Modificado de acuerdo al Reglamento (CEE) No. 1989/2003 del 6 de noviembre de 2003 (L295 del 13 de noviembre de 2003).

Reactivos

A continuación se enumeran todos los reactivos de calidad analítica empleados en la determinación del índice de peróxidos en las muestras de AOV (Tabla 1.7-3):

Tabla 1.7-3. Reactivos utilizados para la determinación del índice de peróxidos.

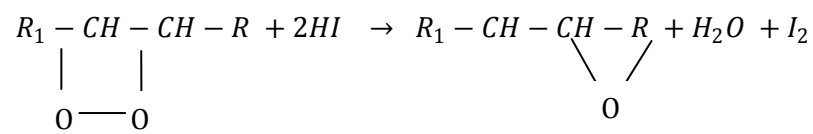
Nombre	Proveedor
Cloroformo	Panreac
Acido acético glacial	Panreac
Yoduro potásico	Panreac
Tiosulfato sódico pentahidratado	Panreac
Almidón soluble	Panreac

Material y aparatos

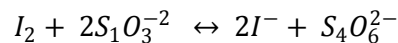
- Material de vidrio de calidad contrastada, necesario para volumetría.
- Matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapones de goma.
- Pipetas graduadas de 1, 10 y 25 ml.
- Bureta de 25 ml de capacidad con graduación de 0.1 ml.
- Balanza analítica con precisión de décimas de miligramo Metler AE200.

Fundamento

El aceite se disuelve en cloroformo y la adición de ácido acético glacial proporciona la acidez necesaria para la reacción base. Los peróxidos son productos primarios de oxidación; se originan por oxidación de los ácidos grasos con dobles enlaces, cuando existen en una muestra, oxidan al yoduro potásico (KI) en medio ácido de acuerdo a la siguiente reacción (Fennema, 2000):



El I_2 liberado es proporcional a los peróxidos existentes y se valora con $S_2O_3^{2-}$



El I_2 forma con el almidón un complejo azul oscuro que desaparece al pasar éste a I^- visualizándose así el punto final de la valoración.

Preparación de los reactivos

- Solución saturada de yoduro potásico. Se disolvió una cantidad de 10 g de KI en agua destilada recién hervida y se aforó a 100 ml.
- Disolución de tiosulfato sódico 0.01 N. Se pesó la cantidad calculada de tiosulfato sódico ($S_2O_3Na_2 \cdot 5H_2O$) resultante de la siguiente expresión:

$$p = \frac{P.M. \times N_d \times V}{1000 \times rmin}$$

En donde:

p	Peso de tiosulfato sódico (g).
N_d	Normalidad deseada.
V	Volumen que se desea preparar (ml).
r_{min}	Riqueza mínima garantizada de $S_2O_3Na_2$ (tanto por uno).
$P.M.$	Peso molecular del $S_2O_3Na_2$ (g/mol)

La cantidad resultante fue disuelta en agua destilada completando hasta 1 litro. La disolución así preparada se usó en un lapso no mayor de 30 días desde su preparación.

- Disolución de almidón al 1 %. Se mezclaron 5 gr de almidón soluble con 0.01 g de HgI_2 (como estabilizante) y se disolvieron con 30 ml de agua destilada. Esta solución se agregó a 500 ml de agua destilada hirviendo, manteniendo la ebullición durante 3 min. La solución así preparada se conserva durante largo tiempo sin alteración.

Procedimiento

Cuando no fue posible realizar esta determinación como primera del conjunto, la muestra se tomó y almacenó al abrigo de la luz, y se mantuvo refrigerada dentro de envases de vidrio, totalmente llenos y herméticamente cerrados.

Se pesaron exactamente 5 g de AOVE y se depositaron en un matraz Erlenmeyer, se agregó con la probeta 30 ml de una mezcla de 3 volúmenes de ácido acético (cuidado, corrosivo) y un volumen de cloroformo (cuidado, inflamable) (22.5 ml de ácido acético por 7.5 ml de cloroformo), agitando hasta total disolución de la muestra. Por último se agregó 1 ml de solución saturada de yoduro potásico.

Se cerró el matraz, y se mantuvo en agitación durante un minuto, conservándolo después en la oscuridad durante 5 min. Transcurrido ese tiempo se agregó 75 ml de agua y 1 ml de disolución de tiosulfato 0.01 N. Se valoró (agitando vigorosamente al mismo tiempo) con la solución de tiosulfato sódico el yodo liberado hasta conseguir la desaparición del color del complejo I_2 – almidón. Paralelamente se efectuó una prueba en blanco. Para una serie de determinaciones se efectuó el enrase de la bureta antes de cada ensayo.

El Índice de peróxidos expresado en miliequivalentes (meq) de oxígeno activo por Kg de aceite se calculó mediante la fórmula siguiente y el resultado que se expresó como porcentaje de ácido oleico:

$$P = \frac{(V - V_o) \times N_t \times 1000}{p}$$

En donde:

V	Volumen de tiosulfato sódico 0.01 N gastados (ml).
V_o	Volumen de solución de tiosulfato sódico gastada en la prueba en blanco (ml).
N_t	Normalidad teórica de la solución de tiosulfato sódico.
p	Peso de la muestra utilizada (g)

- **Método para la medida espectrofotométrica de la absorción en la región ultravioleta (K_{270} y K_{232}) del aceite de oliva virgen extra.**

Material

El método utilizado fue el descrito en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas L248 del 5 de septiembre de 1991. Reglamento (CEE) No. 2568/91 de la comisión del 11 de julio de 1991. Modificado de acuerdo al Reglamento (CEE) No. 1989/2003 del 6 de noviembre de 2003 (L295 del 13 de noviembre de 2003).

Reactivos

Los reactivos empleados para determinar los valores de K_{270} y K_{232} del AOVE se listan a continuación (Tabla 1.7-4):

Tabla 1.7-4. Reactivos para la determinar la absorción en la región ultravioleta (K_{270} y K_{232}).

Nombre	Proveedor
Ciclohexano*	Panreac

*Para espectrofotometría en el ultravioleta, debe tener con respecto al agua destilada, una transmitancia del 60 % a 220 nm como mínimo y del 95% como mínimo a 250 nm.

Material y aparatos

- Material de vidrio de calidad contrastada, necesario para volumetría.
- Matraces aforados de 10 ml.
- Pipetas graduadas de 1 y 10 ml.
- Balanza analítica con precisión de décimas de miligramo Metler AE200.
- Espectrofotómetro UV/Vis Boeco S-22.
- Cubeta de cuarzo contrastadas con paso óptico de 1 cm.

Fundamento

La transparencia de las grasas y aceites en la región de los 200 y 300 nm se ve afectada en el proceso de auto-oxidación y, también, como resultado de determinados tratamientos industriales. De manera que, la extinción específica a 232 y 270 nm, se toma como criterio de calidad. Un estado medio de oxidación presenta un máximo de absorción a 232 nm mientras que los aceites refinados y los muy oxidados presentan un máximo a 270 nm. El parámetro ΔK es indicativo de la oxidación secundaria (Fennema, 2000).

Preparación de reactivos.

El ciclohexano para espectrofotometría en ultravioleta no requiere preparación previa.

Procedimiento

Se pesaron en un matraz aforado de 10 ml entre 30 a 40 mg de AOVE y se registró el peso exacto de la muestra; se disolvió en ciclohexano UV-IR y se diluyó hasta el enrase. En cubeta de 1 cm de paso, se midió la extinción a 232 y 270 nm, utilizando ciclohexano UV-IR como patrón de comparación. Cuando la lectura no estuvo comprendida entre 0.2 y 0.8 de absorbancia; se repitió la medida, bien diluyendo convenientemente o procediendo a una nueva pesada. Las extinciones específicas o coeficientes de extinción a las diversas longitudes de onda se calcularon según la siguiente expresión:

$$E_{1cm}^1 \% \lambda = \frac{A \lambda}{c e}$$

En donde:

$E_{1cm}^1 \% \lambda$	Extinción específica a la longitud de onda λ .
$A \lambda$	Absorción leída en el espectrofotómetro.
c	Concentración de la disolución en g/100ml.
e	Espesor de la cubeta (cm).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CINÉTICAS DE TEMPERATURA.

1.1. Valoración de las cinéticas de temperatura los experimentos.

Las técnicas culinarias se repitieron tres veces en los experimentos de cada hortaliza (patata, tomate, berenjena y calabaza). El conteo del tiempo de tratamiento inició cuando introdujimos las hortalizas en el medio de transferencia de calor. Las principales variaciones durante los 10 minutos de tratamiento se muestran en la Tabla 1.1-1.

Tabla 1.1-1. Temperaturas medias, mínimas y máximas durante los tratamientos culinarios con cuatro hortalizas. Los valores promedian cuatro repeticiones (n = 4).

Tratamiento culinario	Temperatura (°C)		
	Media	Mínima	Máxima
Crudo	-----	-----	-----
Fritura	129.9	119.3	170.2
Rehogado	99.5	85.1	103.3
Cocción	97.9	92.4	98.8
Cocción AA	98,1	95,3	98,8

Las temperaturas establecidas en las condiciones experimentales se mantuvieron dentro de los límites establecidos en el rehogado, la cocción y la cocción AA (Fig. 1.1-1 b, c y d). Durante la fritura no se consiguió retomar la temperatura mínima de elaboración a partir del momento en que se incorporó la hortaliza del ensayo en el AOVE a 180°C (Fig. 1.1-1 a).

El control de la temperatura es un factor decisivo en la correcta realización de las técnicas culinarias. Durante su aplicación, además de asegurar las condiciones óptimas para conseguir platos agradables al paladar, se debe garantizar el aporte óptimo de nutrientes y fitoquímicos que se les reconoce a las hortalizas y al AOVE y que por su naturaleza orgánica son altamente sensibles a incrementos de temperatura no controlados.

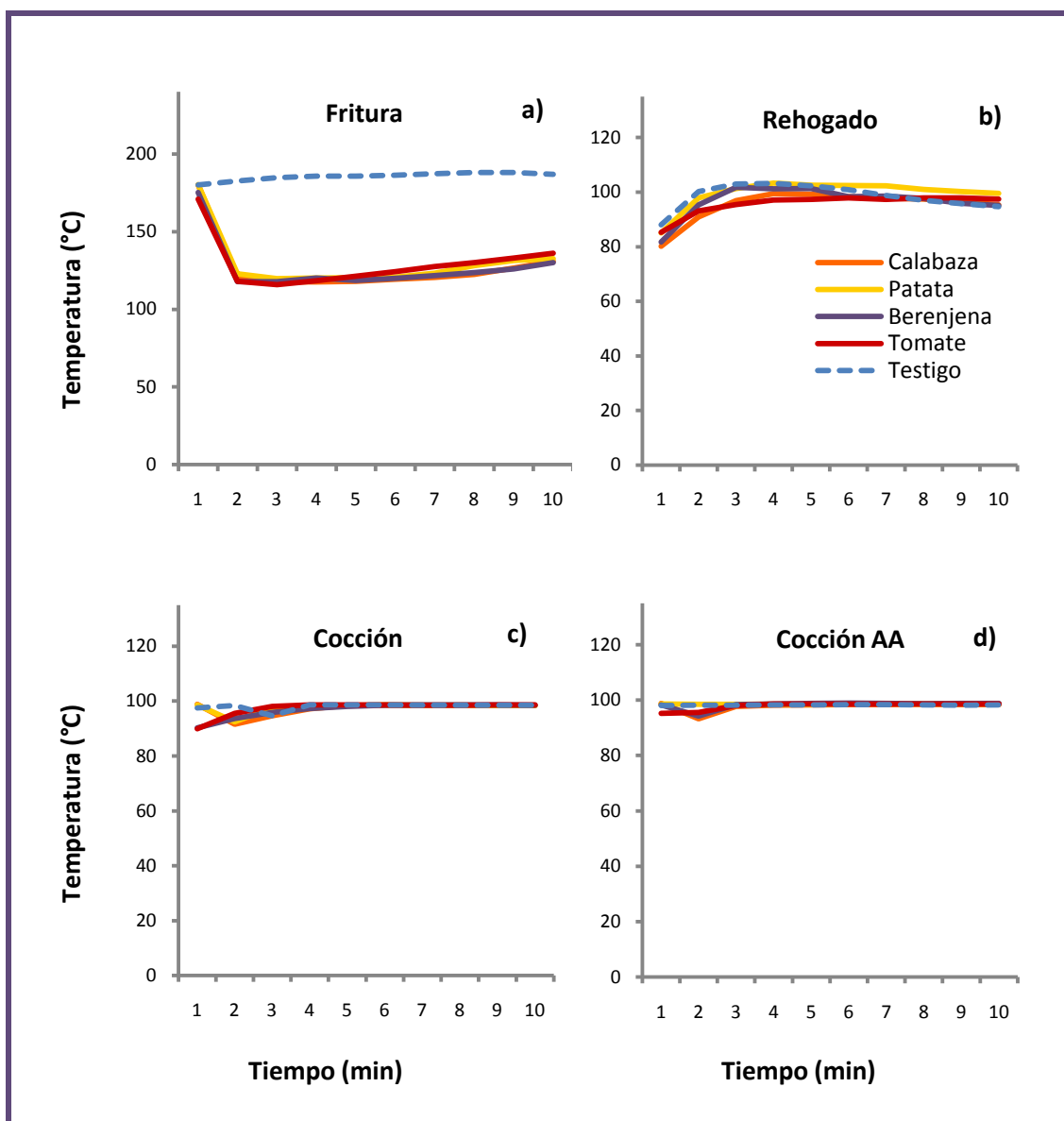


Figura 1.1-1. Cinéticas de temperatura en ensayos con 4 hortalizas durante el tiempo de aplicación de fritura a), rehogado b), cocción c), y cocción AA d) (n = 4).

Mientras que en la cocción, la ebullición del agua fue el factor que controló la temperatura del proceso, y por lo tanto, no se sobrepasaron en ningún momento los 100°C. En el caso de la fritura y el rehogado se requirió un cuidadoso control de la temperatura pues el valor de calor específico de las grasas y aceites provoca que se calienten rápidamente y que se alcancen con facilidad temperaturas que sobrepasan los 200°C (Vieira y Regitano-D'Arce, 1998). Hasta la fecha, el control de este factor no ha conseguido ser resuelto satisfactoriamente a nivel de laboratorio, a nivel industrial o doméstico y debe ser mejorado en estudios subsecuentes que aborden temas como el que se tratan en este trabajo.

En la realización de los experimentos de fritura de las hortalizas por inmersión, se observó que una vez agregado el alimento crudo, no se volvieron a alcanzar las temperaturas mínimas consignadas en la metodología; este fenómeno estuvo asociado con el proceso dinámico de evaporación de humedad del alimento que contribuyó a disipar como calor latente de vaporización el calor aportado al aceite (Mc Gee, 2004). Al tener este factor en consideración se sabía con anticipación que las temperaturas de fritura en los ensayos con patata no se incrementarían a menos que se lograra una deshidratación importante del tubérculo.

2. CUANTIFICACIÓN DE HUMEDAD, GRASA Y EXTRACTO SECO EN LAS FRACCIONES (HORTALIZA, ACEITE OLIVA VIRGEN EXTRA Y AGUA).

2.1. Contenido de humedad en las diferentes fracciones.

En las Tabla 2.1-1 se recogen los valores del contenido de humedad, en las cuatro hortalizas y las 3 fracciones (hortaliza, AOVE y agua). Estos parámetros fueron medidos antes y después de la aplicación de la fritura, rehogado, cocción y cocción AA.

Tabla 2.1-1. Contenido de humedad en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua, obtenidas en crudo y tras aplicar cuatro técnicas culinarias. Cada valor promedia tres repeticiones (n = 3).

Parámetro	Técnica culinaria	Fracción	Hortaliza			
			Patata*	Berenjena	Tomate	Calabaza
Contenido de humedad (%)	Crudo	Hortaliza	81,12 ± 0,2 d	94,23 ± 0,75 e	94,54 ± 0,13 d	87,89 ± 0,95 d
		AOVE	0,03 ± 0,01 a	0,04 ± 0 a	0,06 ± 0 a	0,06 ± 0 a
		Agua	100 ± 0 f**	100 ± 0 f	100 ± 0 f	100 ± 0 h
	Fritura	Hortaliza	44,39 ± 3,2b	31,81 ± 3,4 b	32,22 ± 1 b	46,11 ± 2,7 b
		AOVE	0,02 ± 0 a	0,04 ± 0,03 a	0,03 ± 0,01 a	0,06 ± 0 a
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Rehogado	Hortaliza	73,63 ± 0 c	66,55 ± 1,03 c	88,42 ± 2,17 c	82,61 ± 1,31 c
		AOVE	0,04 ± 0 a	0,03 ± 0 a	0,11 ± 0,01 a	0,08 ± 0,01 a
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Cocción	Hortaliza	83,44 ± 0,5 e	95,94 ± 0,27 e	96,67 ± 0,45 e	92,41 ± 0,66 e
		AOVE	-----	-----	-----	-----
		Agua	99,06 ± 0,4 f	99,43 ± 0,02 f	99,35 ± 0,04 f	98,64 ± 0,08 g
Cocción A/A	Hortaliza	80,20 ± 1,4 d	83,49 ± 1,2 d	94,10 ± 0,63 d	89,56 ± 1,5 d	
	AOVE	0,20 ± 0,07 a	0,99 ± 1,43 a	0,16 ± 0,03 a	0,18 ± 0,02 a	
	Agua	99,20 ± 0,1 f	99,44 ± 0,07 f	99,18 ± 0,15 f	98,64 ± 0,08 f	

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.

**Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Como se esperaba, los contenidos de humedad más altos del estudio fueron los del agua cruda y los del agua de cocción por las dos modalidades. En las fracciones del agua de cocción y cocción AA también se encontraron porcentajes que no llegaron a 100 %, este incremento del extracto seco de las muestras se expondrá en el apartado correspondiente.

Sin considerar las muestras de agua, el mayor porcentaje de humedad del estudio fue el del tomate cocido ($96,67 \pm 0,45$ %) y el menor fue el AOVE frito ($0,02 \pm 0$ %). La clasificación de hortalizas crudas de acuerdo al contenido de humedad en orden descendente fue: tomate > berenjena > calabaza > patata.

Al comparara las hortalizas se puede observar (Fig. 2.1-1) que los porcentajes de humedad más elevados les correspondieron a las cocidas ($83,44$ % a $96,67$ %), les siguieron en orden descendente las crudas ($81,12$ % a $94,54$ %) y cocidas AA ($80,2$ % a $94,1$ %) con valores sin diferencia significativa entre ellas en el caso de la patata, tomate y calabaza ($p > 0,05$). Las rehogadas presentaron valores intermedios ($66,45\%$ a $88,62$ %) y las fritas con los contenidos más bajos ($31,81$ % a $46,11$ %).

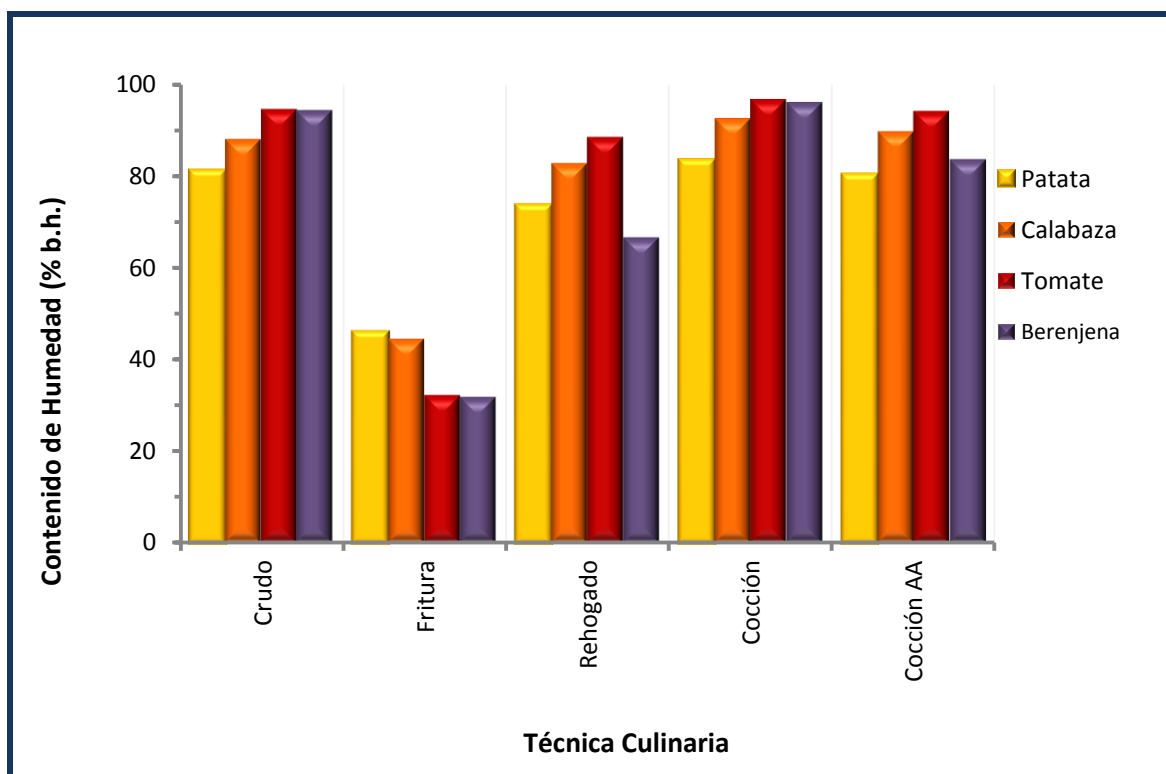


Figura 2.1-1. Contenido de humedad en hortalizas obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

La magnitud de los porcentajes de humedad de las hortalizas crudas o procesadas fueron intermedios y significativamente diferentes cuando se les comparó con el contenido del agua y el AOVE incluidos en los ensayos ($p < 0,05$).

En el AOVE procedente de la cocción AA de todas las hortalizas se cuantificaron los porcentajes más elevados de humedad ($0,16 \pm 0,03$ % a $0,99 \pm 1,43$ %) respecto al crudo ($0,03 \pm 0,01$ % a $0,06 \pm 0$ %) o el recuperado después del rehogado ($66,55 \pm 1,03$ % a $88,42 \pm 2,17$ %) y la fritura ($31,81 \pm 3,38$ % a $46,11 \pm 2,7$ %). Los porcentajes de humedad de los aceites fritos, y crudos fueron los más reducidos, los primeros presentaron el contenido más bajo del estudio; sin embargo en ningún caso hubo diferencias estadísticas significativas entre los valores de los aceites ($p > 0,05$).

2.2. Contenido de grasa en las distintas fracciones.

Dada la naturaleza lipídica de las muestras de AOVE, les correspondieron contenidos más elevados de grasa que en todos los casos fueron cercanos al 100 % (Tabla 2.2-1) y que solo disminuyeron en porcentajes ínfimos por la absorción de humedad que se describió en el apartado anterior. Los descensos en el contenido de grasa por absorción de humedad, no fueron estadísticamente significativos ($p > 0,05$).

En las muestras de agua no se encontró fracción alguna de grasa. Hubo una tendencia reiterada de este parámetro en las cuatro hortalizas (Tabla 2.2-1), las crudas y cocidas formaron un grupo homogéneo ($p > 0,05$) con un contenido casi nulo ($0,01 \pm 0,01$ % a $0,09 \pm 0,03$ %). Les siguió en orden ascendente las obtenidas de la cocción AA ($1,19 \pm 1,02$ % a $12,70 \pm 1,5$ %), el rehogado ($3,10 \pm 0,4$ % a $27,37 \pm 0,2$ %) y finalmente, la fritura ($13,10 \pm 0,4$ % a $56,63 \pm 4,5$ %).

Los valores de contenido de grasa de las fracciones de hortaliza fueron intermedios respecto al agua y el aceite. De todas las hortalizas fue la berenjena, la que tendió a acumular mayor porcentaje de grasa después de cada procesamiento culinario que incluía AOVE, Kalogeropoulos (2007) lo atribuyó a la naturaleza esponjosa de su textura. Según el porcentaje de grasa, la berenjena se clasificó en el siguiente orden decreciente: con un 56,63 % la frita con el mayor

contenido, a continuación la rehogada (27,37 %) y la de la cocción AA con 12,70 %. A la berenjena le siguió la calabaza con 17,58, 4,09 y 2,75 %, el tomate con 13,53, 7,20 y 1,19 % y finalmente la patata con 13,1, 3,10 y 3,07 % respectivamente, en las técnicas de fritura, rehogado y Cocción AA (Fig. 2.2-1).

Tabla 2.2-1. Contenido de materia grasa en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua, obtenidas en crudo y tras aplicar cuatro técnicas culinarias. Cada valor promedia tres repeticiones (n = 3).

Parámetro	Técnica culinaria	Fracción	Hortaliza			
			Patata*	Berenjena	Tomate	Calabaza
Contenido de Materia Grasa (%)	Crudo	Hortaliza	0,05 ± 0,05 b	0,01 ± 0,01 a	0,07 ± 0,03 a	0,09 ± 0,03 a
		AOVE	99,97 ± 0 e	99,96 ± 0 e	99,94 ± 0 e	99,94 ± 0 e
		Agua	0 ± 0 a**	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
	Fritura	Hortaliza	13,10 ± 0,4 d	56,63 ± 4,5 d	13,53 ± 1,3 d	17,58 ± 0,8 d
		AOVE	99,98 ± 0 e	99,96 ± 0 e	99,97 ± 0 e	99,97 ± 0,01 e
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Rehogado	Hortaliza	3,10 ± 0,4 c	27,37 ± 0,2 c	7,20 ± 0,1 c	4,09 ± 0,27 c
		AOVE	99,96 ± 0 e	99,97 ± 0 e	99,89 ± 0 e	99,92 ± 0,01 e
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Cocción	Hortaliza	0,06 ± 0 b	0,07 ± 0,08 a	0,07 ± 0 a	0,08 ± 0,01 a
		AOVE	-----	-----	-----	-----
		Agua	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
Cocción A/A	Hortaliza	3,07 ± 0,9 c	12,70 ± 1,5 b	1,19 ± 1,02 b	2,75 ± 0,27 b	
	AOVE	99,80 ± 0,1 e	99,01 ± 1,4 e	99,89 ± 0,1 a	99,82 ± 0,02 e	
	Agua	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 e	33,27 ± 0 a	

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.
**Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes (p>0,05).

La variación en los contenidos de humedad de las hortalizas procesadas o crudas fue el factor que reorganizó las proporciones de grasa y materia seca del alimento. Se sabe que la fritura es básicamente un proceso de deshidratación en el que el agua de las capas superficiales se evapora para ceder el lugar al aceite del medio de fritura dentro de los poros del alimento (Saguy et al., 2003, Chiou et al. 2009). En este estudio, las hortalizas fritas perdieron más humedad (31,81 a 44,11 %) e incorporaron más aceite (13,10 a 56,63 %). Mientras que el rehogado (temperaturas inferiores a 100°C), mantuvo porcentajes de humedad semejantes (66,55 a 88,42 %) al de las hortalizas crudas (81,12 a 94,54 %) y cocidas por las dos modalidades (80,20 a 96,67 %), y porcentajes de grasas más bajos que las cocidas (3 a 27,37 %).

Un factor que reduce el proceso de deshidratación y con ello la pérdida de humedad y la absorción de aceite fue la forma cúbica del alimento respecto a cortes delgados, como el corte en láminas. Esto ha sido verificado en patatas chip, en donde el contenido de grasa de los cubos no superó el 14% respecto a contenidos reportados del 38 a 44 % en chips (Kita et al., 2007).

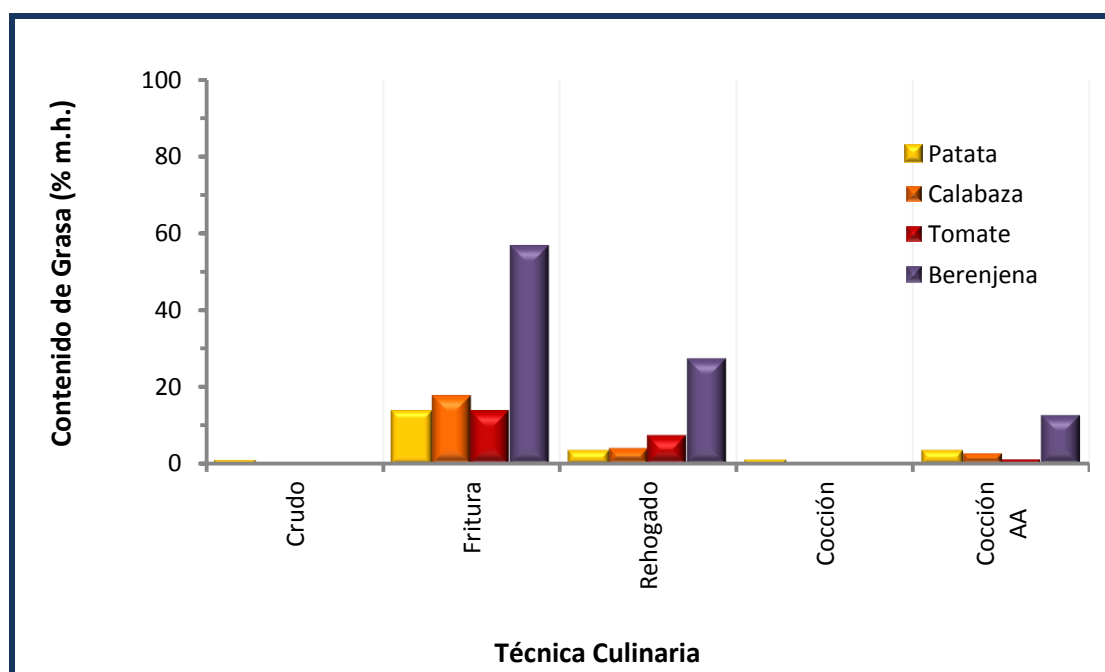


Figura 2.2-1. Contenido de grasa en hortalizas obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

2.3. Contenido de extracto seco en las distintas fracciones.

Por su composición predominantemente lipídica al AOVE se le asignó un porcentaje de extracto seco de 0 en todos los casos analizados en este estudio.

En el agua se midieron los menores valores de extracto seco del estudio (Tabla 2.3-1). El porcentaje mayor se cuantificó en la calabaza tanto de la cocción AA ($1,36 \pm 0,08$ %) como de la cocción ($1,33 \pm 0,24$ %), y el mínimo, después del agua cruda (0 %), se observó en el agua de la cocción AA de la berenjena ($0,02 \pm 0,07$ %). A pesar de que fueron detectables, los incrementos de este parámetro tras la cocción y la cocción AA no fueron significativamente diferentes respecto al agua cruda en ninguna de las hortalizas ($P > 0,05$).

Tabla 2.3-1. Contenido de extracto seco en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua, obtenidos en crudo y tras aplicar cuatro técnicas culinarias. Cada valor promedia tres repeticiones (n = 3).

Parámetro	Técnica culinaria	Fracción	Hortaliza			
			Patata*	Berenjena	Tomate	Calabaza
Contenido de Extracto Seco (%)	Crudo	Hortaliza	18,33 ± 0,14 c	5,76 ± 0,76 c	5,39 ± 0,11 c	12,02 ± 0,03 c
		AOVE	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
		Agua	0 ± 0 a**	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
	Fritura	Hortaliza	42,5 ± 2,58 e	11,56 ± 1,1 d	51,48 ± 5,59 d	36,31 ± 2,43 d
		AOVE	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Rehogado	Hortaliza	23,27 ± 9,29 d	6,08 ± 1,03 c	4,38 ± 1,46 c	13,29 ± 1,32 c
		AOVE	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Cocción	Hortaliza	15,89 ± 0,35 b	3,99 ± 0,29 b	3,25 ± 0,32 c	7,51 ± 0,65 b
		AOVE	-----	-----	-----	-----
		Agua	0,94 ± 0,8 a	0,57 ± 0,56 a	0,65 ± 0,04 ab	1,33 ± 0,24 a
	Cocción A/A	Hortaliza	16,65 ± 1,63 b	3,81 ± 0,54 b	4,72 ± 0,99 c	6,68 ± 1,23 b
		AOVE	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
		Agua	0,35 ± 0,11 a	0,02 ± 0,07 a	0,82 ± 0,15 ab	1,36 ± 0,08 a

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.
**Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes (p > 0,05).

En esta variable, fueron las hortalizas tanto crudas como procesadas las que revelaron los valores más altos dentro de un rango delimitado entre el 3,25 ± 0,32 % y el 51,48 ± 5,59 %, para el tomate cocido y el tomate frito respectivamente.

Las hortalizas fritas siempre formaron un grupo estadísticamente diferenciado (p < 0,05) del resto de técnicas culinarias con los promedios más altos (Fig. 2.3-1), y también en las 4 hortalizas la cocción y la cocción AA formaron un grupo homogéneo con los promedios más bajos de extracto seco (p>0,05). Se formó otro grupo con valores intermedios, conformado por la hortaliza cruda y la rehogada, que fueron homogéneos sólo en la berenjena y la calabaza (Tabla 2.3.-1). En el tomate la única técnica con un contenido de extracto seco estadísticamente diferente fue la fritura (p<0,05).

Como se puede observar en la Fig. 2.3-1, se cuantificaron los valores más altos de extracto seco en las fracciones de patata, calabaza, y tomate fritos, así como también en las muestras de patatas elaboradas por el resto de técnicas.

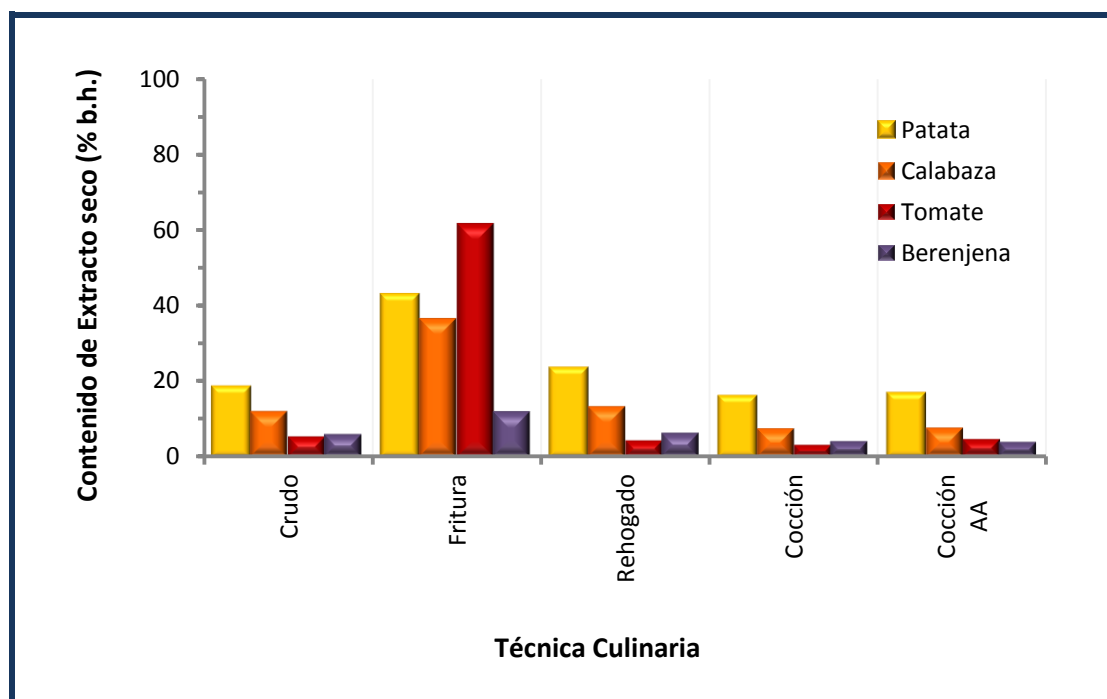


Figura 2.3-1. Contenido de extracto seco en hortalizas obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

La cantidad de extracto seco del alimento aumentó en las técnicas que utilizaron AOVE como medio de transferencia de calor, pero en la cocción se redujo por efecto de la solubilización o lixiviación de materiales en el agua del proceso, como se ha comprobado en el caso de los minerales en hortalizas de hoja (Lisiweska et al., 2009) y por la incorporación de humedad en los cubos de hortaliza. La ausencia de migración excesiva de sustancias hidrosolubles es una de las ventajas que se asocian a la elaboración de alimentos por técnicas de fritura; así, al unir el efecto de evaporación parcial del contenido de humedad y la ausencia de solubilización de nutrientes se obtuvo como resultado la concentración de la masa seca (Mc Gee, 2004).

En términos generales, los principales cambios de las variables bromatológicas en los alimentos incluidos en los experimentos fueron:

- En la fritura, existe una pérdida de agua, acompañada del incremento de masa seca y un aumento de la proporción de grasa.

Resultados y Discusión

- En la cocción, hubo tendencia aunque de magnitud muy baja, a incrementar o mantener sin cambio el contenido de humedad, mientras que el extracto seco y grasa disminuye o se mantiene sin cambio. En este caso, el agua se evaporó del medio de cocción y ganó la masa seca desprendida de la hortaliza durante el procesamiento hidrotérmico.
- En la cocción AA, el contenido de humedad y extracto seco mostraron la misma tendencia que en la cocción, pero con la absorción paralela de AOVE del medio de cocción, con el consiguiente incremento en porcentaje de grasa pero de magnitud menor que en el rehogado
- En el rehogado, la pérdida de humedad procedente de las hortalizas no fué tan marcada como en la fritura, no hubo un incremento en la proporción de masa seca respecto a las hortalizas crudas como se esperaría (Fig. 2.3.-1), pero sí hubo un incremento de la proporción de grasa.

3. ESTUDIO DE LOS FENOLES TOTALES Y COMPUESTOS FENÓLICOS.

3.1. Cuantificación de la concentración de fenoles totales.

La concentración de fenoles totales cuantificada en el agua de cocción y en los extractos metanólicos de las hortalizas y el AOVE crudos y tratados, se muestran en la Tabla 3.1-1.

En las hortalizas crudas fueron encontradas concentraciones de fenoles totales que variaron entre 0,21 a 0,38 mg EAG/g m.h., la clasificación según la concentración fue: calabaza > patata > berenjena > tomate. Ha sido reportado un amplio rango de valores de contenido de fenoles totales en hortalizas frescas, debido a que son numerosos los factores que influyen en el nivel de estos compuestos (variaciones genéticas, temporada, calidad del suelo, disponibilidad de agua, grado de maduración, etc). Sin embargo, las concentraciones medidas en este estudio son comparables a los valores reportados por Kalogeropoulos (2007), Natella et al. (2010).

En el estudio, el valor más alto del contenido de fenoles totales se cuantificó en el tomate frito ($5,34 \pm 0,52$ mg EAG/g m.h), y el más bajo después del agua cruda (0 ± 0 mg EAG/g m.h.), correspondió al AOVE recuperado de la cocción AA de la patata ($0,01 \pm 0$ mg EAG/g m.h).

En el AOVE se detectaron concentraciones que variaron entre $0,37 \pm 0,01$ mg EAG/g m.h. en el aceite crudo del lote empleado en los experimentos con calabaza y $0,01 \pm 0$ mg EAG/g m.h. en el recuperado tras la cocción AA de la patata. En el agua de cocción los valores se encontraron entre $0,04 \pm 0$ mg EAG/g m.h. del agua de cocción de la calabaza y $3,63 \pm 0,21$ mg EAG/g m.h. en el agua de la cocción AA del tomate. Y el rango de concentraciones de todas las hortalizas estuvo delimitado entre $0,13 \pm 0$ mg EAG/g m.h. en el tomate cocido, y $5,34 \pm 0,52$ mg EAG/g m.h. en el tomate frito.

En las pruebas estadísticas no se encontró una tendencia repetitiva de las hortalizas para la formación de grupos homogéneos. De manera que, mientras en la calabaza las muestras procesadas por todas las técnicas fueron estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,05$), en el tomate todas fueron iguales, excepto el frito ($5,34 \pm 0,52$ mg EAG/g m.h.).

Tabla 3.1-1. Contenido de fenoles totales en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua, obtenidos en crudo y tras aplicar cuatro técnicas culinarias. Cada valor promedia tres repeticiones (n = 3).

Parámetro	Técnica culinaria	Fracción	Hortaliza			
			Patata*	Berenjena	Tomate	Calabaza
Contenido de Fenoles Totales mg EAG/g m.h.)	Crudo	Hortaliza	0,35 ± 0,03 b	0,27 ± 0,02 a	0,21 ± 0,01 a	0,38 ± 0,01 c
		AOVE	0,24 ± 0,02	0,36 ± 0	0,19 ± 0,01	0,37 ± 0,01
		Agua	0 ± 0**	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Fritura	Hortaliza	0,55 ± 0,05 c	2,80 ± 0,25 c	5,34 ± 0,52 b	1,69 ± 0,02 e
		AOVE	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,3 ± 0
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Rehogado	Hortaliza	0,32 ± 0,01 b	0,38 ± 0,02 a	0,33 ± 0,02 a	0,5 ± 0 d
		AOVE	0,09 ± 0	0,05 ± 0	0,14 ± 0	0,15 ± 0,001
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Cocción	Hortaliza	0,25 ± 0,03 a	0,69 ± 0 b	0,13 ± 0,01 a	0,36 ± 0,04 b
		AOVE	-----	-----	-----	-----
		Agua	-----	0,19 ± 0,01	1,36 ± 0,02	0,04 ± 0
Cocción A/A	Hortaliza	0,19 ± 0,01 b	0,65 ± 0,02 b	0,13 ± 0 a	0,27 ± 0 a	
	AOVE	0,01 ± 0	0,05 ± 0	0,04 ± 0	0,06 ± 0	
	Agua	0,08 ± 0	0,14 ± 0,01	3,63 ± 0,21	0,07 ± 0	

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.

**Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Con la berenjena de las 5 técnicas se formaron 3 grupos según las concentraciones de fenoles totales. La cruda ($0,27 \pm 0,02$ mg EAG/g m.h.) y rehogada ($0,38 \pm 0,02$ mg EAG/g m.h.), la cocida ($0,25 \pm 0,03$ mg EAG/g m.h.) y cocida AA ($0,19 \pm 0,01$ mg EAG/g m.h.), y la frita conformando por sí sola un grupo ($2,80 \pm 0,25$ mg EAG/g m.h.). En la patata el grupo con las menores concentraciones en mg EAG/g m.h. fue el formado por la cocción AA ($0,19 \pm 0,01$ mg EAG/g m.h.) junto con la cocción ($0,25 \pm 0,03$ mg EAG/g m.h.), y en grupos independientes, el rehogado ($0,32 \pm 0,01$ mg EAG/g m.h.), crudo ($0,35 \pm 0,03$ mg EAG/g m.h.) y la fritura ($0,55 \pm 0,05$ mg EAG/g m.h.) ($p < 0,05$).

Las fracciones de hortalizas crudas y procesadas mostraron concentraciones superiores de fenoles totales con respecto a los medios de transferencia de calor (agua y/o AOVE). Solo en el tomate las concentraciones se mostraron dispersas en todo el rango de valores obtenidos, desde concentraciones muy bajas en la cocción ($0,13 \pm 0,01$ mg EAG/g m.h.) junto con las muestras de agua y de AOVE de la cocción AA, rehogado, crudo, y frito, hasta los rangos más altos $0,33 \pm 0,02$ y $5,34 \pm 0,52$ mg EAG/g m.h., en el tomate rehogado y frito, respectivamente, con valores semejantes a las muestras del agua de cocción y de cocción AA.

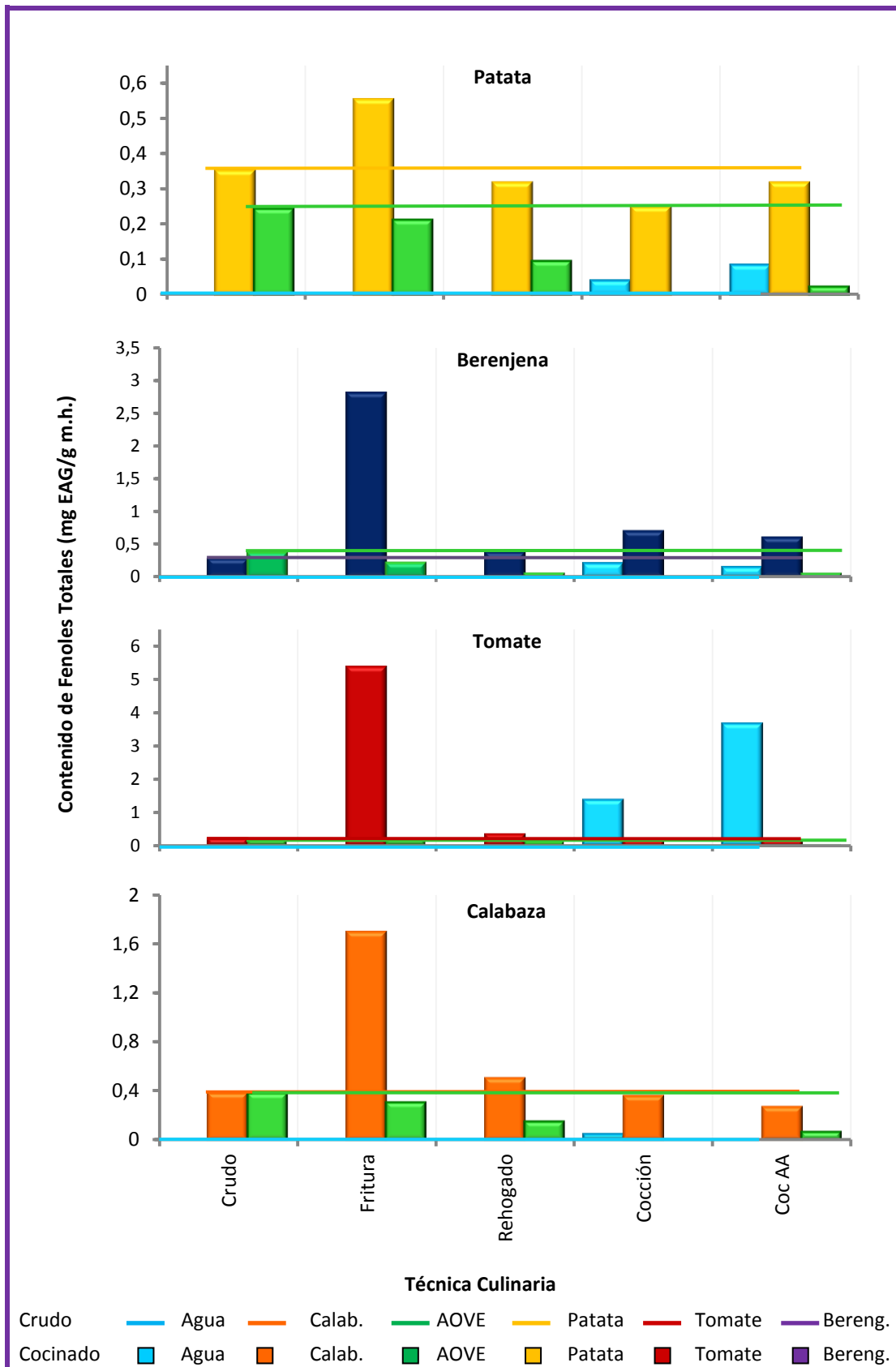


Figura 3.1-1. Contenido de fenoles totales en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

Resultados y Discusión

En la Fig 3.1-1, se muestran las concentraciones de fenoles totales de las cuatro hortalizas agrupadas por técnica culinaria. Al comparar todas las hortalizas crudas y procesadas se observa que en las fritas se obtuvieron las mayores concentraciones de fenoles totales ($p < 0,05$). Las concentraciones más altas de entre las hortalizas crudas se cuantificaron en la calabaza ($0,38 \pm 0,01$ mg EAG/g m.h.) y la patata ($0,35 \pm 0,03$ mg EAG/g m.h.). De entre las hortalizas cocidas y cocidas AA destacó la berenjena cocida ($0,69 \pm 0$ mg EAG/g m.h.), el tomate de entre las fritas ($5,34 \pm 0,52$ mg EAG/g m.h.), y la calabaza en el rehogado ($0,5 \pm 0$ mg EAG/g m.h.).

Los datos del análisis de las hortalizas indican que hubo un enriquecimiento en la concentración de fenoles en los siguientes casos: todas las modalidades de berenjena procesada, durante la fritura de las cuatro hortalizas, y en el rehogado de la calabaza y del tomate. Hubo reducción de la concentración en el resto de hortalizas procesadas, es decir en la cocción y cocción AA de la calabaza, patata y tomate, y en el rehogado de la patata.

En el AOVE utilizado, hubo una reducción de los fenoles totales y en el agua un enriquecimiento, que acompañaron a las variaciones de la concentración en las hortalizas tanto, en los casos de incremento como en los de reducción de la concentración.

Ramírez-Anaya (2009), detectó una reducción del contenido de fenoles totales en el aceite de oliva virgen extra de las técnicas de rehogado y fritura de la patata y en los ensayos testigo en donde se sometieron las muestras de AOVE a las temperaturas propias de cada técnica sin incluir el alimento.

La concentración de fenoles totales en los 4 lotes del AOVE de esta investigación ($0,24$; $0,36$; $0,19$ y $0,37$ mg EAG/g m.h.) fue de magnitud comparable a los valores reportados en otros estudios. Por ejemplo de $0,08$ mg EAG /g m.h. en aceite de oliva crudo con bajo contenido de fenoles, o de $0,147$ a $0,2$ mg EAG /g m.h. en aceites de oliva fortificados con extractos de hoja de olivo (Chiou et al., 2009). Del último dato se deduce que las concentraciones mostradas en este estudio corresponden a las de un aceite con muy buen contenido de fenoles.

La concentración de fenoles en la patata frita fue de $0,55$ mg EAG/g m.h., en la berenjena 33 mg de EAG/g m.h., el valor de la primera coincidió con lo reportado por Kalogeropoulos (2007), sin embargo el de la segunda es muy alto respecto al medido en este estudio para la misma hortaliza frita. Y el aceite frito de este estudio duplicó el valor reportado por el investigador de $0,13$ mg/g.

El incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en la concentración, encontrado en las hortalizas fritas, resultó del efecto de concentración de la masa seca antes mencionado y en cierta proporción de la ganancia de fenoles a partir del aceite de fritura. En diversos estudios sobre fritura de patatas y berenjenas, ha sido demostrada la ganancia de fenoles procedentes del aceite con porcentajes de retención que ascienden a 25, 38 y 70 % en el aceite, la patata y la berenjena fritas respectivamente (Kalogeropoulos et al., 2007).

Las pérdidas de fenoles del AOVE durante los experimentos se atribuyeron al aumento de las temperaturas durante el calentamiento. Esta hipótesis se apoya en observaciones previas en donde se confirma que el calentamiento del aceite de oliva virgen extra causa la disminución de la concentración de polifenoles de forma progresiva a lo largo del tiempo que dura el tratamiento, pudiendo desaparecer en tratamientos prolongados, y a temperaturas muy elevadas (313 °C), por ejemplo durante el tratamiento con microondas (Cerretani et al., 2009).

La oxidación térmica, polimerización e hidrólisis que tienen lugar durante la fritura de aceites bajo condiciones de altas temperaturas, presencia de oxígeno y de agua proveniente del alimento, son causas de las pérdidas de polifenoles en el AOVE. También puede resultar del enlace covalente entre fenoles oxidados y proteínas o aminoácidos, así como de la polimerización de fenoles oxidados (Friedman, 1996).

La reducción de la concentración de fenoles en las hortalizas durante las dos modalidades de cocción y el aumento del contenido de fenoles en el agua, es originada por la solubilización de una parte de los fenoles presentes en el alimento, causada por la destrucción de las paredes celulares y compartimientos subcelulares que incrementan la lixiviación de sustancias hacia el espacio extracelular (Andlawer et al., 2003).

Esta tendencia, fue reportada previamente en la coliflor hervida en donde las pérdidas de los fenoles medidos en los floretes fueron cuantificados en el agua del proceso y resultaron insignificantes durante la cocción al vapor (Volden et al., 2008; 2009), también fue observada en diversas crucíferas hervidas (Sikora et al., 2008) y en pimientos hervidos, detectándose, en este último caso reducciones no significativas (Ai et al., 2008). Este es el hecho que motiva la recomendación de consumir las hortalizas cocidas junto con el agua de cocción y de reducir la cantidad de agua y el tiempo de cocción de las hortalizas para obtener los beneficios óptimos de los compuestos bioactivos.

3.2. Estudio de los compuestos fenólicos por HPLC.

Para la interpretación de los resultados obtenidos de la cuantificación de la concentración de los diversos compuestos fenólicos por HPLC, estos fueron clasificados en tres grupos:

- a) Compuestos fenólicos exclusivos del aceite de oliva virgen extra. Son aquellos fenoles descritos por Boskou (2009) como de presencia exclusiva en el AOVE, y que por lo tanto no se detectaron en ninguna de las cuatro hortalizas crudas. Fueron considerados como referencia para el análisis del reparto entre las fracciones la oleuropeína, pinorresinol, tirosol e hidroxitirosol.
- b) Compuestos fenólicos exclusivos de las verduras y hortalizas. Como referencia se analizó el reparto del ácido clorogénico y la rutina, el primero es un fenole de presencia extendida en las hortalizas y que no fue incluido por Boskou (2009) en el listado de compuestos fenólicos del el aceite de oliva. El ácido clorogénico es el fenol mayoritario en la patata y berenjena (Luthiria, 2012; Das et al., 2011), mientras que la rutina lo es en el tomate (Hallman et al., 2013). Fueron incluidos también los ácidos hidroxibenzóico, hidroxifenilacético y dihidroxibenzóico. Aunque los tres últimos fueron encontrados en este estudio solo en las hortalizas crudas, también son listados por Boskou (2009) como fenoles que formar parte del perfil del AOVE.
- c) Compuestos fenólicos procedentes tanto del aceite de oliva virgen extra como de las hortalizas. Son fenoles que fueron recogidos en la lista de Boskou (2009), y que en el presente trabajo fueron encontrados tanto en el vegetal como en el AOVE crudos, por lo menos en tres de las hortalizas estudiadas. Aquí se incluyeron la o-vanillina como referencia del reparto y los ácido o-cumárico, siríngico, p-cumárico y cafeico. También fueron incluidos los resultados de la luteolina, apigenina, y los ácidos vanílico y gálico, a pesar de no cubrir el requisito de estar presente en las fracciones crudas, por lo menos, tres de las hortalizas estudiadas.

En el resto de fenoles, además de la o-vanillina, se presentan los resultados considerando que los fenómenos que conducen la dinámica del reparto ya ha sido abordada en detalle a lo largo de la discusión.

Se aplicaron las pruebas estadísticas en cada fenol considerando por separado cada hortaliza para comparar, de forma objetiva entre sí, los valores obtenidos de la combinación de las fracciones (AOVE, hortaliza y agua) con cada técnica culinaria (crudo, fritura, rehogado, cocción, cocción AA).

Para el estudio estadístico se comprobó previamente si la distribución que siguieron las muestras fue normal o no, para ello se aplicaron los test de Chi-cuadrada, la estadística W de Shapiro-Wilks, la prueba de Z para oblicuidad y para kurtosis tomando como límite el valor de probabilidad (p) más bajo para determinar el ajuste a la distribución Normal. También se probó la igualdad de varianzas aplicando el test de Bartlett.

En el caso de que tras la aplicación de estos test se hubieran obtenido resultados no significativos ($p > 0,05$), se habría demostrado la normalidad de la distribución y la homogeneidad de las varianzas, por lo que se procedería a realizar tal análisis de la varianza mediante un método paramétrico de una sola vía (ANOVA). Por el contrario, cuando alguna de las dos premisas, o las dos a la vez, fallaron ($p < 0,05$), no se aplicó el ANOVA y se eligió el método no paramétrico de Kruskal-Wallis. Con ello se determinaron y detectaron las diferencias estadísticas significativas existentes ($p < 0,05$) que finalmente se plasmaron en las tablas 3.2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8 como literales junto a los valores de las concentraciones de cada fenol.

Resultados y Discusión

Tabla 3.2-1. Concentración de fenoles en las fracciones de patata y AOVE obtenidas en las técnicas culinarias con aceite como medio de transferencia de calor. Cada valor es el promedio de tres repeticiones (n=3).

Fenoles	Concentración de Fenoles ($\mu\text{g/g m.h.}$)						
	Crudo			Fritura		Rehogado	
	Patata*	AOVE	Agua	Patata	AOVE	Patata	AOVE
Ac. gálico	0,017 \pm 0 c**	0,012 \pm 0 b		0,067 \pm 0 e	Trazas	0,066 \pm 0 e	
Hidroxitirosol		0,125 \pm 0 b		1,329 \pm 0,04 f	0,125 \pm 0 b	0,878 \pm 0,06 d	0,082 \pm 0 ab
Ac. dihidroxibenzóico	0,142 \pm 0 bc			0,195 \pm 0,01 d		0,151 \pm 0,01 c	
Tirosol		0,114 \pm 0,01 c		0,177 \pm 0,01 e	0,118 \pm 0 c	0,147 \pm 0,01 d	0,066 \pm 0 b
Ac. hidroxifenilacético	0,261 \pm 0,01 b			0,277 \pm 0,01 b		0,273 \pm 0,02 b	
Ac. hidroxibenzóico	0,047 \pm 0 b			0,072 \pm 0 c		0,069 \pm 0,01 c	
Ac. clorogénico	0,191 \pm 0 b			0,439 \pm 0,03 c		0,413 \pm 0 c	
Ac. vanillico	0,131 \pm 0 b			0,152 \pm 0 b		0,146 \pm 0,01 b	
Ac. cafeico	0,019 \pm 0 fg	0,011 \pm 0 c		0,019 \pm 0 ef	0,009 \pm 0 b	0,021 \pm 0 g	Trazas
Ac. siríngico	0,023 \pm 0 de	0,019 \pm 0 c		0,022 \pm 0 d	0,019 \pm 0 c	0,025 \pm 0 f	0,016 \pm 0 b
Ac. p-cumárico	0,067 \pm 0 c	0,05 \pm 0 b		0,214 \pm 0 g	0,081 \pm 0 d	0,138 \pm 0,01 f	0,122 \pm 0,01 e
o-vanillina	1,012 \pm 0,05 f	0,368 \pm 0,02 c		0,142 \pm 0 b	0,418 \pm 0,02 d	0,137 \pm 0 b	0,108 \pm 0,01 b
Ac. o-cumárico	0,083 \pm 0 e	0,022 \pm 0 c		0,182 \pm 0,01 i	0,017 \pm 0 bc	0,123 \pm 0,01 g	0,013 \pm 0 b
Oleuropeina		0,429 \pm 0,03 d		1,196 \pm 0,02 g	0,129 \pm 0 b	0,679 \pm 0,03 e	0,335 \pm 0,01 c
Pinorresinol		0,454 \pm 0,02 e		0,31 \pm 0,01 d	0,478 \pm 0,04 e	0,247 \pm 0,02 c	0,252 \pm 0,02 cd
Luteolina		0,101 \pm 0 c		0,138 \pm 0 f	0,101 \pm 0 c	0,127 \pm 0 e	0,091 \pm 0,01 b
Apigenina	0,519 \pm 0,03 f	0,142 \pm 0,01 b		0,204 \pm 0,01 c	0,14 \pm 0,01 b	0,262 \pm 0,02 d	

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.

**Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla 3.2-2. Concentración de fenoles en las fracciones de patata, AOVE y agua obtenida en las técnicas culinarias de cocción. Cada valor es el promedio de tres repeticiones (n=3).

Fenoles	Concentración de Fenoles ($\mu\text{g/g m.h.}$)				
	Cocción		Cocción AA		
	Patata*	Agua	Patata	AOVE	Agua
Ac. gálico	0,059 \pm 0 d**	0,091 \pm 0 f	0,064 \pm 0 e	0,013 \pm 0 b	Trazas
Hidroxitirosol			0,558 \pm 0,01 c		2,014 \pm 0,16 g
Ac. dihidroxibenzóico	0,1467 \pm 0,01 bc	0,759 \pm 0 e	0,139 \pm 0 b		0,759 \pm 0,02 e
Tirosol					0,857 \pm 0,08 f
Ac. hidroxifenilacético					1,646 \pm 0,09 c
Ac. hidroxibenzóico	0,054 \pm 0 b	0,324 \pm 0,02 e	0,053 \pm 0 b		0,292 \pm 0,02 d
Ac. clorogénico	0,173 \pm 0 b	1,136 \pm 0,08 c	0,177 \pm 0 b		0,818 \pm 0,04 d
Ac. vanílico	0,129 \pm 0,01 b	0,618 \pm 0 c	0,139 \pm 0 b		0,749 \pm 0,06 d
Ac. cafeico	0,017 \pm 0 de		0,016 \pm 0 d		0,089 \pm 0,01 h
Ac. siríngico			0,024 \pm 0 ef		
Ac. p-cumárico			0,089 \pm 0,01 d	0,071 \pm 0,01 c	0,351 \pm 0,02 h
o-vanillina	0,679 \pm 0,06 e		0,127 \pm 0,01 b		1,703 \pm 0,1 g
Ac. o-cumárico	0,044 \pm 0 d	0,633 \pm 0,02 j	0,094 \pm 0 f	0,018 \pm 0 bc	0,143 \pm 0,01 h
Oleuropeina			0,797 \pm 0,07 f	0,149 \pm 0,01 b	1,385 \pm 0,11 h
Pinorresinol			0,269 \pm 0,02 cd	0,103 \pm 0,01 b	1,749 \pm 0,15 f
Luteolina			0,119 \pm 0,01 d		
Apigenina			0,202 \pm 0,01 c	0,432 \pm 0,04 c	0,0957 \pm 0,01 g

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.
 **Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla 3.2-3. Concentración de fenoles en las fracciones de berenjena y AOVE obtenidas en las técnicas culinarias con aceite como medio de transferencia de calor. Cada valor es el promedio de tres repeticiones (n=3).

Fenoles	Concentración de Fenoles ($\mu\text{g/g m.h.}$)						
	Crudo		Agua	Fritura		Rehogado	
	Berenjena*	AOVE		Berenjena	AOVE	Berenjena	AOVE
Ac. gálico	Trazas	Trazas			0,011 \pm 0 b	0,049 \pm 0 c	
Hidroxitirosol		0,141 \pm 0 d		0,408 \pm 0,01 g	0,112 \pm 0 c	0,170 \pm 0 f	0,082 \pm 0 b
Ac. dihidroxibenzóico	0,134 \pm 0,01 c**			0,310 \pm 0,01 e	0,081 \pm 0 b		0,067 \pm 0 b
Tirosol		0,099 \pm 0 c		0,234 \pm 0,01 e	0,093 \pm 0 c	0,134 \pm 0 d	0,066 \pm 0 b
Ac. hidroxifenilacético	0,260 \pm 0,02 c			0,325 \pm 0,01 d		0,322 \pm 0 d	
Ac. hidroxibenzóico	0,054 \pm 0 c			0,336 \pm 0 f		0,052 \pm 0 c	
Ac. clorogénico	1,315 \pm 0,07 b			10,901 \pm 0,57 e	0,038 \pm 0 a	2,528 \pm 0,07 c	
Ac. vanillico	0,133 \pm 0 c	0,065 \pm 0 b		0,264 \pm 0,02 f		0,160 \pm 0,01 d	
Ac. cafeico	0,014 \pm 0 c	0,010 \pm 0 b		0,054 \pm 0 e		0,051 \pm 0 e	
Ac. siríngico	0,023 \pm 0 c	0,012 \pm 0 b		0,029 \pm 0 d		0,055 \pm 0 f	
Ac. p-cumárico	0,071 \pm 0 c	0,043 \pm 0 bc		2,15 \pm 0,10 h	0,122 \pm 0 d	0,207 \pm 0 e	0,034 \pm 0 ab
o-vanillina	0,132 \pm 0 c	0,283 \pm 0,01 f		0,197 \pm 0 e	0,161 \pm 0 d	0,174 \pm 0,01 d	0,066 \pm 0 b
Ac. o-cumárico	0,023 \pm 0 d	0,024 \pm 0 d		0,023 \pm 0 d	0,014 \pm 0 c	0,027 \pm 0 e	
Oleuropeina		0,403 \pm 0,03 f		0,263 \pm 0,01 e	0,151 \pm 0 c	0,169 \pm 0 d	0,098 \pm 0 b
Pinorresinol		0,412 \pm 0,03 e		0,288 \pm 0,01 d	0,291 \pm 0 d	0,212 \pm 0 d	0,149 \pm 0 c
Luteolina					0,087 \pm 0 c		0,071 \pm 0 b
Apigenina		0,228 \pm 0 c		0,206 \pm 0,01 c	0,104 \pm 0 b		0,121 \pm 0,01 b

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.

**Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla 3.2-4. Concentración de fenoles en las fracciones de berenjena, AOVE y agua obtenida en las técnicas culinarias de cocción. Cada valor es el promedio de tres repeticiones (n=3).

Fenoles	Concentración de Fenoles ($\mu\text{g/g m.h.}$)				
	Cocción		Cocción AA		
	Berenjena*	Agua	Berenjena	AOVE	Agua
Ac. gálico	Trazas				
Hidroxitirosol			0,165 \pm 0 ef	0,084 \pm 0 b	0,992 \pm 0.01 h
Ac. dihidroxibenzóico	0,139 \pm 0 c**	1,021 \pm 0,02 g	0,183 \pm 0,01 d		0,982 \pm 0,04 f
Tirosol			0,135 \pm 0 d	0,065 \pm 0 b	0,743 \pm 0,02 f
Ac. hidroxifenilacético	0,285 \pm 0 c	1,451 \pm 0,06 f	0,281 \pm 0 c	0,151 \pm 0 b	1,402 \pm 0,04 e
Ac. hidroxibenzóico	0,126 \pm 0 d	1,495 \pm 0,02 h	0,147 \pm 0,01 e	0,025 \pm 0 b	0,838 \pm 0 g
Ac. clorogénico	3,851 \pm 0,13 d	26,433 \pm 1,64 g	3,738 \pm 0,11 d		15,348 \pm 0,85 f
Ac. vanílico	0,165 \pm 0 d	0,736 \pm 0,04 g	0,232 \pm 0 e		0,749 \pm 0,01 h
Ac. cafeico	0,022 \pm 0 d	0,093 \pm 0 f	0,014 \pm 0 c		0,109 \pm 0,01 g
Ac. siríngico	0,047 \pm 0 e	0,169 \pm 0 h	0,028 \pm 0 d		0,118 \pm 0 g
Ac. p-cumárico	0,359 \pm 0,01 f	3,111 \pm 0,01 i	0,370 \pm 0 f	0,044 \pm 0 bc	1,333 \pm 0 g
o-vanillina	0,126 \pm 0,01 c			0,067 \pm 0 b	1,21187 \pm g
Ac. o-cumárico	0,023 \pm 0 d		0,022 \pm 0 d	0,011 \pm 0 b	0,113 \pm 0 f
Oleuropeina				0,106 \pm 0 b	0,843 \pm 0,01 g
Pinorresinol			0,207 \pm 0 d	0,129 \pm 0,01 b	
Luteolina				0,068 \pm 0 b	
Apigenina		1,042 \pm 0,01 e	0,220 \pm 0 d	0,119 \pm 0,01 b	

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.
 **Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Resultados y Discusión

Tabla 3.2.-5. Concentración de fenoles en las fracciones de tomate y AOVE obtenidas en las técnicas culinarias con aceite como medio de transferencia de calor. Cada valores el promedio de tres repeticiones (n=3).

Fenoles	Concentración de Fenoles ($\mu\text{g/g m.h.}$)						
	Crudo			Fritura		Rehogado	
	Tomate*	AOVE	Agua	Tomate	AOVE	Tomate	AOVE
Ac. gálico	0,039 \pm 0 b**			0,064 \pm 0 d	Trazas	0,050 \pm 0 c	
Hidroxitirosol		0,097 \pm 0 b		4,715 \pm 0,14 f	1,112 \pm 0,01 e	0,183 \pm 0 c	
Ac. dihidroxibenzóico		0,071 \pm 0 b		0,354 \pm 0,01 e	0,088 \pm 0 c	0,153 \pm 0 d	
Tirosol		0,088 \pm 0 b		0,145 \pm 0 d	0,123 \pm 0 c	0,143 \pm 0 d	
Ac. hidroxifenilacético	0,330 \pm 0 e			0,639 \pm 0,01 f	0,145 \pm 0 b	0,325 \pm 0 e	
Ac. hidroxibenzóico	0,050 \pm 0 c			0,075 \pm 0 d	0,024 \pm 0 b	0,073 \pm 0 d	
Ac. clorogénico	0,077 \pm 0 c			0,439 \pm 0,01 g	0,048 \pm 0	0,108 \pm 0 d	
Ac. Vanillico	0,132 \pm 0 d					0,132 \pm 0 d	
Ac. cafeico	0,025 \pm 0 f	0,009 \pm 0 b		0,052 \pm 0 g	0,012 \pm 0 d	0,019 \pm 0 e	0,012 \pm 0 cd
Ac. siríngico		0,019 \pm 0 d		0,071 \pm 0 f	0,017 \pm 0 c	0,024 \pm 0 e	0,015 \pm 0 b
Ac. p-cumárico	0,091 \pm 0 c	0,041 \pm 0 b		0,204 \pm 0 e	0,135 \pm 0,01 d	0,074 \pm 0 c	
o-vanillina	0,151 \pm 0,01 abc	0,118 \pm 0,01 ab		0,355 \pm 0,01 cd	0,176 \pm 0,01 abc	0,244 \pm 0,01 bc	0,548 \pm 0,63 de
Ac. o-cumárico	0,032 \pm 0 e	0,015 \pm 0 bc		0,027 \pm 0 d	0,016 \pm 0 c	0,022 \pm 0 d	0,011 \pm 0 b
Oleuropeína		0,184 \pm 0 d		0,487 \pm 0,01 f	0,183 \pm 0 d	0,314 \pm 0,02 e	0,136 \pm 0 bc
Rutina	0,179 \pm 0,01 c			0,354 \pm 0,02 d		0,197 \pm 0,01 c	
Pinorresinol		0,234 \pm 0,01 d		0,364 \pm 0,03 f	0,489 \pm 0,01 g	0,236 \pm 0,01 d	0,268 \pm 0,02 e
Luteolina	0,125 \pm 0 f			0,175 \pm 0 g	0,080 \pm 0 d	0,124 \pm 0 e	0,061 \pm 0 b
Apigenina	0,231 \pm 0,01 d						0,150 \pm 0,01 c

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.

**Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla 3.2-6. Concentración de fenoles en las fracciones de tomate, AOVE y agua obtenida en las técnicas culinarias de cocción. Cada valor es el promedio de tres repeticiones (n=3).

Fenoles	Concentración de Fenoles ($\mu\text{g/g m.h.}$)				
	Cocción		Cocción AA		
	Tomate*	Agua	Tomate	AOVE	Agua
Ac. gálico		0,194 \pm 0,01 e			0,232 \pm 0 f
Hidroxitirosol			0,163 \pm 0 c		0,962 \pm 0,05 d
Ac. dihidroxibenzóico					
Tirosol				0,085 \pm 0 b	0,729 \pm 0,01 f
Ac. hidroxifenilacético	0,278 \pm 0,01 c**	1,374 \pm 0,02 g	0,309 \pm 0,01 d		2,186 \pm 0,02 h
Ac. hidroxibenzóico		0,249 \pm 0 e			0,266 \pm 0 f
Ac. clorogénico		0,407 \pm 0,02 e	0,076 \pm 0 c		0,421 \pm 0,01 f
Ac. vanílico	0,124 \pm 0,01 c			0,063 \pm 0 b	
Ac. cafeico		0,076 \pm 0 i		0,010 \pm 0 bc	0,073 \pm 0 h
Ac. siríngico				0,019 \pm 0 d	
Ac. p-cumárico	0,075 \pm 0 c	0,418 \pm 0,01 f		0,034 \pm 0 b	0,719 \pm 0,05 g
o-vanillina	0,148 \pm 0 abc	0,854 \pm 0,02 f	0,134 \pm 0 ab	0,075 \pm 0 ab	0,691 \pm 0,02 ef
Ac. o-cumárico	0,022 \pm 0 d	0,101 \pm 0,01 f	0,023 \pm 0 d	0,011 \pm 0 b	0,121 \pm 0 g
Oleuropeina			0,167 \pm 0,01 cd	0,124 \pm 0,01 b	2,127 \pm 0,11 g
Rutina	0,148 \pm 0,012 b	1,035 \pm 0,05 e			
Pinorresinol			0,218 \pm 0,01 c	0,186 \pm 0,01 b	1,105 \pm 0 h
Luteolina				0,072 \pm 0 c	
Apigenina	0,245 \pm 0,01 de	1,127 \pm 0,01 g	0,262 \pm 0,01 e	0,115 \pm 0 b	1,039 \pm 0,05 f

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.

**Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla 3.2-7. Concentración de fenoles en las fracciones de calabaza y AOVE obtenidas en las técnicas culinarias con aceite como medio de transferencia de calor. Cada valor es el promedio de tres repeticiones (n=3).

Fenoles	Concentración de Fenoles ($\mu\text{g/g m.h.}$)						
	Crudo		Agua	Fritura		Rehogado	
	Calabaza	AOVE		Calabaza	AOVE	Calabaza	AOVE
Ac. gálico	0,027 \pm 0,002 b*			0,026 \pm 0 e		0,044 \pm 0 c	
Hidroxitirosol		0,196 \pm 0,01 b		1,479 \pm 0,1 g	0,142 \pm 0,01 b	1,355 \pm 0,06 e	0,085 \pm 0 ab
Ác. dihidroxibenzóico	0,19 \pm 0 c			0,184 \pm 0,13 d		0,179 \pm 0,002bc	
Tirosol				0,125 \pm 0,01f	0,129 \pm 0,01 c	0,167 \pm 0,01 de	0,072 \pm 0,004 b
Ac. hidroxifenilacético	0,468 \pm 0,01 b			1,049 \pm 0,01 c		0,46 \pm 0,01 b	
Ac. hidroxibenzóico	0,057 \pm 0 b			0,072 \pm 0 d		0,077 \pm 0,003 c	
Ac. clorogénico	0,076 \pm 0,001 b			0,078 \pm 0 c		0,087 \pm 0,01 b	
Ac. vanílico		0,065 \pm 0 b		0,122 \pm 0,01 d	0,065 \pm 0 b	0,134 \pm 0 c	
Ac. cafeico	0,018 \pm 0 d	0,012 \pm 0 b		0,015 \pm 0 f	0,018 \pm 0 d	0,023 \pm 0 f	
Ac. siríngico	0,022 \pm 0 c	0,013 \pm 0 b		0,027 \pm 0 f	0,013 \pm 0 b	0,028 \pm 0,002 e	0,012 \pm 0 b
Ac. p-Cumarico	0,073 \pm 0,01 c			0,085 \pm 0 g	0,096 \pm 0,01 e	0,111 \pm 0,004 f	0,080 \pm 0,002 c
o-vanillina	0,135 \pm 0,01 d	0,267 \pm 0,01 g		0,14 \pm 0,004 e	0,252 \pm 0,01 f	0,134 \pm 0,003 d	0,096 \pm 0,01 c
Ac. o-cumárico	0,099 \pm 0,01 de	0,033 \pm 0,002 c		0,103 \pm 0,004 g	0,023 \pm 0 bc	0,111 \pm 0,002 e	0,014 \pm 0 ab
Oleuropeína		0,794 \pm 0,014 f			0,144 \pm 0,003 b	0,313 \pm 0,023 d	0,221 \pm 0 c
Pinorresinol		0,538 \pm 0,02 f			0,459 \pm 0,02 c		0,292 \pm 0,01 d
Luteolina		0,123 \pm 0 e			0,114 \pm 0,004 d		0,092 \pm 0 c
Apigenina				0,233 \pm 0,01 c	0,101 \pm 0,01 b		

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.
 **Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla 3.2-8. Concentración de fenoles en las fracciones de calabaza, AOVE y agua obtenida en las técnicas culinarias de cocción. Cada valor es el promedio de tres repeticiones (n=3).

Fenoles	Concentración de Fenoles ($\mu\text{g/g m.h.}$)				
	Cocción		Cocción AA		
	Calabaza	Agua	Calabaza	AOVE	Agua
Ac. gálico	0,026 \pm 0 b*		0,056 \pm 0 d		
Hidroxitirosol			0,786 \pm 0 c		4,677 \pm 0,09 h
Ác. dihidroxibenzóico	0,184 \pm 0,13 bc		0,175 \pm 0,01 b		0,708 \pm 0,012 e
Tirosol			0,171 \pm 0,002 e		0,727 \pm 0,012 h
Ac. hidroxifenilacético	1,049 \pm 0,01 d	1,72 \pm 0,07 f	1,647 \pm 0,05 e		
Ac. hidroxibenzóico	0,072 \pm 0 c	0,377 \pm 0,01 f	0,061 \pm 0,01 b		0,283 \pm 0,02 e
Ac. clorogénico	0,078 \pm 0,001 b	0,38 \pm 0,02 d	0,084 \pm 0,003 b		0,444 \pm 0,03 e
Ac. vanílico	0,122 \pm 0,01 c		0,133 \pm 0,002 c		0,685 \pm 0,03 e
Ac. cafeico	0,015 \pm 0 c	0,073 \pm 0 g	0,02 \pm 0 e		0,084 \pm 0 h
Ac. siríngico	0,027 \pm 0 de	0,117 \pm 0,01 g	0,024 \pm 0 cd	0,013 \pm 0 b	0,124 \pm 0 h
Ac. p-Cumarico	0,085 \pm 0 d		0,092 \pm 0 e	0,045 \pm 0 b	0,912 \pm 0 h
o-vanillina	0,14 \pm 0,004 d	0,745 \pm 0,01 h	0,133 \pm 0 d	0,076 \pm 0,003 b	
Ac. o-cumárico	0,103 \pm 0,004 e	0,494 \pm 0,03 h	0,086 \pm 0,01 d	0,012 \pm 0 ab	0,254 \pm 0 f
Oleuropeina			0,266 \pm 0,01 c	0,128 \pm 0,01 b	1,463 \pm 0,09 g
Pinorresinol				0,175 \pm 0,01 g	1,084 \pm 0,04 b
Luteolina				0,076 \pm 0,01 b	
Apigenina	0,233 \pm 0,01 d				

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.

**Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

3.2.1. Compuestos Fenólicos exclusivos del aceite de oliva virgen extra (AOVE).

En la descripción del efecto de los procesos de manufactura sobre la composición de las sustancias fenólicas, ha sido seleccionada la oleuropeína junto con el hidroxitirosol y tirosol como marcadores de la alteración térmica de la calidad (Servilli et al., 2003; Attya, 2010), ya que pueden ser considerados como sustancias de referencia de las buenas prácticas de producción del AOVE (De Nino et al., 2005; 2008).

- **Oleuropeína**

En la oleuropeína, ya sea en su forma libre como de aglicona, sus isómeros y los productos de su hidrólisis, son los principales responsables del amargor en las aceitunas (Gutiérrez-Rosales and Gómez-Rey, 2003; Carrasco-Pancorbo et al., 2006).

Las concentraciones de oleuropeína cuantificadas en las diversas fracciones de este estudio alcanzaron valores entre 0,1 µg/g m.h. presentes en el AOVE recuperado del rehogado de la berenjena, y 2,12 µg/g m.h. correspondiente al agua de la cocción del tomate. (Tablas 3.2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8). Las concentraciones se estratificaron de acuerdo a la fracción analizada, de tal manera que, en las muestras de hortalizas procesadas, se desplegaron valores de intermedios a nulos. En el AOVE los valores van de bajos a nulos (en un par de casos valores altos), y en el agua de cocción encontramos los contenidos más elevados de este fenol.

En los alimentos crudos de partida, solo se cuantificó este fenol en los extractos de AOVE de los cuatro lotes incluidos en los experimentos (0,4, 0,18, 0,43 y 0,79 µg/g m.h.), y estuvo ausente de las cuatro hortalizas estudiadas, hecho previsto, pues la oleuropeína es un compuesto fenólico de presencia exclusiva en las aceitunas, (Coni et al., 2000).

La oleuropeína, junto con el lingstósido y ácido elenólico constituyen el grupo de los secoiridoides, que representan la fracción mayoritaria de los compuestos fenólicos en el AOVE (Loizzo et al., 2013). Las concentraciones de oleuropeína encontradas por nosotros en el AOVE crudo fueron inferiores a las encontradas en el aceite de la variedad Cornicabra ($7,5 \pm 6,1$ mg/Kg m.h.) por otros autores (Gómez-Alonso, Desamparados y Fregapane, 2002), pero semejantes a la

de los valores obtenidos en muestras de AOVE italianos (0,16 a 4,88 mg/Kg), en donde la variación encontrada se atribuyó a la diversidad geográfica de las muestras que constituyeron el objeto de la investigación (Carrasco-Pancorbo et al. 2006).

Las fracciones de hortaliza se enriquecieron significativamente en todos los tratamientos que incluyeron AOVE, excepto en la berenjena procesada por cocción AA. Después de cada tratamiento culinario de la berenjena, patata y calabaza la fracción de alimento alcanzó concentraciones más elevadas que las del aceite que tomó parte en el ensayo (Fig. 3.2-1).

Si se observan los datos de contenido de grasa (Tabla 2.2-1) se puede constatar que, el incremento en el contenido de oleuropeína en las muestras de hortalizas tiene una relación inversa con el contenido de humedad ($r = 0,60$), y directa con el contenido de extracto seco ($r = 0,66$) (Tabla 4.1-2). De manera que las muestras obtenidas tras la fritura mostraron mayor contenido que las del rehogado, y estas a su vez mayor que las de la cocción AA.

De hecho, fue la fritura la técnica culinaria que provocó mayor pérdida de humedad y absorción de AOVE por las hortalizas y por lo tanto mayor ganancia de oleuropeína, llegándose a encontrar concentraciones finales de 0,26 $\mu\text{g/g}$ m.h. en la berenjena, 0,49 $\mu\text{g/g}$ m.h. en el tomate, 1,19 $\mu\text{g/g}$ m.h. en la patata y 0,66 $\mu\text{g/g}$ m.h. en la calabaza. El rehogado siguió a la fritura en el caso de la berenjena (0,17 $\mu\text{g/g}$ m.h.), tomate y calabaza (0,31 $\mu\text{g/g}$ m.h.). Todas las muestras de hortalizas que fueron cocidas en medio mixto AA alcanzaron concentraciones inferiores en este compuesto fenólico salvo en el caso de la patata, donde se obtiene un valor más alto tras la cocción AA (0,80 $\mu\text{g/g}$ m.h.) que tras el rehogado.

Como se observa en la Fig. 3.2-1, en las muestras de los ensayos que no incluyeron aceite en su cocinado (agua, hortalizas crudas y hortalizas cocidas en agua), no se cuantificó oleuropeína, lo que confirma la transferencia de este fenol desde el aceite hacia la hortaliza y el agua de cocción.

En el AOVE recuperado después de la fritura, rehogado y cocción AA de los ensayos con patata, berenjena y calabaza, las concentraciones finales fueron significativamente menores desde el punto de vista estadístico ($p < 0,05$) respecto a las concentraciones cuantificadas en los aceites crudos (Tabla 3.2-1, -3 y -7).

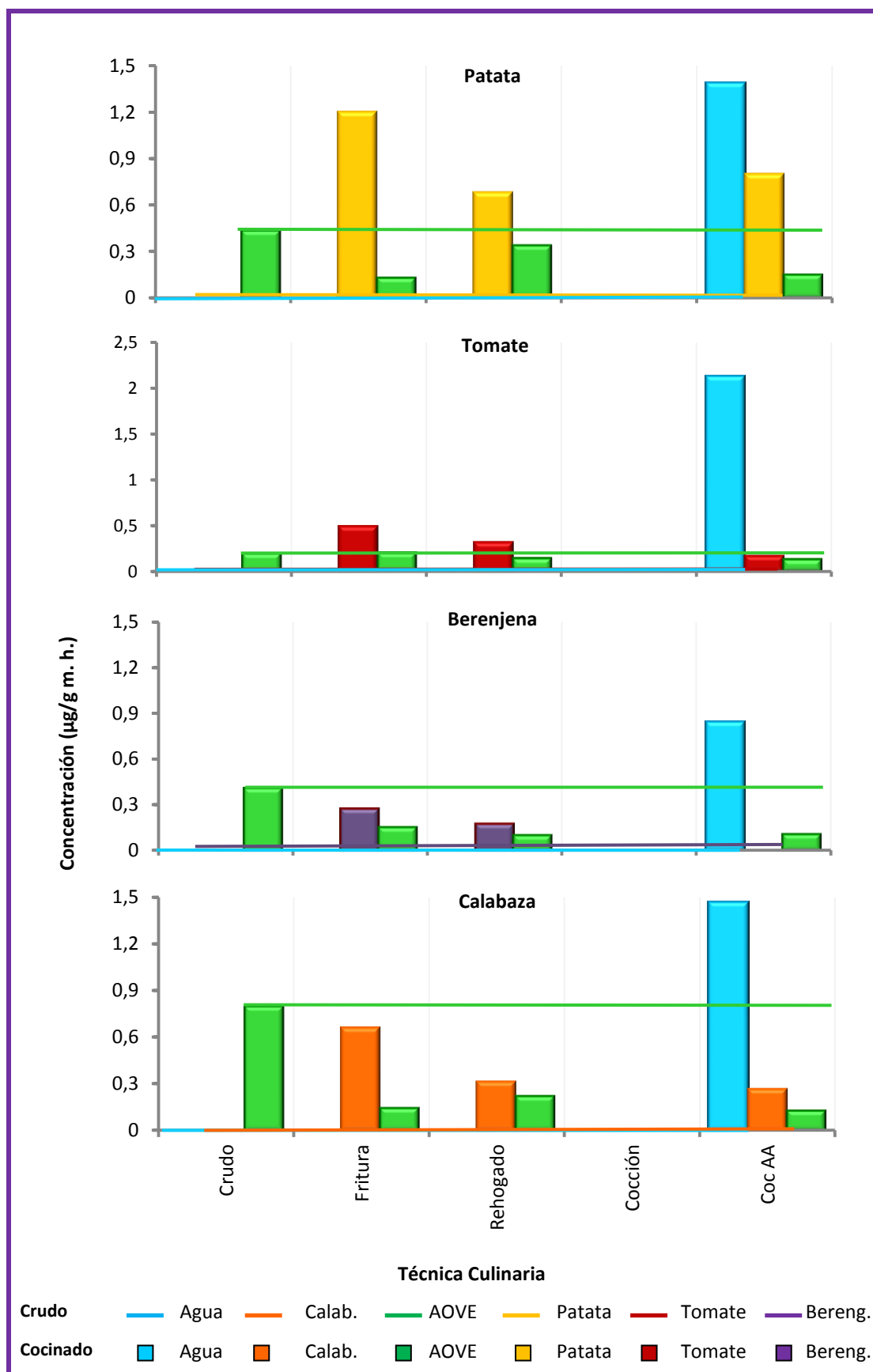


Figura 3.2-1. Concentración de oleuropeína en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

Solamente en los experimentos efectuados con tomate, la aplicación de los distintos procedimientos culinarios no ocasionaron cambios significativos respecto de las concentraciones en el AOVE crudo ($p > 0,05$), alcanzando con la fritura valores de $0,19 \mu\text{g/g m.h.}$, y durante la cocción AA llegaron a ser valores aún más bajos, con un resultado de $0,12 \mu\text{g/g m.h.}$; por su parte el rehogado arrojó unos resultados de $0,14 \mu\text{g/g m.h.}$

La reducción de la concentración de oleuropeína en el AOVE fue el resultado tanto de la hidrólisis como de la solubilización, bien hacia el agua de cocción, bien hacia la fracción de alimento.

La reducción del contenido del fenol que nos ocupa, ha sido referida en experimentos de incubación de muestras de AOVE. En estos experimentos, hubo una reducción considerable de oleuropeína incluso con la temperatura más baja de incubación (80°C) tras seis horas de tratamiento y estuvo ausente tras tres horas de tratamiento a 230°C ; a las veinticuatro horas, solo se identificaron trazas en el tratamiento más suave (Attya et al., 2010). La presencia de alimento durante los procesos térmicos contribuye al incremento de la degradación hidrolítica de los secoiridoides, probablemente favorecida por las pequeñas cantidades de agua que se desprenden en la superficie (Silva et al., 2019).

La alta solubilidad de fenoles hidrofílicos como la oleuropeína está bien establecida por diversos autores (Selvaginni et al., 2006) y este hecho favoreció la migración de los compuestos desde el AOVE hacia el agua de cocción como se observa en la Fig. 3.2-1. Siendo el agua de cocinado del tomate la que mayor incremento sufre en este fenol ($2,12 \mu\text{g/g m.h.}$).

La migración de la oleuropeína fue demostrada en un estudio sobre el reparto de sustancias fenólicas durante la esterilización de mezclas de agua/AOVE, en donde se encontró una reducción significativa de los fenoles complejos presentes en el aceite (oleuropeína y lingstrósido); este efecto fue particularmente significativo para la forma dialdehídica de la aglicona de la decarboximetil oleuropeína (70 % de reducción) (Sachii et al., 2002), que es el compuesto fenólico del AOVE con mayor hidrofiliidad a baja temperatura (Fogliano, 1999). La pérdida después del procesamiento de las formas hidrolizables de las agliconas de la oleuropeína y el lingstrósido desde el AOVE, se correspondieron con el incremento de sus productos de hidrólisis en el correspondiente volumen de salmuera.

En los experimentos de hervido AA que se llevaron a cabo con las cuatro hortalizas, el efecto de migración se incrementó por la alta relación agua - alimento (4:1 m/m) y por el incremento de la temperatura. La relación agua - alimento fue semejante a la utilizada en otros estudios (Zhang et al., 2011; Perla, Holm and Jayanty, 2012), sin embargo, la combinación de tiempo y temperatura fue menos drástica que en otros trabajos en donde con frecuencia se programan condiciones de sobrecocinado (frecuente a nivel doméstico). Este factor contribuyó a la conservación de las concentraciones de oleuropeína y del resto de fenoles pues los alimentos retienen mayor cantidad de fenoles al reducir la cantidad de agua, temperatura y tiempo de proceso (Servilli et al., 2003; Nguyen, Nagasaka and Ohshima, 2012).

- **Pinorresinol**

El pinorresinol es uno de los componentes más importantes de la fracción fenólica del hueso de la aceituna y está prácticamente ausente de la pulpa y hojas. Su presencia en el aceite se debe al rompimiento de la corteza de la semilla cuando las olivas son molturadas. La concentración de este lignano puede ser empleada como un índice de las condiciones de molturación y de la relación pulpa/semilla (Gómez-Alonso, Desamparados y Fregapane, 2002). Junto con los secoiridoides, los lignanos también son considerados como compuestos fenólicos prevalentes en la fracción polar del AOVE (Carrasco-Pancorbo, et al., 2005).

Las concentraciones medias de pinorresinol encontradas por nosotros en los aceites crudos de este trabajo ($2,94 \pm 0,09$ mg/Kg m.h) fueron más bajas que los reportados por Bakhouché et al., (2013; $4,1 \pm 0,4$ mg/Kg m.h) en aceites catalanes, y superiores a las referidos por Carrasco-Pancorbo et al., (2006) con una concentración en el AOVE picual intenso de $0,47 \pm 0,02$ g/Kg. Por su parte, Allalout et al. (2008) encontró concentraciones que variaron entre 8,1 mg/Kg en el aceite Arbosa y 13,8 mg/Kg en el aceite Arbequina, y Jacomellia et al. (2010) refirió valores medios que oscilaron entre 32,2 y 2,0 mg/Kg (Krichene et al., 2010).

Los datos de concentración de pinorresinol de todas las muestras se distribuyeron entre el valor mínimo ($0,1 \mu\text{g/g m.h.}$) cuantificado en el AOVE procedente de la cocción AA de la patata y el valor máximo ($1,75 \mu\text{g/g m.h.}$) del agua de la cocción AA también de la patata (Tablas 3.2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8).

Los datos de las muestras de las hortalizas crudas y procesadas tendieron a tomar valores comprendidos entre las concentraciones medias y bajas o nulas, los de las muestras de AOVE tomaron valores altos y se distribuyeron a lo largo de la amplitud del rango sin formar agrupaciones claras. Los del agua incluida en el experimento tomaron los valores más altos toda vez que el fenol estuvo presente (Fig. 3.2-2).

En las fracciones de hortaliza la presencia del pinorresinol se corroboró como un enriquecimiento cuando el vegetal fue tratado con técnicas culinarias que incluyeron el AOVE. El origen de este enriquecimiento por parte de las hortalizas, fue el mismo que el expuesto para la oleuropeína, y se basa en la relación (Tabla 4.1-2) con el incremento del contenido en extracto seco ($r = 0,55$), la pérdida paralela del contenido en humedad ($r = -0,73$) y el incremento del contenido de grasa ($r = 0,56$) generada por la absorción de AOVE (Kalogeropoulos, 2007).

La fritura, como en el caso anterior, es la técnica que provoca el mayor enriquecimiento de las hortalizas en pinorresinol, siendo la calabaza la hortaliza que más se enriquece en este fenol ($0,36 \mu\text{g/g m.h.}$) tras la aplicación de esta técnica culinaria. En cuanto a la cocción AA, al ser el pinorresinol un fenol hidrofílico, se produce una migración alta desde el AOVE hasta el agua de cocción. Lo mismo sucedía con la oleuropeína. Por ello en caso de utilizar esta técnica de cocinado debería de consumirse el agua de cocción a fin de evitar pérdidas en ambos fenoles (Fig. 3.2-2).

Ahora bien, al ser el pinorresinol de entre todos los fenoles del aceite el que presenta una mayor estabilidad térmica y una hidrofobicidad mas alta (Sacchi et al., 2002), el comportamiento que sufre es diferente al que experimenta la oleuropeína.

En las fracciones del AOVE recuperado después de cocinar las hortalizas por las diferentes técnicas culinarias, se puede observar una tendencia a la reducción o conservación de la concentración de pinorresinol. Es decir, en general, en el aceite recuperado después del cocinado, se encontraron valores en este fenol significativamente menores ($p < 0,05$) respecto al aceite crudo. No obstante, en dos hortalizas, el tomate y la patata, después de freírlas en el aceite procedente de la fritura, se invierte esta tendencia, aumentando la concentración en pinorresinol y con diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) respecto al aceite en crudo.

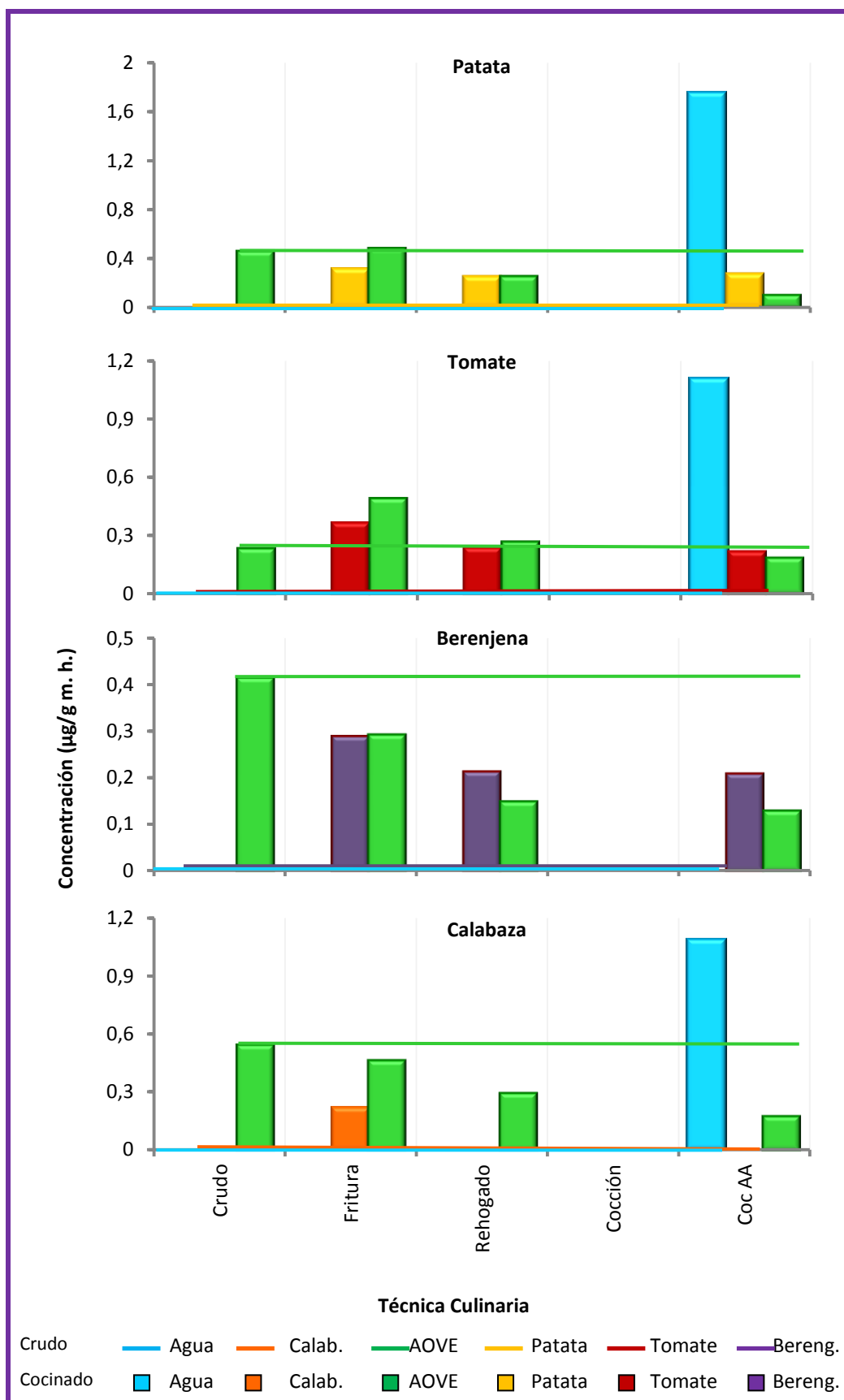


Figura 3.2-2. Concentración de pinosresinol en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenida en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

- **Hidroxitirosol**

Después de los secoiridoides, los fenoles simples son los más abundantes, y de éstos últimos el hidroxitirosol es el principal (Gómez-Alonso, Desamparados y Fregapane, 2002).

En esta investigación, el rango de valores del contenido de hidroxitirosol de las muestras en donde fue detectado osciló entre 0,08 $\mu\text{g/g m.h}$ (AOVE del rehogado de la patata) y 4,71 $\mu\text{g/g m.h}$ (tomate frito). Los valores obtenidos se agruparon de acuerdo a la fracción analizada de manera que, en las muestras de hortaliza, las concentraciones tomaron valores intermedios o nulos, en el AOVE valores bajos o nulos y en el agua altos o nulos (Fig. 3.2-3)

En las muestras crudas este fenol solo estuvo presente en el AOVE de los cuatro lotes (0,1, 0,19, 0,14 y 0,13 $\mu\text{g/g m.h}$). No se detectó en las hortalizas crudas (Fig. 3.2-3). Las concentraciones determinadas en los AOVE crudos fueron bajas, pero coincidieron con la magnitud de los datos reportados por otros autores (Lozano-Sánchez et al., 2012; Gómez-Alonso, Desamparados y Fregapane, 2002; Jacomellia et al. 2010).

En el análisis de los datos de la fracción sólida de las cuatro hortalizas, se observó, que ninguna de las muestras cocidas presentó concentraciones detectables, pero sí hubo incrementos de las concentraciones de hidroxitirosol tras la aplicación de las técnicas culinarias que incluyeron AOVE como medio de transferencia de calor (Fig. 3.2-3).

Como en los casos anteriores, son la fritura y la cocción AA donde las hortalizas experimentan un incremento mayor en hidroxitirosol, siendo la calabaza y el tomate las que más se enriquecen en este fenol cuando se les somete a fritura.

Dado a que en las hortalizas crudas no se encontraron cantidades detectables de hidroxitirosol, se puede afirmar que la totalidad del compuesto cuantificado en las fracciones de hortaliza procedió del AOVE utilizado en los ensayos. En este fenol al igual que con otros de presencia exclusiva en el AOVE (oleuropeína, pinorresinol y tirosol), la concentración final se relacionó (Tabla 4.1-2) con la cantidad de agua eliminada de los tejidos de los vegetales ($r = -0,64$) y por lo tanto de la cantidad de extracto seco ganado ($r = 0,87$) por efecto de concentración durante las técnicas culinarias.

En la Tabla 2.2-1 se observa que durante la fritura se incorporó la mayor cantidad de aceite (25,21 %) y se eliminó la mayor cantidad de humedad (38,63 %), le siguió el rehogado (grasa 10,44 %, humedad 75,07 %) y finalmente la cocción AA (grasa 5,12 %, 85,45 %).

En el presente trabajo, este fenol tendió a difundirse y con ello a enriquecer significativamente ($p > 0,05$) el agua de la cocción AA del tomate (0,96 $\mu\text{g/g m.h.}$), calabaza (4,67 $\mu\text{g/g m.h.}$), berenjena (0,99 $\mu\text{g/g m.h.}$) y de la patata (2,01 $\mu\text{g/g m.h.}$). En el agua de la cocción sin aceite no se encontraron cantidades detectables de este fenol, pero cuando se practica la cocción AA, las concentraciones de hidroxitirosol en el agua llegaron a alcanzar los valores más altos de todo el estudio, incluso iguales o superiores al de las hortalizas fritas (Fig. 3.2-3).

Los tratamientos térmicos causaron deterioro de la concentración de este fenol en las muestras del AOVE usado en las pruebas con las cuatro hortalizas. Las concentraciones cayeron hasta los valores más bajos de todo el estudio o hasta la completa eliminación. Se eliminó del AOVE en los experimentos con patata y calabaza tras la cocción AA y rehogado. En este último caso, a pesar de estar presente (patata 0,08 $\mu\text{g/g m.h.}$ y calabaza 0,08 $\mu\text{g/g m.h.}$) no fue estadísticamente diferente respecto a las muestras con contenidos de 0 $\mu\text{g/g m.h.}$ ($p < 0,05$). En los experimentos con tomate no se encontró hidroxitirosol en el AOVE del rehogado, ni en el de la cocción AA, el AOVE de la fritura del tomate fue el único aceite en donde se observó un incremento (4,71 $\mu\text{g/g m.h.}$).

Las reducciones encontradas en el aceite fueron, en parte, el resultado tanto de la disolución parcial en el agua de cocción, la termohidrolisis del compuesto y la absorción del AOVE o el fenol por la hortaliza, sin embargo, con los datos disponibles no es clara la contribución de cada factor (Yamaguchi, et al., 2001). No obstante, la baja estabilidad térmica de la molécula de hidroxitirosol hace que desaparezca por completo tras ciento cincuenta minutos a 170 y 220°C (Attya et al. 2010). Estos autores explicaron la baja estabilidad de esta molécula, del tirosol y de la oleuropeína como el resultado de la presencia del grupo catecol y de grupos activos que con el incremento de la temperatura participan en reacciones de ciclización, polimerización o hidrólisis.

Nosotros hemos encontrado que la disolución del fenol en el agua y su incorporación en la hortaliza es evidente tras observar el enriquecimiento de ambas fracciones desde la total ausencia hasta concentraciones elevadas (Fig. 3.2-3).

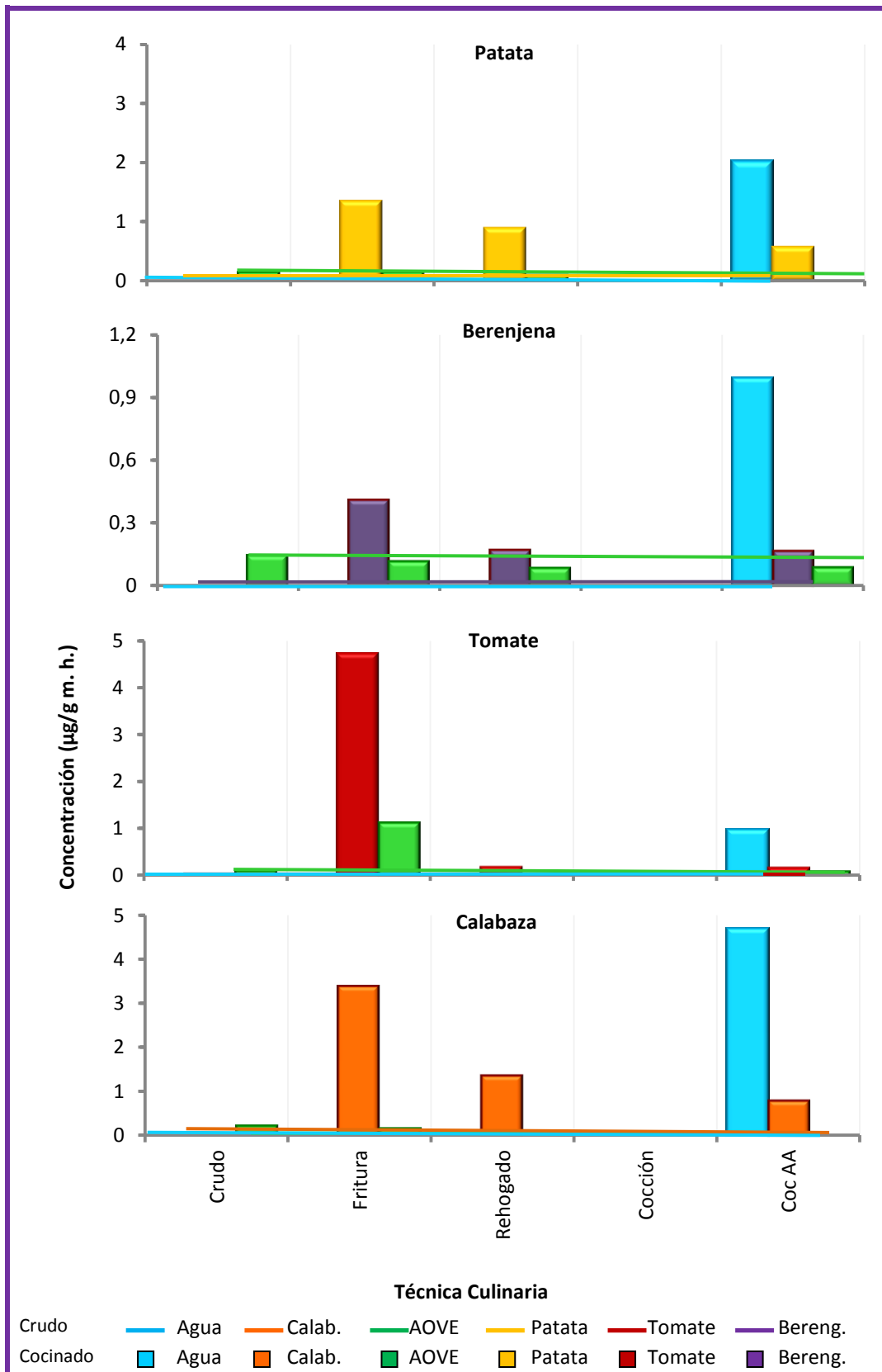


Figura 3.2-3. Concentración de hidroxitirosol en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenida en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

Tratamientos térmicos como la esterilización de AOVE enlatado causa una reducción significativa (25 a 30 %) de los compuestos fenólicos hidrolizables y del hidroxitirosol, sin verse afectado el contenido de tirosol. Al comparar esos resultados con el efecto inducido por el mismo tratamiento pero en mezclas de aceite/salmuera, todos los fenoles simples y complejos disminuyeron significativamente en la fase oleosa, pero con mayor magnitud en los compuestos derivados del hidroxitirosol que en los compuestos derivados del tirosol y que el pinorresinol. Este efecto fue particularmente significativo para la forma dialdehídica de la aglicona de la decarboximetil oleuropeína (70 %) (Sacchi et al., 2002). Lo mismo ocurrió en experimentos de enlatado de pescado en AOVE, en donde hubo reducción del tirosol y la pérdida completa de hidroxitirosol y sus derivados del aceite de llenado (Medina et al., 1998).

Las pérdidas del aceite encuentran explicación en el reparto de estos compuestos altamente hidrofílicos hacia la fase acuosa y/o su oxidación e hidrólisis asociada al procesamiento térmico. Ambos factores actúan simultáneamente, pues se apreciaron reducciones tanto en el AOVE tratado sin salmuera (10,38 %) como en el tratado con salmuera (29,87 %). Cuando se analizaron las salmueras que formaron parte del tratamiento, se encontró una mayor concentración de hidroxitirosol (197,4 % de incremento) y, adicionalmente, el glucósido del ácido elenólico como productos de la degradación de la oleuropeína y otros derivados Charoenprasert and Mitchel, 2012).

Durante el proceso de elaboración de aceitunas de mesa se ilustra de manera clara la disolución del hidroxitirosol y de otros fenoles (tirosol, oleuropeína y de la aglicona de la oleuropeína) hacia el medio líquido. En la etapa inicial de remojo en salmueras (para reducir el exceso de fenoles) y durante el enjuague, este fenol migra rápidamente hacia el agua de proceso, generando perfiles particulares en el producto terminado, con concentraciones más bajas o incluso nulas (especialmente de hidroxitirosol) que las de las aceitunas sin tratar, al mismo tiempo que los niveles en el líquido aumentan de forma significativa (Charoenprasert and Mitchel, 2012).

- **Tirosol**

El tirosol al igual que los otros tres fenoles no se detectó en las hortalizas crudas, solo en el AOVE crudo de los cuatro lotes (0,11, 0,1, 0,15 y 0,09 $\mu\text{g/g m.h.}$) (Tablas 3.2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8). Las concentraciones encontradas por nosotros en los aceites utilizados han sido más bajas que las encontradas por otros autores en aceites obtenidos con aceitunas de la misma variedad. (Krichene, et al., 2010; Bakhouché et al., 2013).

La proporción relativa entre tirosol/ hidroxitirosol reportada en este estudio fue de 0,78 $\mu\text{g/g m.h.}$. Fue más baja que la reportada en el de AOVE Cornicabara (1,8 $\mu\text{g/g m.h.}$) (Gómez-Alonso, Desamparados y Fregapane, 2002). Este valor indica que hubo mayor cantidad de hidroxitirosol que de tirosol. La razón de la amplia variación del contenido puede ser que ambos fenoles son producidos por la hidrólisis parcial de sus derivados. Adicionalmente, la elevada actividad antioxidante del hidroxitirosol, que es mucho mayor que la observada para el tirosol, favorece su degradación y desaparición (Cinquanta et al., 1997)

En este fenol también se observó la misma tendencia en todas la fracciones tratadas por alguna técnica culinaria: ocurrió un empobrecimiento del AOVE y un enriquecimiento de la hortaliza y del agua (Fig. 3.2-4), siendo de nuevo la fritura la técnica culinaria que mayor contribuye al enriquecimiento en tirosol de las hortalizas estudiadas, con concentraciones que fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) respecto a las del AOVE crudo en la calabaza (0,12 $\mu\text{g/g m.h.}$) y la berenjena (0,09 $\mu\text{g/g m.h.}$).

A la fritura le sigue el rehogado como técnica culinaria que mas enriquece en tirosol las hortalizas. Nosotros hemos encontrado que, tras aplicar esta técnica culinaria, las concentraciones fueron menores que las de la fritura en el caso de la berenjena (0,13 $\mu\text{g/g m.h.}$), calabaza (0,17 $\mu\text{g/g m.h.}$) y patata (0,15 $\mu\text{g/g m.h.}$). Las concentraciones del rehogado fueron estadísticamente equivalentes a las de la cocción AA en la berenjena y la calabaza ($p > 0,05$), pero superiores a las del tomate y patata (0 $\mu\text{g/g m.h.}$) procesadas por esta técnica.

Al igual que en el análisis de otros fenoles que son nativos del AOVE (hidroxitirosol, etc.) pero no lo son de las hortalizas de este estudio, las concentraciones de tirosol encontradas en los vegetales procesados en presencia de AOVE se originaron del aceite absorbido por el alimento, y la cantidad dependerá de los mismos factores que fueron expuestos para el hidroxitirosol.

El resultado tras la elaboración culinaria con AOVE fue que el perfil del alimento se enriqueció por la absorción del aceite, tanto cualitativamente por la incorporación de fenoles ajenos a la verdura.

La tendencia en la fracción de aceite fue a la reducción de las concentraciones de tirosol. En algunas muestras de AOVE la reducción se produjo hasta desaparecer (cocción AA de la calabaza y la patata y el rehogado del tomate), o hasta niveles más bajos que el del AOVE crudo de partida (Fig. 3.2-4).

Aunque es ampliamente referido que el tirosol y las especies afines a éste, como son la forma dialdehídica del ácido elenólico ligada a tirosol y la lingstrósido aglicona, son más estables que el hidroxitirosol y que por ello no participan de manera importante en la estabilidad del aceite durante el almacenamiento, bajo los tratamientos térmicos aplicados a las cuatro hortalizas, sí se encontró reducción de la concentración del fenol que nos ocupa en este apartado (Brenes et al., 2002).

Esa reducción también fue referida por Charoenprasert and Mitchel (2012), quienes describieron que después de haber calentado aceite de oliva virgen extra a 180°C por tres horas ya no se detectó el hidroxitirosol, y solo se encontró el 6 % de la oleuropeína aglicona, mientras que más del 70 % del lingstrósido y 30 % del contenido inicial de tirosol aún estuvieron presentes. Attya et al. (2010) citó una reducción superior al 50 % con el calentamiento a 150°C durante ciento cincuenta minutos.

En todos los casos el agua de cocción AA resultó enriquecida en tirosol (patata 0,86 µg/g m.h., berenjena 0,74 µg/g m.h., calabaza, 0,73 µg/g m.h. y tomate 0,73 µg/g m.h.). Incluso, los valores finales fueron los más altos del estudio. En el caso del agua de la cocción de la patata y berenjena no se detectó la presencia en tirosol aunque era previsible un incremento en el contenido de este fenol en las fracciones de agua y hortaliza por los fenómenos de lixiviación y absorción de aceite, respectivamente., No era factible que las concentraciones finales de las dos fracciones superara las del AOVE de partida. Sobre todo con los incrementos tan amplios que se presentaron en el agua de cocción AA (650 % berenjena, 371 % calabaza, 718 % tomate, 658 % patata) (Fig. 3.2-4).

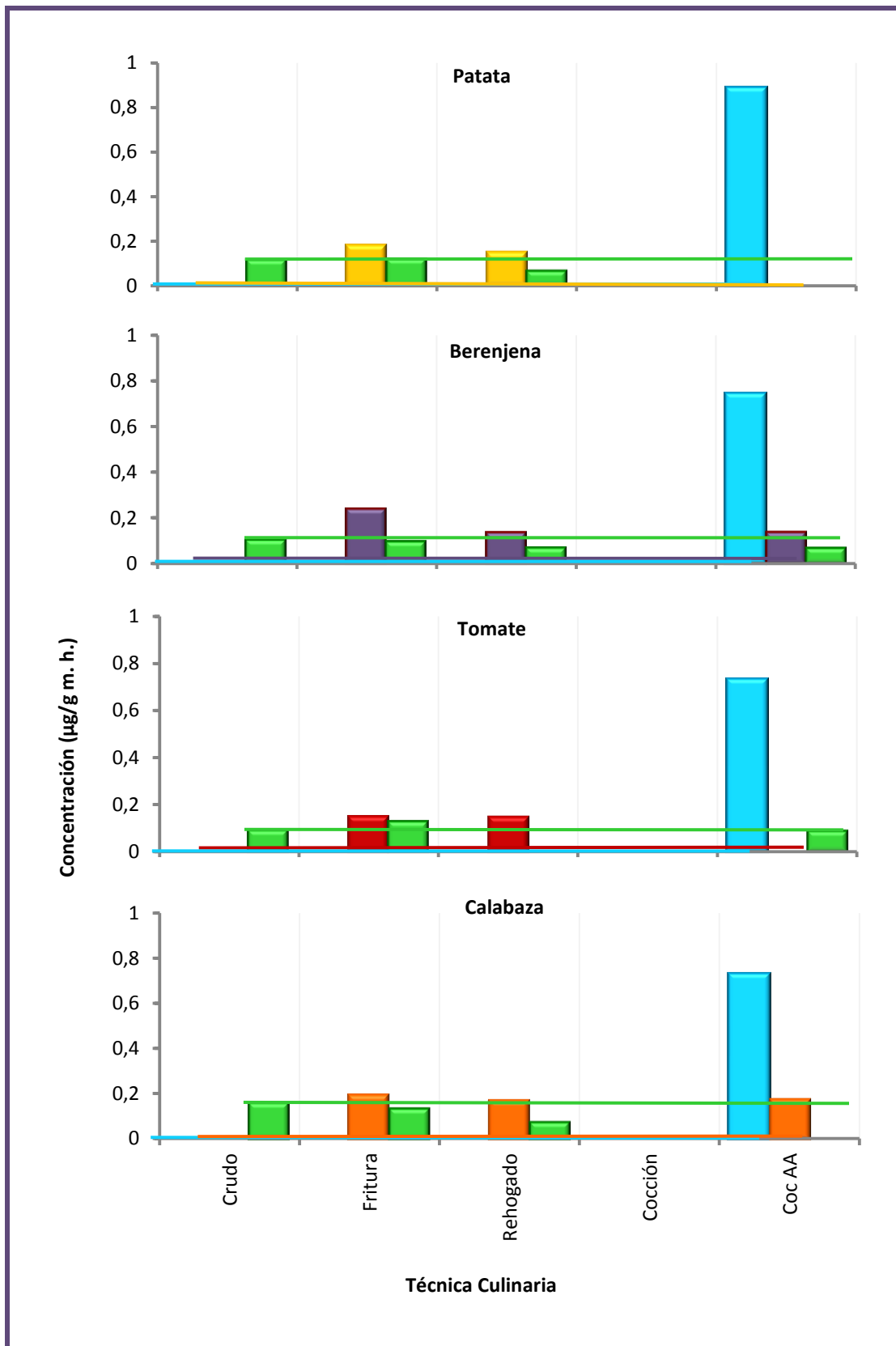


Figura 3.2-4. Concentración de tirosol en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenida en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

Brenes et al. (2002) también refirió que la suma total de tirosol que obtuvieron en técnicas culinarias de hervido con agua /aceite , fue superior en la fase acuosa que en el aceite crudo (1350 %), y observaron que tras recibir el tratamiento de hervido a presión durante treinta minutos, las formas combinadas del tirosol (forma dialdehídica del ácido elenólico y la aglicona del lingstrósido) fueron totalmente hidrolizadas y el tirosol libre fue difundido por completo, por su alta hidrofiliidad, del aceite a la fase acuosa; este efecto se vio acentuado a pH 6. Estos autores demostraron que el total de tirosol (suma del libre 2 μmol y el combinado 16 μmol) permaneció constante (27 μmol) después del hervido y que la suma total de tirosol fue más alta en el agua de cocción (7 μmol más alto) que en el aceite de partida ya que no fueron cuantificados los compuestos análogos de este fenol como el Acetato de tirosol (Rovellini y Cortessi, 2002).

Este mismo fenómeno fue observado en el caso del hidroxitirosol y sus formas derivadas, pero en este caso la cantidad total de hidroxitirosol en el agua del hervido (68 μmol) sí fue la misma que la suma de las cantidades de hidroxitirosol libre y combinado [4-(acetoxietil)-1,2 dihidroxibenzeno) en el aceite crudo; siendo las formas combinadas la forma dialdehídica del ácido elenólico y la aglicona de la oleuropeína.

3.2.2. Compuestos fenólicos exclusivos de las verduras y hortalizas.

- Ácido clorogénico

La concentración cuantificada en el AOVE recuperado de la fritura de la berenjena (0,04 µg/g m.h.) y la del agua de cocción de la berenjena (26,43 µg/g m.h.) conformaron los límites del rango de los valores del ácido clorogénico (Tablas 3.2 - 1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8).

Los valores se agruparon según la magnitud de las concentraciones en patrones que coincidieron con la fracción analizada en los experimentos de cada bloque (cada hortaliza): En la hortaliza cruda y procesada se encontraron las concentraciones de medias, en el agua los más altos del estudio y en el AOVE se detectó solo en dos casos aislados. Las concentraciones del ácido clorogénico cuantificadas en las fracciones de la berenjena fueron excepcionalmente altas en este estudio y también respecto a todos los fenoles analizados (Fig. 3.2-5).

No hemos cuantificado ácido clorogénico en el AOVE crudo, pero sí en todas las hortalizas crudas, con una concentración de 0,19 µg/g m.h. en la patata, de 0,08 µg/g m.h. en la calabaza, de 0,08 µg/g m.h. en el tomate y de 1,32 µg/g m.h. en la berenjena. Los valores cuantificados fueron inferiores a los encontrados por varios autores. En el tomate se han referido valores que fluctúan entre 0,36 a 0,46 µg/g m.h. (Vallverdú- Queralt et al., 2011a), en la berenjena es el fenol mayoritario con concentraciones entre 6 y 196 µg/g m.h. (Oviasogie, Okoro, and Ndiokwere, 2009;Lo Scalzo et al., 2010; Raigón, and Prohens. 2010.; Luthria, 2012), también lo es en la patata con concentraciones de 7,5 µg/g m.h. (Bellail et al., 2012).

Aquellas técnicas culinarias que utilizan AOVE como medio de transferencia de calor (fritura y rehogado) han provocado un aumento considerable en las concentraciones de ácido clorogénico en patata, tomate y especialmente en la berenjena con diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) respecto a las hortalizas en crudo. Tan solo en la patata no se han encontrado diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) en cuanto al contenido de este fenol entre la hortaliza frita y la rehogada (Fig. 3.2-5). No obstante, la fritura aparece como la técnica culinaria que mayor incremento provoca en el contenido en ácido clorogénico, por encima del rehogado. De corroborarse este efecto, la fritura podría ser considerada como mejora del proceso de cocinado en cuanto a la retención del fenol; sin embargo conlleva un incremento de la densidad calórica del alimento por la cantidad de aceite incorporado.

La tendencia al incremento o mantenimiento de las concentraciones de ácido clorogénico durante la aplicación de técnicas que utilizan aceite como medio de transferencia de calor coincide con lo aportado por otros investigadores. Por ejemplo, durante el salteado de brotes de bambú (Zhang et al., 2011) o patatas “Baby” con aceite de canola prensado en frío se describe un incremento en los fenoles totales, pero especialmente acentuado en las concentraciones de ácido clorogénico (Navarre et al., 2010). Hay hallazgos semejantes relacionados con la evolución del ácido clorogénico durante la elaboración doméstica referidos por Kalogeropoulos et al. (2007) quien encontró buena retención durante la fritura en superficie de patatas, pimientos y calabacines, pero una reducción de este fenol en las berenjenas.

A pesar de que ambas técnicas con AOVE incrementan la concentración del fenol en estudio, como se dijo antes, el rehogado lo hace con menor intensidad. Kalogeropoulos et al. (2007) en el mismo trabajo con fritura en superficie referido en el párrafo anterior, postula que la oxidación que experimentan estos fenoles al no estar el alimento totalmente sumergido en el aceite (como sucede en el rehogado respecto a la fritura) podría ser la causa de la reducción del contenido de fenoles totales durante las técnicas en superficie, y en particular del ácido clorogénico.

Saguy and Dana, 2003 y Rodriguez et al., 2007, han señalado que, en comparación con la fritura por inmersión, durante la fritura en superficie (en cierto modo semejante al rehogado) existe una mayor relación superficie-volumen, que conlleva el contacto de una mayor área del alimento y la grasa de fritura con el oxígeno, lo que favorece una elevada tasa de pérdida de antioxidantes por efecto de la oxidación, ya que una propiedad importante del oxígeno es que es más soluble en aceite que en agua (Jacobsen et al. 2008).

También está establecido que la temperatura ocasiona cambios en el contenido de fenoles de las hortalizas durante la fritura (Ruiz-Rodríguez et al. 2008). Durante los experimentos que fueron realizados en esta investigación, es más factible atribuir la baja magnitud de los incrementos cuantificados en el rehogado a la degradación termohidrolítica o la participación en la síntesis de flavonas, que a la pérdida de estos compuestos por lixiviación de fenoles desde la hortaliza hacia el aceite, porque la migración hacia medios polares, no se da espontáneamente cuando se trata de sustancias hidrosolubles (Fillion and Henry 1998).

La degradación del ácido clorogénico se ha observado incluso en condiciones de almacenamiento a -4°C durante cincuenta y seis días. Se han cuantificado reducciones en el contenido de ácido clorogénico de 4,4 a 3,5-3,8 $\mu\text{g}/100\text{g}$ m.h. en productos a base de tomate, señalando como causa posible, la oxidación del ácido clorogénico a O-quinonas reactivas catalizadas por la peroxidasa (Ordiozola-Serrano et al. 2009), o también por biosíntesis de flavonoles (rutina, quercetina, kaempferol) a partir del fenol que nos ocupa a través del metabolismo fenilpropanoide mediado por la Fenilalanin Amonia Liasa (Ordiozola-Serano et al., 2009b). Sin embargo, la contribución de estos mecanismos no sería posible bajo las condiciones de temperatura mantenidas durante este estudio porque superaron las temperaturas de inactivación de las enzimas referidas, que ronda entre los 70 y 80°C (Fennema, 2000).

En cuanto a los incrementos en las hortalizas fritas, el aceite no contribuyó al aumento de la concentración final de ácido clorogénico, pues ese fenol no estuvo presente en el AOVE crudo (Tablas 3.2.-1, -3, -5, -7). Por lo tanto, este incremento que experimentan las hortalizas (con excepción de la calabaza) en el contenido en ácido clorogénico tras la fritura o el rehogado puede deberse a:

- a) Un efecto de concentración del contenido de fenoles en la matriz alimentaria a causa de la eliminación de humedad que ha sido referido en apartados anteriores (C. de Sá and Rodríguez-Amaya, 2004; Provesi, Dias and Amante, 2011).
- b) Un aumento de la recuperación de estos compuestos tras el cocinado (Rajarithnam, 2013). El cocinado incrementa la disponibilidad (Navarre et al., 2010) de los fenoles a causa de la ruptura o reblandecimiento de las paredes celulares rígidas y otros constituyentes de las células vegetales (vacuolas y apoplasto), así como la descomposición de los compuestos fenólicos ligados a la fibra (celulosa y pectina) (Rakic et al. 2007), incrementando la concentración de fenoles accesibles respecto a la hortaliza cruda (Stewart et al., 2000; Oboh, Raddatz y Henle, 2008). En algunas ocasiones la concentración de fenoles individuales pueden incrementar por lisis de las estructuras supramoleculares al romper los enlaces glicosídicos entre los fenoles y el azúcar (Bunea et al. and 2008). Este es quizá el mecanismo principal en el incremento de las concentraciones de fenoles (Kalt 2005).

El mecanismo expuesto fue presentado por Blessington et al. (2010) para explicar las variaciones de fitonutrientes causadas por diferentes métodos de cocinado, como el horneado, hervido, fritura y horneado en microondas. En donde el contenido de fenoles totales no mostró ninguna diferencia entre patatas crudas y hervidas pero fue superior en la fritura y el horneado en microondas. También ha sido propuesto para el caso de las variaciones observadas en hojas verdes, brotes de bambú (Zhang et al., 2011) y alcachofas (Lutz, Henríquez y Escobar, 2011).

En cuanto a las técnicas culinarias que utilizan agua como medio de transferencia de calor, en general, la cocción en agua o en AA conservan prácticamente igual las concentraciones en ácido clorogénico de la patata, calabaza y tomate respecto a la hortaliza en crudo ($p > 0,05$) y en cambio, provoca un incremento importante en la concentración de este fenol respecto a la berenjena en crudo incluso con diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$), tanto en la berenjena cocida en agua como en la berenjena cocida mediante AA. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Mulinacci et al. (2004) en ciertas hortalizas hervidas y que atribuyeron a eventos de isomerización e hidrólisis, que dieron lugar a una redistribución sustancial de ácidos fenólicos debido a la transesterificación (Lutz, Henríquez y Escobar, 2011).

El agua de cocción de ambas técnicas de hervido se enriqueció en este fenol en todos los casos y con diferencias estadísticas significativas respecto a las hortalizas crudas ($p < 0,05$), especialmente el agua de hervido de la berenjena. Por tanto, de utilizar el hervido en agua o en AA debería de consumirse la propia agua de hervir las verduras a fin de evitar las pérdidas en ácido clorogénico. Aunque los fenoles (entre ellos el ácido clorogénico) tienen cierta actividad en las interfaces agua - aceite como resultado de contar en su estructura con oxígeno y fracciones hidrocarbonadas (Wilailuk et al, 2007), no es lo suficientemente fuerte porque contienen otros grupos funcionales como los ácidos carboxílicos que los hacen altamente hidrosolubles. Por ello sería plausible sospechar que, en una mezcla de varias fases, llámense agua, alimento y/o AOVE, los fenoles migrarán con mayor intensidad hacia el medio más polar de la mezcla.

Durante los procesos térmicos, la destrucción de la matriz alimentaria causa un incremento en la extracción de los compuestos fenólicos y con ello una mayor disponibilidad de estas sustancias que son difundidas hacia el agua de cocción en el caso del hervido (Navarre et al., 2010). La capacidad térmica del agua favorece una menor destrucción de las sustancias funcionales, por esa razón, en este estudio, las concentraciones de ácido clorogénico llegaron a tomar valores más altos aún que los del alimento procesado en ella.

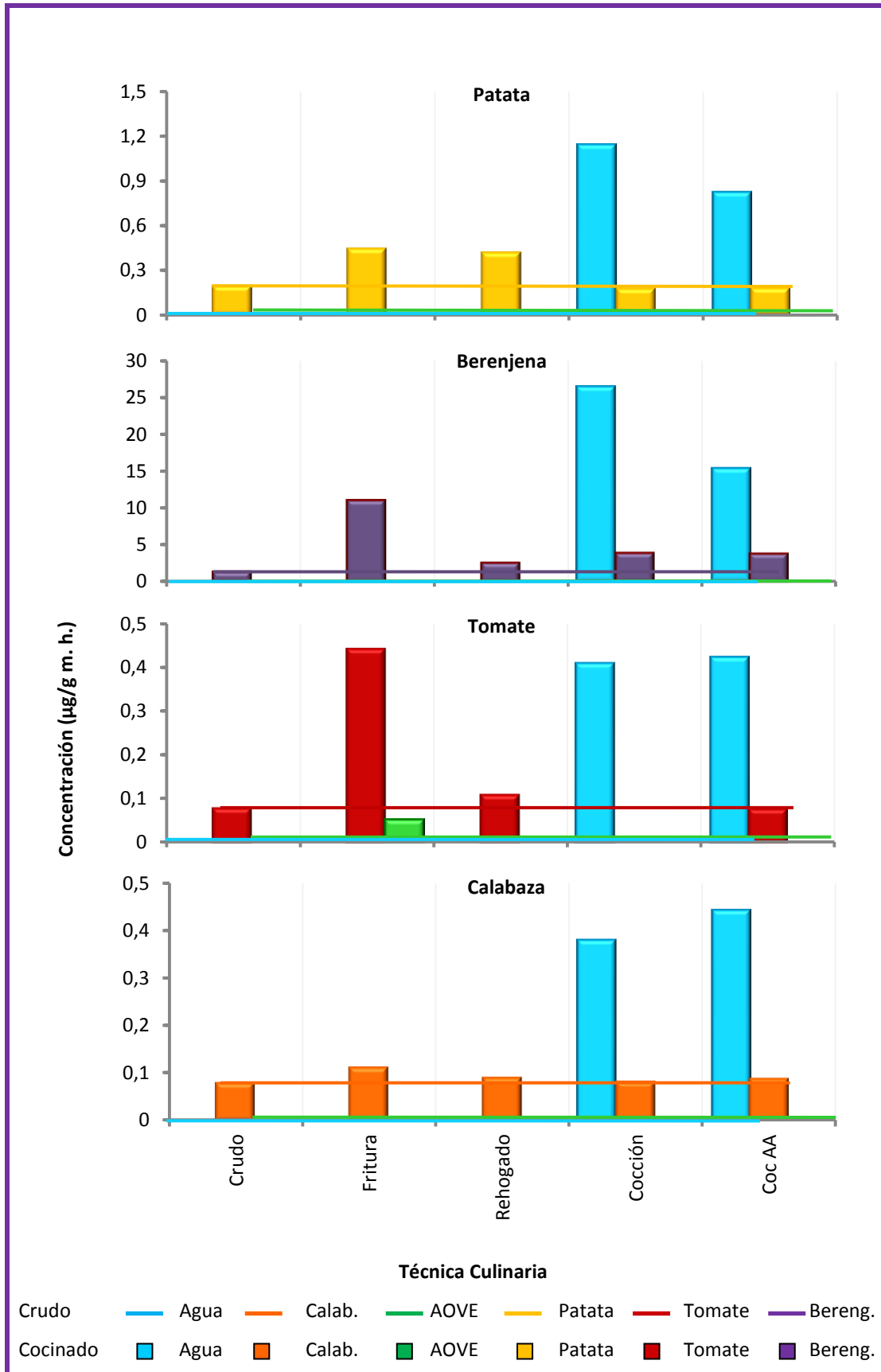


Figura 3.2-5. Concentración de ácido clorogénico en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

En el AOVE se encontró un incremento aislado en el aceite de fritura del tomate y de la berenjena, que tendría que ser confirmado ya que no es un fenol que haya sido detectado en el AOVE crudo y la alta solubilidad en agua del ácido clorogénico no es compatible con la posibilidad de que la molécula entrara por difusión desde la hortaliza en el AOVE.

Se ha observado que el agua de cocción de setas contiene entre el 70 a 85 % de los fenoles totales perdidos de las muestras cocinadas, ya que como se ha dicho antes, son compuestos solubles en agua (Kim et al., 2008; Sun et al., 2011). También fueron reportadas pérdidas nutricionales en patatas enlatadas, pero invariablemente, la pérdida fue debida a la lixiviación en el medio de cobertura y los nutrientes pudieron ser recuperados de él (Rajarithnam, 2013).

- **Rutina**

La rutina es el flavonoide mayoritario en los tomates y se presenta exclusivamente en la forma conjugada (95 %) como quercetin 3-ramnosil-glucósido (Toor, Lister and Savage, 2005). En los frutos crudos se encuentra en concentraciones que oscilan entre 0.79 a 21.80 $\mu\text{g/g}$ m.h. (Toor, Lister and Savage, et al., 2005; Vallverdú-Queralt, et al., 2011a)

La rutina solo se cuantificó en los ensayos con tomate en las muestras de las fracciones de hortaliza tanto cruda como cocinada y en el agua de los ensayos de cocción (Tablas 3.2-5 y -6). Por el contrario no se detectó en el AOVE crudo ni en el que tomó parte tras los tratamientos culinarios (Fig. 3.2-6).

La hortaliza cruda mostró una concentración de 0,18 $\mu\text{g/g}$ m.h., que no fue estadísticamente diferente a la cuantificada en el rehogado (0,19 $\mu\text{g/g}$ m.h.). En el tomate frito aumentó considerablemente (0,35 $\mu\text{g/g}$ m.h.) y en el cocido la concentración de la fracción de hortaliza disminuyó (0,15 $\mu\text{g/g}$ m.h.) de forma paralela al incremento en el agua de cocción (1,04 $\mu\text{g/g}$ m.h.). Si bien, la fritura y el rehogado provocan un aumento en las concentraciones de rutina, tan solo se han observado diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre el tomate frito y el tomate crudo. Blesington, (2010) observó un incremento del contenido de rutina en muestras de arracacha cocinadas por horneado, fritura y horneado en microondas respecto a las muestras crudas. La degradación de la rutina es inhibida casi en su totalidad a 100°C en presencia del ácido clorogénico. Murakami, et al. (2004) informó que el ácido clorogénico protege a la rutina de la descomposición pues el primero se degrada más fácilmente por ser un éster.

En cuanto a las técnicas culinarias que utilizan agua como medio de transferencia de calor, ésta se enriquece significativamente en rutina habiéndose encontrado valores de significativamente más altos ($p < 0,05$) respecto a las otras técnicas de cocinado. Estos valores no concuerdan con los encontrados en bibliografía por otros autores en donde se obtiene una disminución de las concentraciones de rutina durante el almacenamiento de productos a base de tomate a -4°C , con una disminución entre 7,2 a 10,6 % en Ketchup, de 10,3 a 12,2 % en zumo y en gazpacho (Vallverdú-Queralt et al., 2011a; 2011b, 2012).

La rutina junto con otros fenoles se degrada gradualmente durante el hervido de patatas a 100°C y mucho más rápido a 180°C . En experimentos con nabos también se encontró una elevada pérdida de flavonoides que ascendió a 64 % en el hervido convencional y 67 % en la cocción a presión (Francisco et al., 2010).

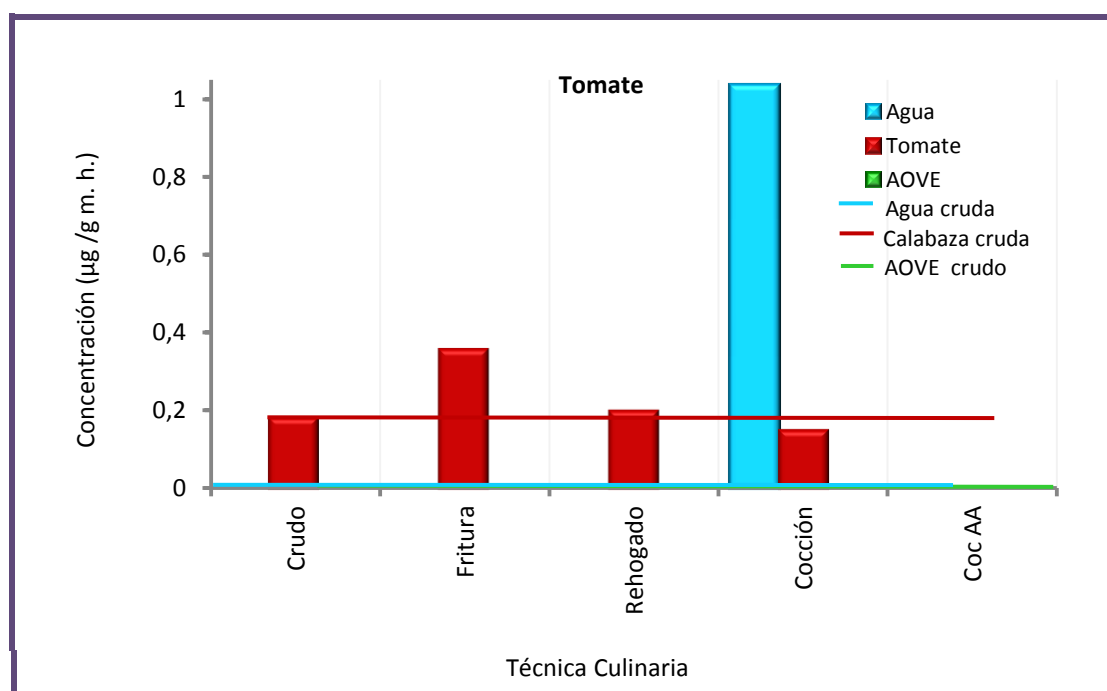


Figura 3.2-6. Concentración de rutina en las fracciones de tomate, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias ($n = 3$).

De entre los flavonoides, la rutina presenta mayor estabilidad frente a la degradación oxidativa que, por ejemplo, la quercetina. Durante el procesamiento térmico los flavonoides capturan especies reactivas de oxígeno, que derivan en la formación de estructuras quinonoides, y que a su vez dan lugar a la formación de quinonas. En el caso de la rutina, el grupo 3-hidroxi en el anillo C del flavonoide se encuentra bloqueado por una molécula de azúcar dando como resultado una mayor estabilidad frente a los procesos degradativos (Makris and Rossiter, 2000).

Resultados y Discusión

El enriquecimiento del agua de cocción como resultado de la lixiviación ha sido observado en el caso de las concentraciones de fenoles totales, sin embargo la tendencia de cada fenol puede ser variable (Podsdek, 2007).

En general, las hortalizas procesadas con aceite mostraron incrementos en las concentraciones, mientras que los procedimientos que incluyeron agua redujeron la cantidad de rutina. En todos los casos se dio un efecto de incremento de la disponibilidad de esta molécula por degradación de la estructura celular y liberación de fenoles ligados y otros fenómenos asociados que han sido ampliamente discutidos en secciones anteriores. En los tratamientos con aceite hubo un incremento de concentración por: **a)** la retención de dichos fenoles en conjunto con, **b)** el efecto de concentración de solutos por pérdida de humedad y **c)** ausencia de lixiviación hacia el aceite (no se cuantifico rutina en AOVE).

En las técnicas culinarias que incluyeron agua también se presentaron varios fenómenos: **a)** lixiviación desde la hortaliza hacia el agua dando origen al enriquecimiento observado del agua de cocción, **b)** una mayor disponibilidad por desestructuración celular, **c)** hidrólisis de los fenoles ligados a la fibra, que redundaron (b y c) en una mayor concentración en el agua de cocción respecto a la hortaliza cocida. Y finalmente, también se presentó, **d)** la degradación de los fenoles liberados acarreado con ello la reducción de las concentraciones en la hortaliza una vez cocida, y hasta desaparecer en el agua y la hortaliza cocida AA.

- **Ácido hidroxibenzóico**

El ácido 4-hidroxibenzóico es considerado como fenol a pesar de que carece de un grupo hidroxilo, con frecuencia se le encuentra en vegetales porque es uno de los componentes de la lignina; por lo tanto puede derivar, al menos parcialmente, de la degradación de ciertas zonas lignificadas de las plantas (huesos, tegumentos de las semillas, etc.) como resultado del procesamiento (Macheix et al., 1990). Su metabolismo y la evaluación de la inocuidad han sido referidos por Tremblay and Qureshi (1993) con anterioridad.

El ácido hidroxibenzóico no se ha cuantificado ni en el AOVE crudo, ni en el precedente de la fritura de las hortalizas. Por el contrario ha sido cuantificado en todas las hortalizas crudas estudiadas, aunque no se han encontrado diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) entre ellas en cuanto al contenido en este fenol. Estos valores coinciden con los referidos por diversos

investigadores que le han encontrado en frutas como la fresa y grosella, en donde abunda, con concentraciones entre 0,05 a 15 mg/Kg m.h., pero, con la excepción de estos frutos y de algunas hierbas, especias, té verde y té negro, los contenidos son bajos (Tomás-Barberán and Clifford, 2000). Este compuesto no ha sido exhaustivamente estudiado y en la actualidad no se le considera de gran interés nutricional (Manach et al., 2004).

Nosotros hemos encontrado que, en general, las técnicas que utilizan aceite como medio de transferencia de calor apenas producen un incremento en las concentraciones de ácido hidroxibenzoico entre las hortalizas fritas y rehogadas y las hortalizas crudas. Los mayores incrementos se producen en aquellas técnicas que utilizan agua como medio de transferencia de calor, resultando especialmente enriquecida el agua tras la cocción de berenjena, patata y calabaza, tanto cuando se realiza en agua como en AA, y con diferencias estadísticas ($p < 0,05$) respecto a la fritura y el rehogado (Fig. 3.2-7).

- **Ácido dihidroxibenzoico**

El ácido dihidroxibenzoico o protocatequico es un glucósido del ácido 4-hidroxibenzoico y, junto con éste, es uno de los constituyentes de la lignina. Puede detectarse como un ácido libre en algunas frutas o después de ser liberado durante el procesamiento de frutas y verduras, aunque como regla general se presenta en forma de conjugados (Tomás-Barberá and Clifford, 2000).

Fue clasificado en el grupo de compuestos fenólicos exclusivos de las verduras y hortalizas por no haber sido detectado en el aceite crudo en los experimentos de tres de las cuatro hortalizas estudiadas.

En esos tres bloques de ensayos se repitió la tendencia de reparto de fenoles exclusivos de las hortalizas expuesto para el caso del clorogénico y la rutina. Pero, al haberlo cuantificado en el AOVE crudo del bloque de experimentos con tomate (también es un fenol propio del AOVE) (Boskou, 2004) y estar ausente en la hortaliza cruda, era predecible que, en ese bloque específico de ensayos con este vegetal, la dinámica de intercambio del fenol fuera la misma que se expuso para los fenoles exclusivos del AOVE en la sección 3.2.1.

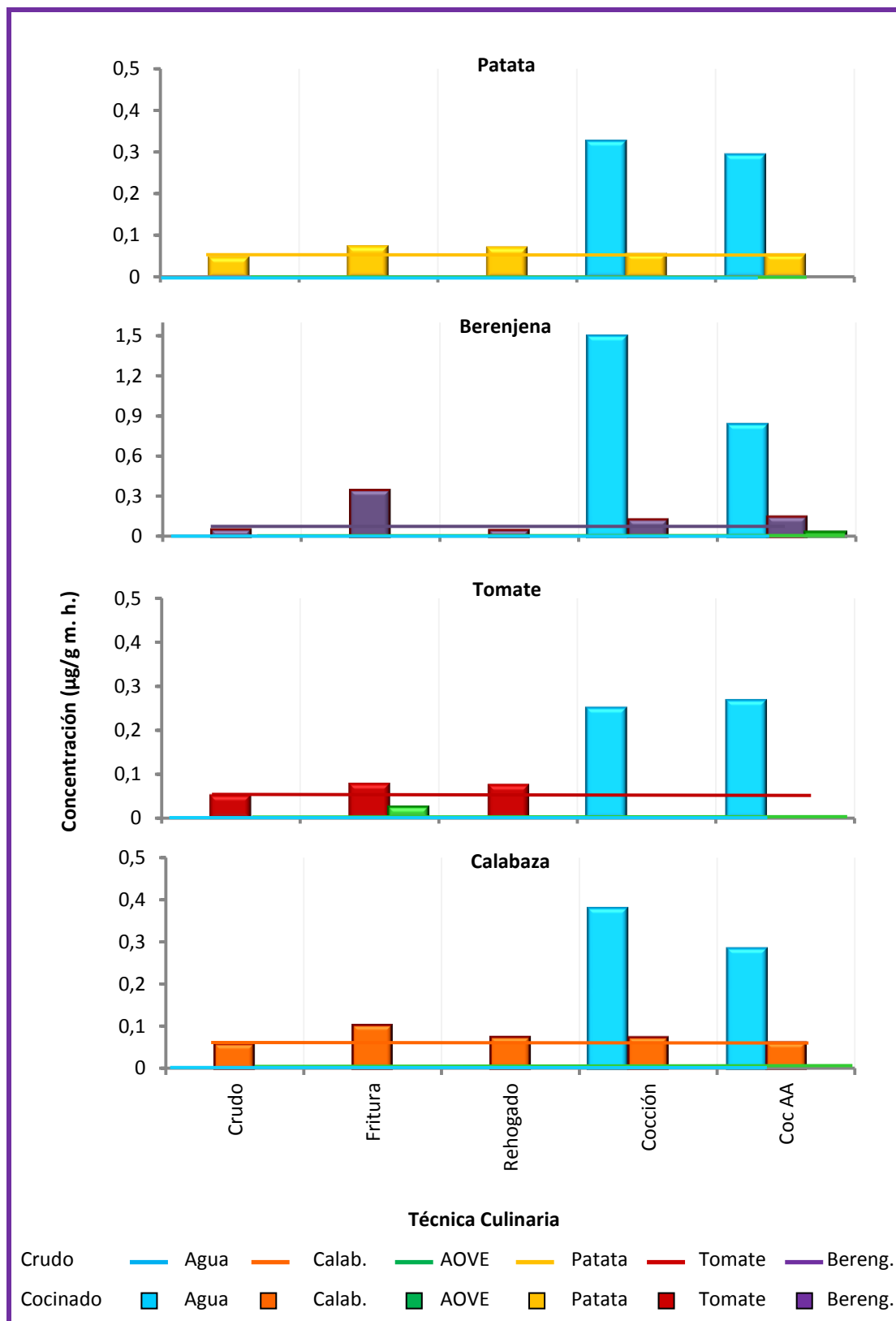


Figura 3.2-7. Concentración de ácido hidroxibenzoico en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

El contenido de ácido dihidroxibenzoico en las plantas comestibles generalmente es muy bajo, con la excepción de algunos alimentos que son fuente importante como el rábano negro o los frutos rojos, en donde se han reportado concentraciones entre 3 – 68 mg/Kg m.h. (Manach et al., 2004). De hecho y como se puede observar en la Fig. 3.2-8, las concentraciones del ácido dihidroxibenzoico en las muestras de hortalizas estudiadas por nosotros son muy bajas y con valores que oscilan entre los 0,134 µg/g m.h. de la berenjena y los 0,19 µg/g m.h. de la calabaza.

El ácido dihidroxibenzoico sigue un comportamiento muy similar al ácido hidroxibenzóico. La fritura y el rehogado aumentan ligeramente la concentración inicial de este fenol en las hortalizas objeto de nuestro estudio. Aunque los mayores incrementos en la concentración y con diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) se producen al cocinar las hortalizas usando el agua como medio de transferencia de calor. Ahora bien, no es la hortaliza la que se enriquece en ácido dihidroxibenzoico, sino la propia agua de cocción de la misma. Este hecho resulta muy significativo ya que el agua de cocción de las hortalizas deberá ser consumida a fin de no desperdiciar el contenido en ácido dihidroxibenzoico o en cualquiera de los fenoles de este apartado.

Hay que tener en cuenta que, durante el análisis por HPLC de un extracto de canela se refirió que el ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzóico) eluyó junto con el dihidroxifenilacético. Éste, es un factor que puede provocar la sobreestimación de ambos ácidos (Variyar and Bandyopadhyay, 1995).

Aunque el ácido gentísico es poco común, se ha encontrado en los frutos de solanáceas como el tomate, berenjena y el pimiento, también se le detecta en cucurbitáceas como el melón y pepino (Belitz and Grosch, 1987). En nuestra investigación se trabajó con tres solanáceas (tomate, berenjena y patata) y una cucurbitácea (calabaza), por ello este evento se plantea como una posibilidad más que como un hecho.

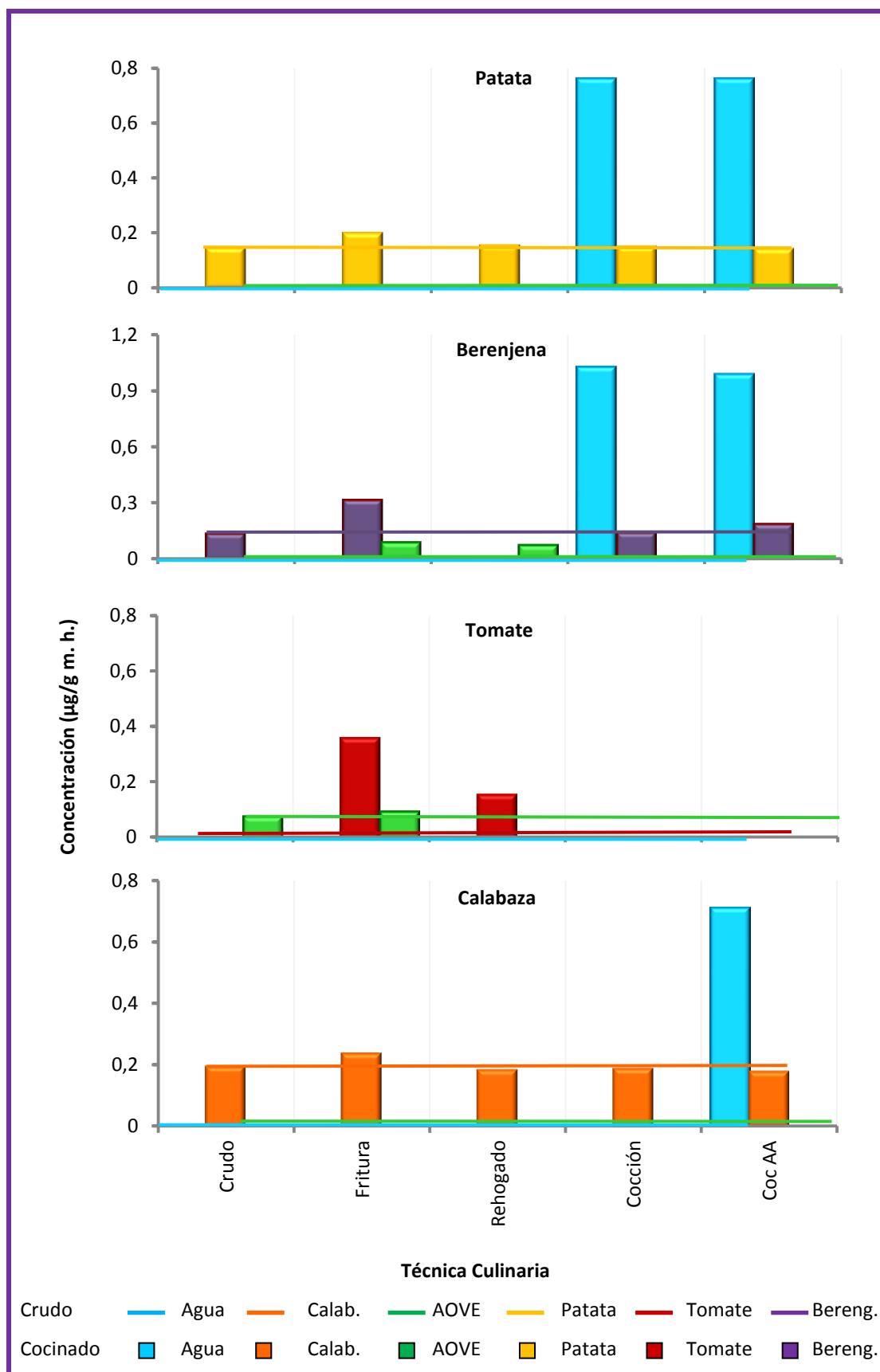


Figura 3.2-8. Concentración de ácido dihidroxibenzoico en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

- **Ácido hidroxifenilacético**

Este fenol sigue una tendencia parecida a los fenoles estudiados en este apartado. No se ha detectado en el AOVE crudo y sí en las hortalizas, con una concentración media que oscila entre los 0,201 $\mu\text{g}/\text{m.h.}$ en la patata y 0,468 $\mu\text{g}/\text{g m.h.}$ en la calabaza. En general la fritura y el rehogado aumentan ligeramente el contenido en este fenol siendo especialmente importante este incremento en el tomate y calabaza, con unos valores de $p < 0,05$ estadísticamente significativos respecto a las concentraciones que presentan ambas hortalizas crudas.

En las técnicas culinarias de cocción en agua (Fig. 3.2-9) el comportamiento de las hortalizas es muy diferente. Mientras que la cocción tanto en agua como en AA incrementa el contenido en este fenol en la calabaza y con diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) respecto a la hortaliza cruda, en el tomate cocido se produce una disminución en la concentración aunque no resulta estadísticamente significativa. Por su parte, la berenjena cocida no experimenta cambios importantes en la concentración de ácido hidroxifenilacético respecto a la berenjena cruda; y en la patata, tanto cocida en agua como cocida en AA, no se detectó este fenol.

Como sucede con el resto de los fenoles de este apartado, el agua de cocción resulta especialmente enriquecida en este fenol sobre todo cuando se cuece calabaza, tomate y berenjena y con valores significativamente superiores ($p < 0,05$) a los encontrados en las hortalizas crudas.

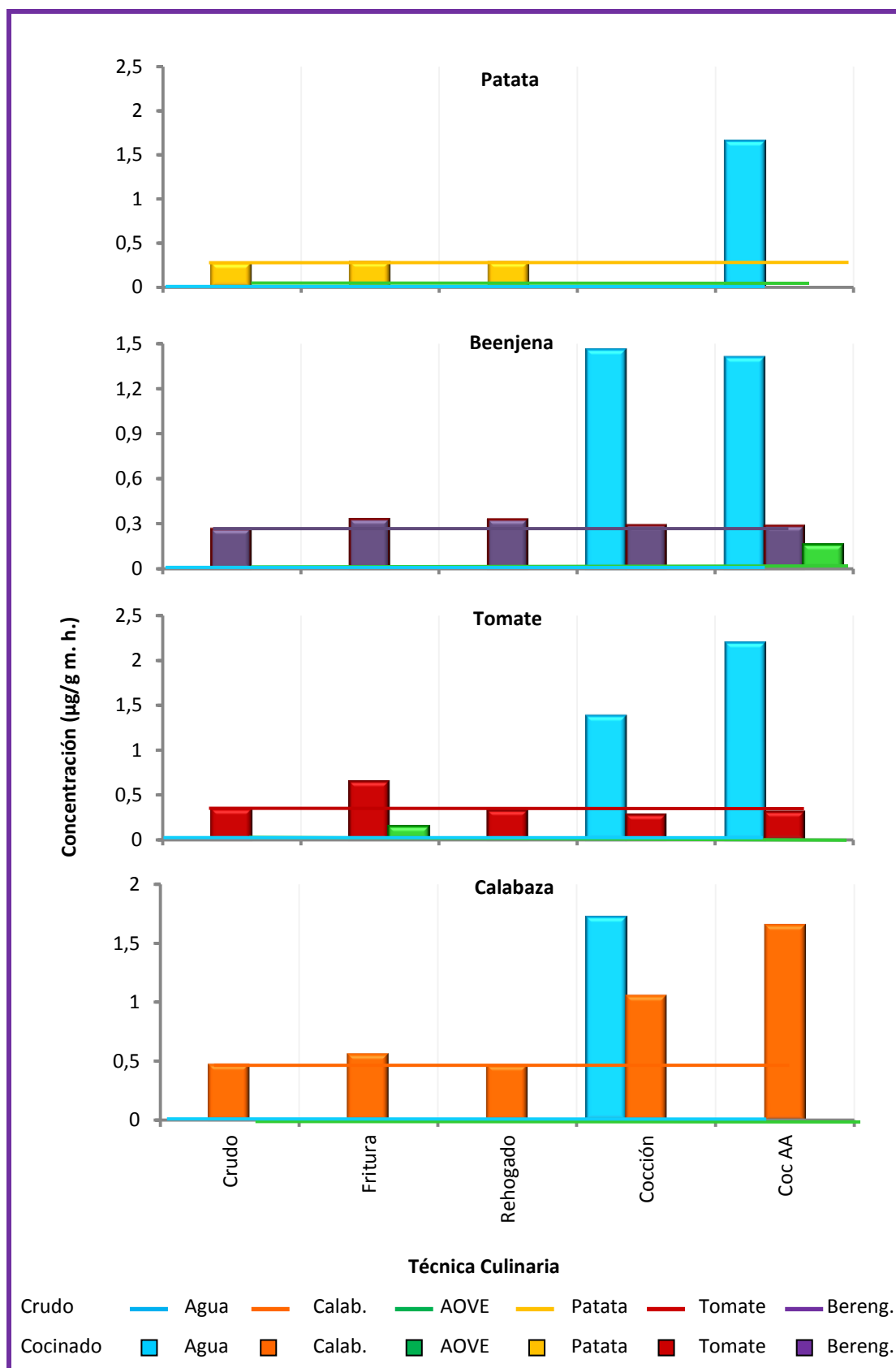


Figura 3.2-9. Concentración de ácido hidroxifenilacético en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

3.2.3. Compuestos fenólicos de presencia tanto en aceite de oliva virgen extra como en hortalizas.

- o-Vanillina

Este fenol forma parte de la fracción no polar del aceite de oliva virgen extra; también se le encuentra en la cáscara de la patata, en resinas aromáticas y en plantas de la medicina oriental (Cordano et al., 2002). Asimismo fue detectado en todas las hortalizas crudas analizadas por nosotros con valores medios de 0,14 $\mu\text{g/g}$ m.h. para calabaza, berenjena y tomate hasta 1,70 $\mu\text{g/g}$ m.h. en la patata (Tabla 3.2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8).

En las muestras de hortaliza, la tendencia de las concentraciones tras la aplicación de los tratamientos culinarios varía dependiendo de la misma. (Fig. 3.2-9). Mientras que la fritura del tomate produce aumentos estadísticamente significativos ($p < 0,05$) respecto a la hortaliza cruda, en la berenjena y calabaza, hay una tendencia a la disminución en la concentración de este fenol, sin significancia estadística. En cuanto a la patata, existen diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre las muestras en crudo y la patata frita con una disminución notable en el contenido de o-vanillina tras la aplicación de la fritura. Por su parte, el rehogado produce efectos contrarios a la fritura en el caso de las berenjenas y de la patata, con variaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a las mismas hortalizas crudas.

De los experimentos de fritura en superficie realizados por Kalogeropoulos, et al. (2007), no se desprendieron incrementos generalizados de la concentración de vanillina en las cuatro hortalizas que ensayó en dos modalidades (rebozadas y sin rebozar en mezcla de harina y agua), a pesar de que el AOVE crudo sí lo presentó. Esta tendencia es opuesta a los incrementos de la concentración de o-vanillina encontrados durante la fritura y el rehogado de este trabajo.

No se puede descartar la posibilidad de que las hortalizas que aquí se incluyeron hayan incorporado la o-vanillina contenida en el AOVE crudo, pues en la sección 3.2.1 (Compuestos fenólicos exclusivos del aceite de oliva virgen extra) se ha probado que siempre existe migración de fenoles durante la fritura desde el aceite hacia la hortaliza y se ha hecho la consideración de que, la magnitud del incremento estará limitado por la estabilidad térmica del fenol y por su habilidad como antioxidante.

Sin embargo, al haberse presentado este compuesto en las hortalizas crudas, también tuvieron lugar, simultáneamente, los fenómenos asociados con el reparto de fenoles expuestos en la sección 3.2.2 (Compuestos fenólicos exclusivos de las verduras y hortalizas), es decir, un incremento de las concentraciones por una mayor disponibilidad de sus propios fenoles debido a la lisis de estructuras celulares, por hidrólisis de los fenoles ligados a la fibra (Nackz and Shahidi, 2004), y/o por un efecto de concentración de solutos originado de la pérdida de humedad característica de la fritura.

En el caso de fenoles presentes tanto en el aceite como en la hortaliza cruda que nos ocupa ahora, se puede postular: que las concentraciones finales en las hortalizas son el resultado de una combinación de factores que incluyen tanto el efecto de incremento (absorción, mayor disponibilidad, concentración), como un efecto de reducción (termohidrólisis isomerización y la oxidación), que será más acentuado cuanto más escaso y menos estable sea el compuesto (Takenaka et al., 2006). Cuando el efecto de hidrólisis, isomerización y oxidación iguala el de incremento, entonces las concentraciones se mantendrán sin cambio aparente.

Al utilizar agua como medio de transferencia de calor, el contenido en o-vainillina de las verduras apenas se modifica, con excepción de la patata y berenjena que experimentan una disminución tras el hervido, especialmente en el sistema AA con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Para estas verduras, el agua de cocción se enriquece significativamente en este fenol. Mucho se ha argumentado en la bibliografía científica que analiza los efectos del cocinado doméstico en relación al efecto negativo del hervido sobre los compuestos polifenólicos (Danesi and Bordoni, 2008), toda vez que se considera el uso exclusivo de la hortaliza cocida en la alimentación humana y se asume el desperdicio del agua de cocción.

Es conveniente que el ítem se analice desde un punto de vista integral en donde se considere el líquido como parte del alimento, pues, es en éste, es donde se encuentra un alto porcentaje no solo de los fenoles solubles nativos del alimento crudo, sino también de los fenoles originalmente ligados a la estructura celular (Nguyen, Nagasaka and Ohshima, 2012), con la ventaja de poseer como valor añadido, mayor accesibilidad a los fenoles inicialmente inaccesibles para su absorción en el tracto intestinal, y además sin la excesiva carga calórica que aporta la grasa absorbida por los alimentos fritos.

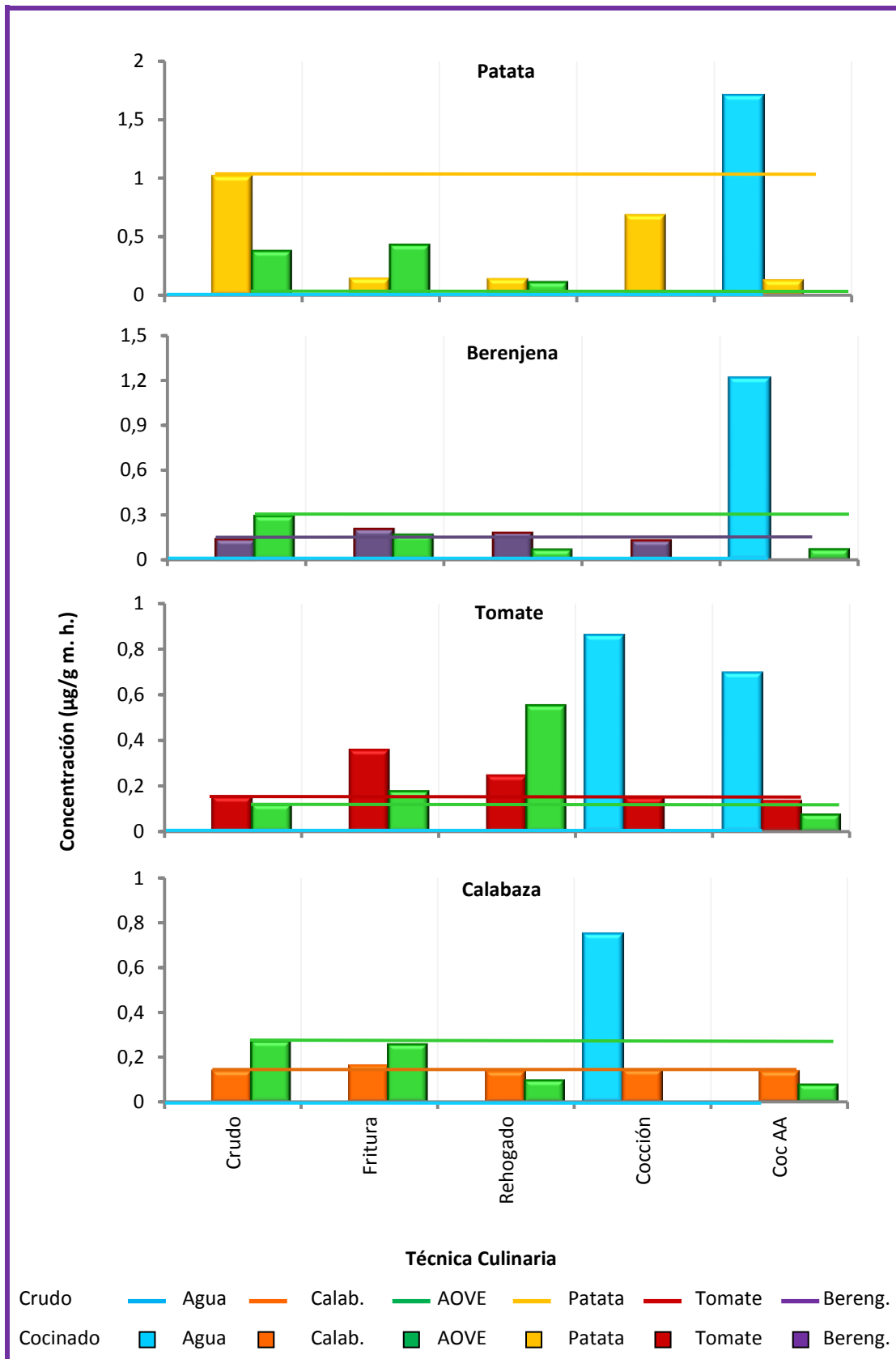


Figura 3.2-9. Concentración de o-vanillina en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n =3).

En cuanto al aceite recuperado de los ensayos, es el rehogado la técnica culinaria que mayores modificaciones produce en la concentración inicial de o-vainillina. La tendencia es provocar una disminución con diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) en todas las hortalizas, excepto en el tomate. Para esta hortaliza, el aceite procedente de su rehogado experimenta una ganancia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la concentración de este fenol con relación al que tenía el aceite de partida.

- **Acido caféico**

El ácido caféico puede considerarse como un representante común de los fenoles simples en los vegetales (Lutz, Henríquez y Escobar, 2011). Es un compuesto del grupo de los ácidos hidroxicinámicos, junto con el ácido clorogénico y ferúlico, y en conjunto, son objeto de mucho interés porque contribuyen con una proporción significativa del total de fenoles ingeridos en una dieta normal, amén de ser absorbidos inmediatamente en el tracto digestivo (Vallverdú-Queralt et al., 2010; 2011a). Pueden presentarse en forma de ésteres simples.

La concentración máxima de ácido caféico fue de 0,11 $\mu\text{g/g}$ m.h. y la más baja de 0,01 $\mu\text{g/g}$ m.h., estos valores fueron cuantificadas, en el agua de cocción AA de la berenjena y en el AOVE recuperado de la fritura de la patata, respectivamente (Tablas 3.2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8).

Este fenol fue detectado en todos los alimentos crudos y en el AOVE. En el tomate con 0,03 $\mu\text{g/g}$ m.h., calabaza 0,02 $\mu\text{g/g}$ m.h., berenjena 0,01 $\mu\text{g/g}$ m.h., patata 0,02 y en el AOVE de los cuatro lotes con una concentración de 0,01 $\mu\text{g/g}$ m.h., (Fig. 3.2-10).

Valverdú-Queralt et al. (2011b) reportó concentraciones inferiores a a 1 $\mu\text{g/g}$ en diversos cultivares de tomate y de 1,39 a 13 $\mu\text{g/g}$ m.h. en productos derivados como gazpachos (Vallverdú-Queralt et al., 2012). En cultivares de patata el contenido varió 2,59 y 42,24 mg/100g m.s. (aproximadamente a 4,24 mg/Kg m.h.) y fue el de menor concentración de entre todos los fenoles (Bellail et al., 2012). En el AOVE se ha detectado en concentraciones 145 $\mu\text{g/l}$ en aceite picual (Carrasco-Pancorbo et al., 2004) y de 0,01 mg/100g (Kalogeropoulos et al., 2007).

En general, la fritura y el rehogado provocan un aumento en la concentración inicial de ácido cafeico de las hortalizas estudiadas, siendo especialmente significativo ($p < 0,05$) para el tomate y la berenjena. Los resultados obtenidos por otros autores concuerdan con los incrementos encontrados en las hortalizas tras la aplicación de la fritura y el rehogado en este estudio. Por ejemplo Bellail et al. (2012) refirió un incremento significativo de los ácidos fenólicos individuales en patatas de 14 variedades, que fue superior en la fritura respecto al horneado, hervido y horneado en microondas.

En relación a la cocción en agua, tras el cocinado, la reducción de la concentración fue significativa desde el punto de vista estadístico ($p < 0,05$) en el tomate, pero no lo fue ($p > 0,05$) en la patata ni en la calabaza, por lo que se asumió que en estas dos hortalizas, se mantuvieron sin cambio el contenido de este compuesto, respecto al valor cuantificado en la hortaliza sin procesar. Sólo en la berenjena se observó un valor más alto ($0,02 \mu\text{g/g m.h.}$) y la diferencia, además, sí fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

En las fracciones de hortalizas cocidas en medio AA, este fenol fue eliminado por completo del tomate. Las concentraciones se mantuvieron sin cambio por ausencia de diferencias estadísticas significativas en la berenjena y la patata ($0,16 \mu\text{g/g m.h.}$) y aumentaron significativamente ($p < 0,05$) en la fracción de calabaza.

Algunos casos de incrementos de la concentración de ácido cafeico con el hervido son el reportado por Lutz, Henríquez y Escobar (2011) en alcachofas, con incrementos de entre 2 a 4 veces la concentración original, o el encontrado por Das et al. (2011) en berenjenas hervidas (2,6 veces), aunque Lo Scalzo et al., (2010) mencionó, que en su caso, las berenjenas hervidas mostraron un valor semejante al de las muestras crudas como resultado de la descomposición parcial del ácido cafeico.

Por el contrario Pedreschi et al. (2011) cuantificó una reducción de este fenol en tubérculos de arracacha, y Tudela et al. (2002) encontró en patatas que, solo la mitad del ácido cafeico y sus derivados fueron retenidos después de la cocción al vapor, y que solo un tercio de la cantidad original fue detectada en el producto hervido.

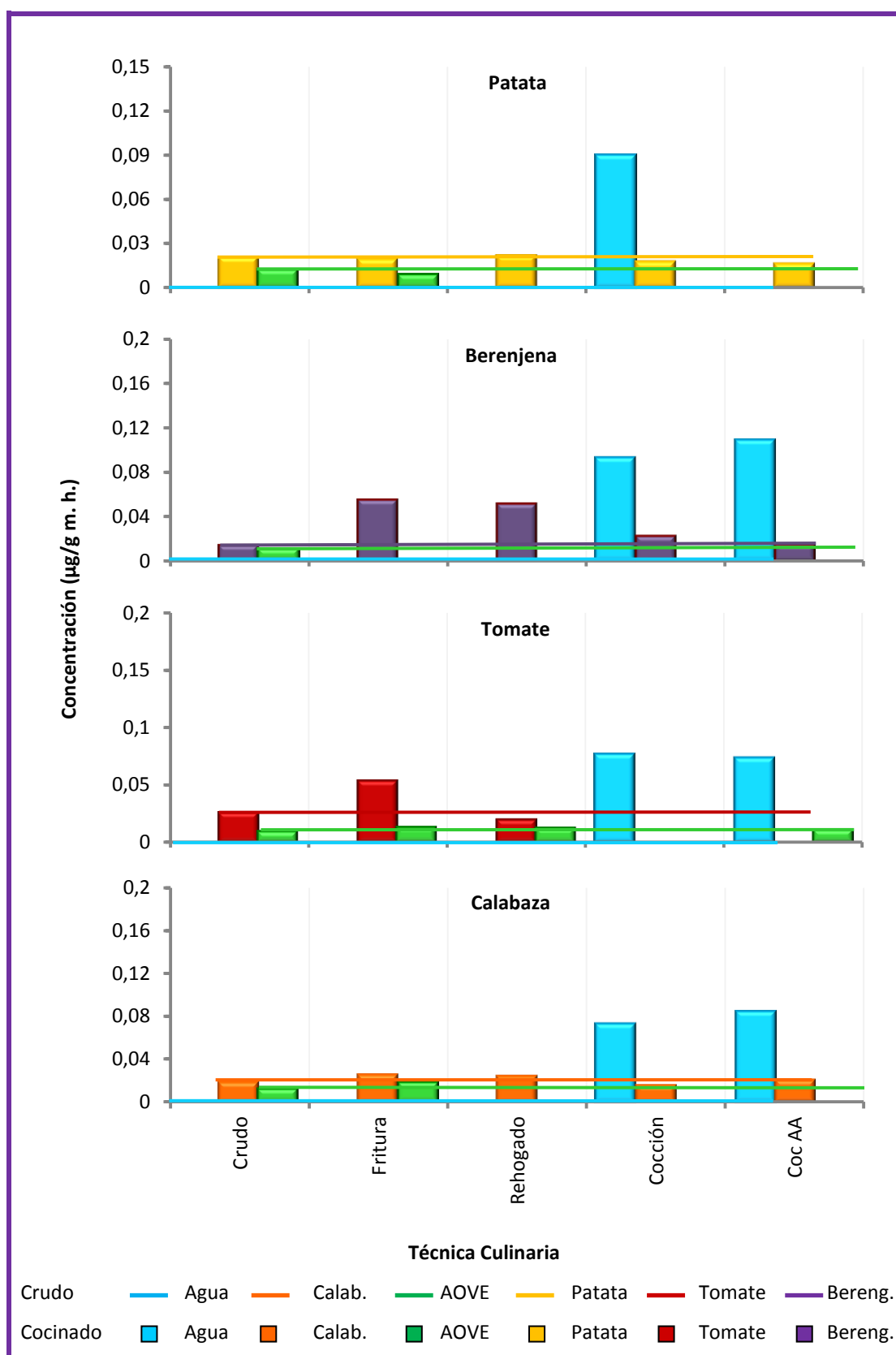


Figura 3.2-10. Concentración de ácido cafeico en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n=3).

En el AOVE incluido en los ensayos, fue más frecuente encontrar concentraciones menores que en el aceite crudo después de la aplicación de las técnicas culinarias. En el aceite recuperado de la fritura, las concentraciones se redujeron de manera estadísticamente significativa respecto al contenido de este fenol en el aceite crudo en el caso de la patata, desapareciendo por completo en el caso de la berenjena. Se mantuvo constante en el aceite de la fritura con tomate y hubo un incremento excepcional y significativo en el procesamiento de la calabaza.

Nuevamente, el agua resultó enriquecida en las dos técnicas de cocinado en las que se utiliza como medio de transferencia de calor (cocción en agua y cocción AA), exceptuando el agua de cocción de la patata del sistema AA en donde no fue detectado (Fig. 3.2-10).

- **Ácido o-cumárico**

Este compuesto pertenece al grupo de ácidos fenólicos, se constituye como uno de los derivados del ácido cinámico junto con el ácido caféico, p-cumárico, ferúlico, cinámico y sinápico (Carrasco-Pancorbo et al., 2005; Boskou, 2009).

Las concentraciones del ácido o-cumárico se mantuvieron en el rango establecido entre el mínimo valor cuantificado en el AOVE del rehogado del tomate (0,01 $\mu\text{g/g m.h.}$) y el máximo del agua de cocción de la patata (0,63 $\mu\text{g/g m.h.}$) Se detectó en todas las hortalizas y en el AOVE crudo de los cuatro lotes (Tablas 3.2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8).

Patata y tomate siguen la misma tendencia frente a la fritura y el rehogado. Ambas técnicas culinarias aumentan significativamente ($p < 0,05$) la concentración en ácido o-cumárico de estas dos verduras respecto a las verduras crudas. En cuanto a la calabaza, la fritura provoca un aumento en su contenido inicial, con un valor de $p < 0,05$, mientras que el rehogado no afecta prácticamente al contenido inicial que tiene esta verdura en este fenol. En cuanto a la berenjena, la fritura la mantiene sin cambios significativos ($p > 0,05$) y el rehogado tiende a incrementar significativamente el contenido inicial de la verdura cruda.

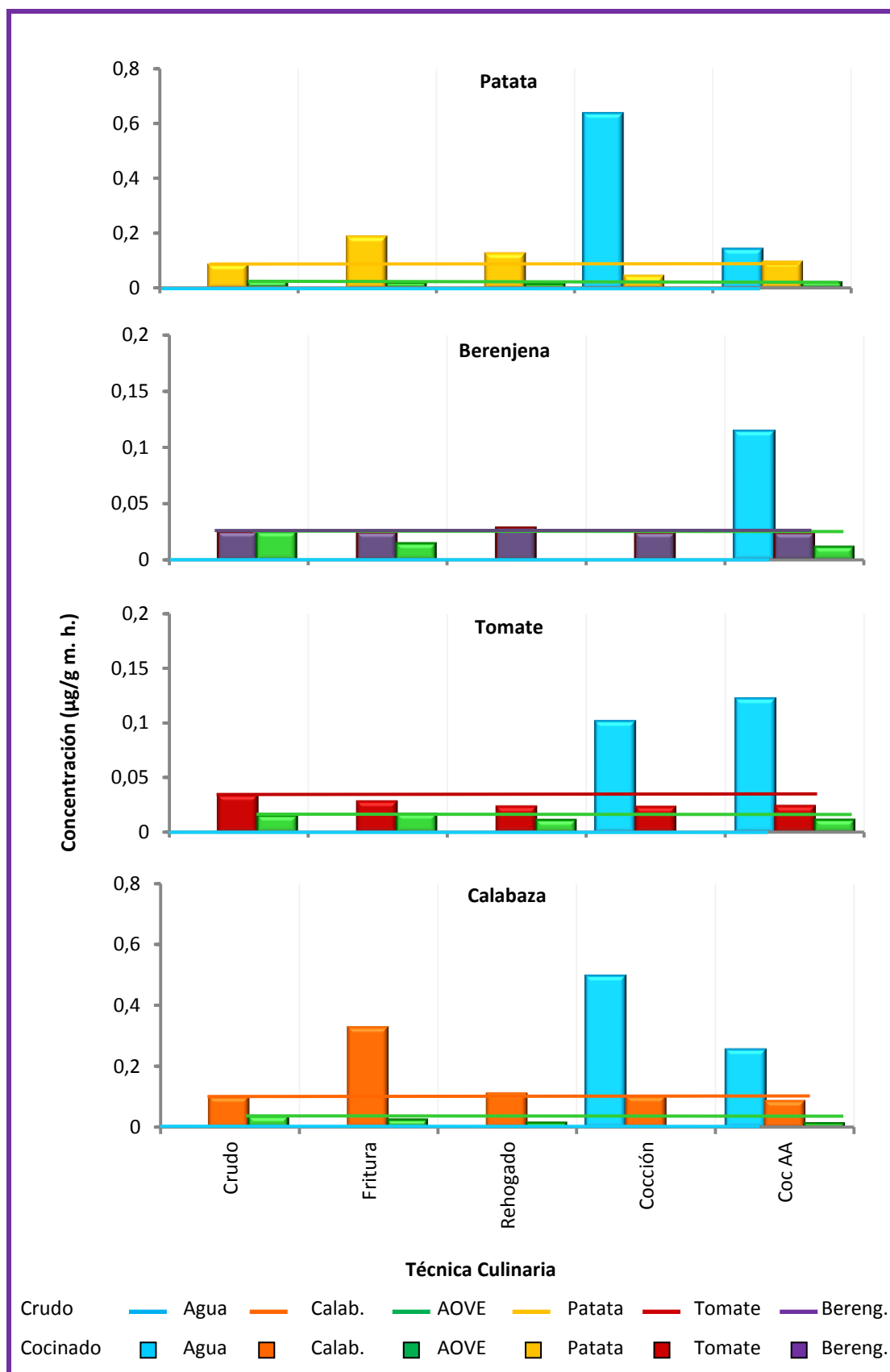


Figura 3.2-11. Concentración de ácido o-cumárico en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n=3).

En la cocción por las dos modalidades, cocción en agua y cocción AA, la tendencia fue a conservar o reducir el contenido de ácido o-cumárico (Fig. 3.2-11). No fueron significativas ($p > 0,05$) las reducciones ocasionadas por la cocción respecto al contenido de la hortaliza cruda en la berenjena y el tomate, ni el incremento en la calabaza, pero si lo fue la reducción observada en la patata ($p < 0,05$). En la cocción AA solo fue estadísticamente significativo el incremento determinado en la patata ($p < 0,05$), mientras que las reducciones en el resto de hortalizas no fueron significativas estadísticamente ($p > 0,05$).

En el AOVE recuperado de la cocción AA, fritura y rehogado del tomate y la patata, se mantuvieron las concentraciones pues los cambios, que consistieron básicamente en reducciones, no fueron significativos. Solo en el bloque de ensayos con berenjena y calabaza hubo reducciones significativas ($p < 0,05$), hasta niveles muy bajos en el AOVE recuperado de la fritura y en el aceite recuperado de la cocción AA o hasta la completa eliminación en el aceite obtenido del rehogado.

El agua resultó enriquecida en los ensayos de cocción AA de las cuatro hortalizas con concentraciones de 0,14 $\mu\text{g/g}$ m.h. en patata, 0,11 $\mu\text{g/g}$ m.h. en berenjena, 0,25 $\mu\text{g/g}$ m.h. en calabaza y 0,12 $\mu\text{g/g}$ m.h. en tomate. También se enriqueció en la cocción del tomate (0,1 $\mu\text{g/g}$ m.h.), calabaza (0,49 $\mu\text{g/g}$ m.h.) y patata (0,63 $\mu\text{g/g}$ m.h.). En este caso, los niveles de ácido o-cumárico del agua de cocción por las dos modalidades fueron los más altos de entre todas las fracciones del estudio (Fig. 3.2-11).

- **Ácido siríngico**

Es un ácido fenólico del grupo de derivados del ácido Benzoico junto con los ácidos gálico, gentísico, benzoico, vaníllico, protocatéquico e hidroxibenzoico (Carrasco-Pancorbo et al., 2005). El ácido siríngico también se origina, al menos parcialmente, de la degradación de la lignina (Tomás-Barberán and Clifford, 2000), generalmente el contenido de este compuesto es bajo con la excepción de algunas hierbas y especias, por ejemplo, en los clavos de olor se han reportado contenidos de 8mg/kg y, tras la irradiación, llega a duplicar esta cantidad (Variyar and Bandyopadhyay, 1995), también se le encuentra en menor concentración en la cáscara de la patata.

En las hortalizas en crudo sin procesar se cuantificó un contenido de 0,02 $\mu\text{g/g}$ m.h. en la patata, berenjena y calabaza y en el tomate no hubo contenido detectable de ácido sirínigico. En los cuatro lotes de AOVE crudo se cuantificaron concentraciones de este fenol, dos de ellos con una concentración de 0,02 $\mu\text{g/g}$ m.h. y de 0,01 $\mu\text{g/g}$ m.h. en los dos restantes (Tablas 3.2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8).

En las muestras de hortalizas procesadas, las concentraciones de este fenol respecto a los valores de las crudas tendieron a mantenerse o a aumentar (Fig. 3.2-12). La fritura generó incrementos estadísticamente significativos ($p < 0,05$) de la concentración de ácido sirínigico en la berenjena y tomate. En la patata y la calabaza, se mantuvieron las concentraciones iniciales que muestra la patata cruda, pues la reducción e incremento respectivos no fueron significativos estadísticamente ($p > 0,05$).

Las concentraciones obtenidas en las fracciones de hortalizas tendieron a ser superiores o iguales a las cuantificados en las referencias crudas. Los incrementos fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en el caso de la berenjena y tomate y las diferencias carecieron de significación ($p > 0,05$) en la patata y la calabaza.

Las hortalizas cocidas por ambas modalidades redujeron o mantuvieron la concentración de este antioxidante. Las variaciones significativas ($p < 0,05$) consistieron en las reducciones observadas en el tomate y los incrementos en la berenjena, así como la reducción en la patata cocida. La concentración de este fenol en la patata cocida AA, y en la calabaza cocida en agua o en el sistema AA no variaron respecto a las hortalizas cocida pues la diferencia entre los dos valores no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

En general, las técnicas de cocinado que utilizan agua como medio de transferencia de calor producen una disminución en el contenido inicial del ácido sirínigico en las verduras, que resultó especialmente acentuada en el caso del tomate.

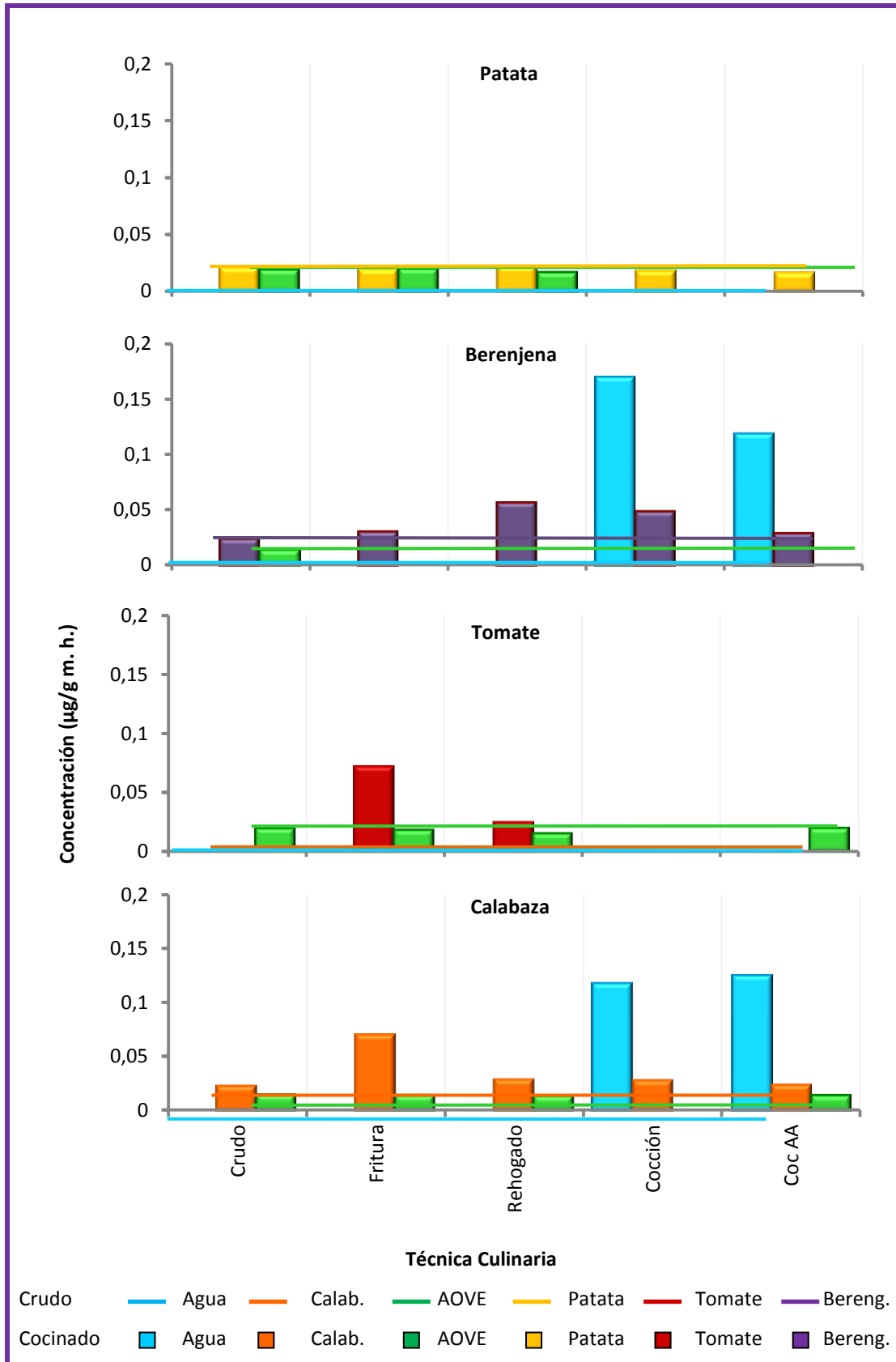


Figura 3.2-12. Concentración de ácido sirínico en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n=3).

En cuanto a las fracciones de AOVE recuperadas después de practicar las diferentes técnicas culinarias, se han encontrado reducciones significativas ($p < 0,05$) en las muestras de todas las técnicas de procesado de la berenjena, de las muestras de fritura y rehogado del tomate y del rehogado y cocción AA de la patata. Las concentraciones de la patata frita, del tomate cocido en medio AA y de todas las muestras obtenidas de los ensayos con calabaza no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0,05$) a su respectivo aceite crudo.

- **Ácido vanílico**

El ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico) también es un ácido fenólico del grupo de derivados del ácido benzóico junto con los ácidos gálico, gentísico, benzoico, siríngico, protocatéuico e hidroxibenzóico (Carrasco-Pancorbo et al., 2005).

Los valores cuantificados estuvieron acotados en el rango comprendido entre 0,06 $\mu\text{g/g}$ m.h. del aceite recuperado de la cocción AA del tomate y 0,69 $\mu\text{g/g}$ m.h. del agua de la cocción AA de la calabaza (Fig. 3.2-13).

Respecto de su presencia en las hortalizas crudas, no se detectó en el caso de la calabaza, pero se midieron concentraciones de 0,13 $\mu\text{g/g}$ m.h. en la patata, berenjena y tomate. En el AOVE crudo se detectó en concentraciones muy bajas (media de 0,07 $\mu\text{g/g}$ m.h.), y no en todas las muestras (Tabla 3.2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8). En bibliografía hemos encontrado que algunos autores, dependiendo del aceite de oliva virgen, lo han cuantificado en concentraciones de 146 a 347 ppb (Carrasco-Pancorbo, et al., 2004) y de 1,15 ppb en aceites utilizados para alimentar animales de experimentación (Coni et al., 2000).

La tendencia en la fracción de hortaliza tras la aplicación de todas las técnicas culinarias fue la de incrementar o mantener la concentración de ácido vanílico respecto a lo cuantificado en la hortaliza cruda. Aumentó significativamente ($p < 0,05$) tras la fritura de la berenjena y calabaza. Por el contrario en la patata, el incremento generado tras la fritura no fue estadísticamente significativo. Sí lo fue la reducción medida en el extracto de tomate frito con un valor de significancia de $p < 0,05$. En el rehogado fue aún más clara la tendencia al aumento de las concentraciones de este fenol, con incrementos significativos ($p < 0,05$) en la berenjena y la calabaza, y solo en la patata y en el tomate se conservó la concentración inicial tras el rehogado pues la diferencia con la hortaliza cruda no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$)

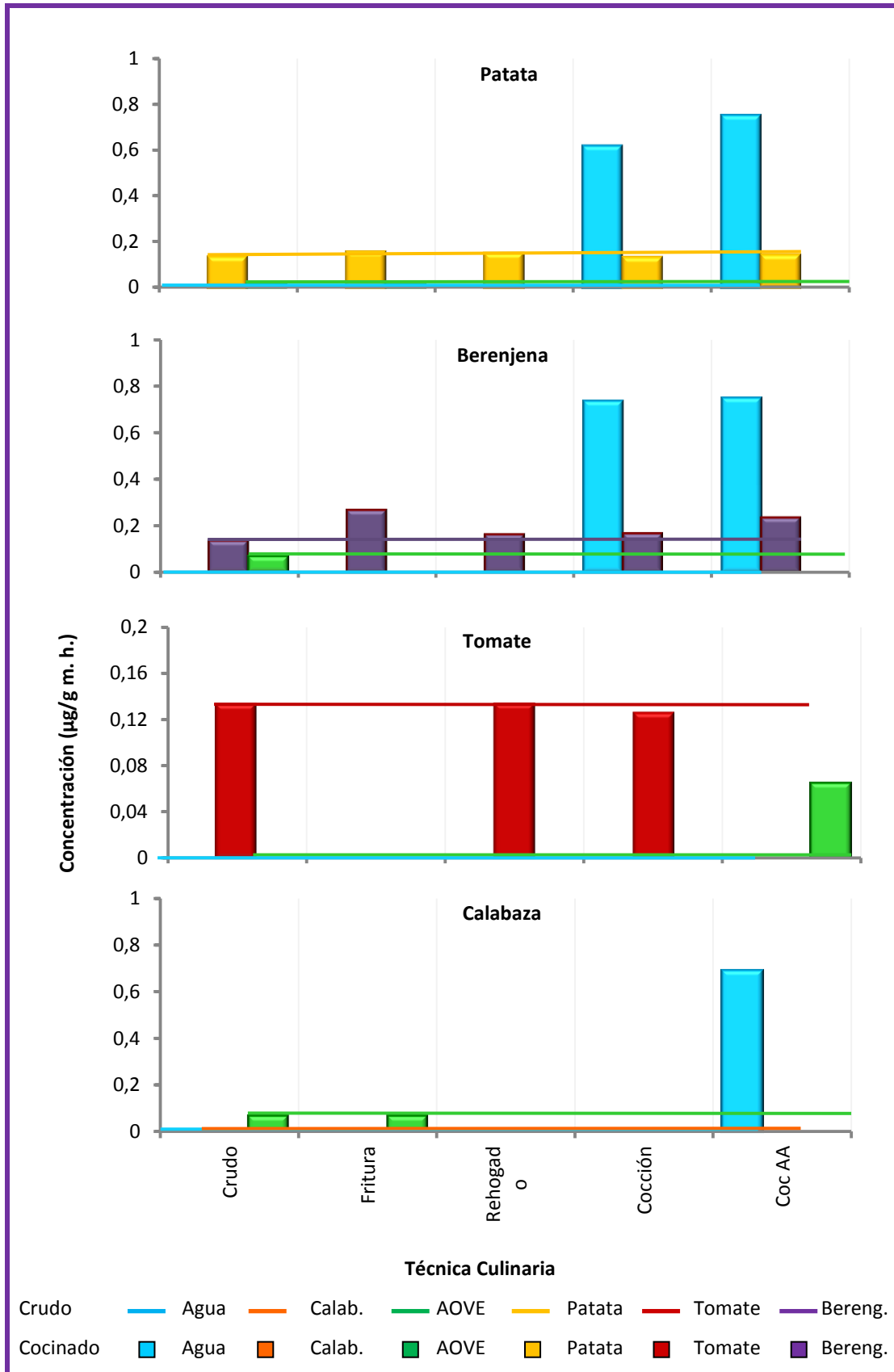


Figura 3.2-13. Concentración de ácido vanílico en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

Estos datos concuerdan con los obtenidos por Kalogeropoulos et al., (2007) quien en su exhaustivo estudio de reparto de fenoles durante la fritura de cuatro hortalizas en AOVE observó incrementos en la concentración de este fenol en tres de ellas (pimiento, calabacín y berenjena) que llegaron a superar a las del aceite crudo.

Las técnicas de cocción en sus dos modalidades también causaron aumentos en la concentración del fenol en las fracciones de hortalizas, especialmente en el caso de la berenjena y calabaza con una significancia de $p < 0,05$. Por el contrario, en el tomate y la patata cocidos se produjo una pérdida en este fenol sin diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) respecto a la hortaliza cruda. En el sistema de cocción AA se conservó la concentración inicial tras el tratamiento de la patata, pero hubo una reducción significativa en el tomate ($p < 0,05$)

Los lotes de AOVE crudos empleados en los experimentos con berenjena y calabaza fueron los únicos con contenidos cuantificables de ácido vanílico. En el AOVE recuperado de los ensayos de rehogado y cocción AA con berenjena hubo reducción de la concentración hasta 0, y en el aceite incluido en todos los ensayos con la calabaza también hubo reducción hasta 0, excepto en el aceite de la fritura, en donde, a pesar de haber una concentración más baja que en el vegetal crudo ($0,07 \mu\text{g/g m.h.}$) no fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

Hubo enriquecimiento con este fenol en el agua de cocción y de cocción AA de la berenjena y la patata, obteniendo, tras la cocción AA, contenidos significativamente superiores (en el agua de proceso de ambas hortalizas) respecto a los del resto de fracciones. En el agua de los ensayos con la calabaza solo se presentó en el agua de la cocción AA. En el tomate no hubo cantidades detectables en el agua de cocción de ninguna de las dos modalidades.

- **Ácido gálico**

El ácido gálico también es un derivado del ácido Benzoico y su presencia se ha reportado, entre otros alimentos, en zumos de tomate (Hallman et al., 2013), cáscaras de patata (Navarre, Goyer, and Shakya, 2009). En clavos de olor con concentraciones que alcanzan 175 mg/Kg (Manach et al., 2004), y en las hojas de té donde se llega a más de 4,5 g/Kg de m.h. (Tomás-Barberán and Clifford, 2000).

Las concentraciones de ácido gálico cuantificadas en este estudio se mantuvieron dentro del rango comprendido entre los 0,01 µg/g m.h. medidos en el AOVE recuperado tras la fritura de la berenjena y 0,23 µg/g m.h. y en el agua de la cocción AA del tomate (Fig. 3.2-14).

A diferencia de otros fenoles de este apartado, no se detectó en todas las hortalizas. Así vemos como no se encontró en la berengena, y en la patata cruda se midió un contenido de 0,02 µg/g m.h., en la calabaza 0,03 µg/g m.h. y en el tomate 0,04 µg/g m.h. En cuanto al AOVE, estuvo ausente en todas las muestras de todos los lotes, excepto del destinado a los ensayos con patata en donde se cuantificó en concentración muy baja (Tabla 3.2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8).

Vallverdú-Queralt, et al., (2011a) encontró en tomates contenidos semejantes a los aquí reportados con concentraciones inferiores a 1 µg/g m.h. y Conni et al., (2000) refirió contenidos en AOVE de 0,82 ppb, mientras que Carrasco-Pancorbo et al. (2004) encontró valores de 154 a 411 ppb en aceites monovarietales de 6 variedades de aceituna.

En las fracciones de las hortalizas fritas se observaron los valores más altos de entre todas las fracciones elaboradas por las diferentes técnicas culinarias. Los cambios detectados en la concentración de ácido gálico respecto a la concentración en la hortaliza cruda fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en todos los casos. La misma dinámica aparece con el rehogado, aumentando significativamente el contenido en ácido gálico en todas las fracciones de verduras cocinadas con esta técnica.

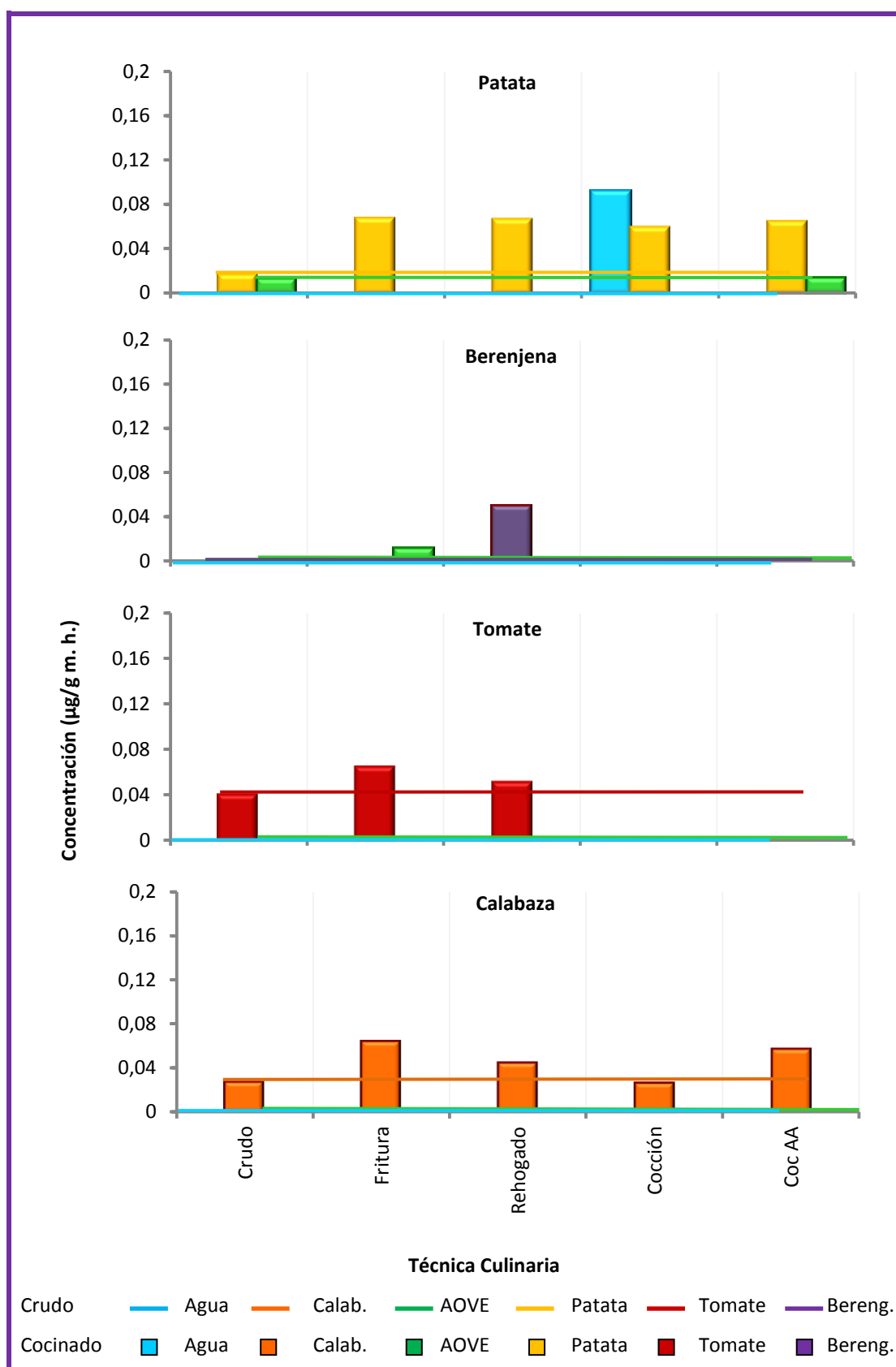


Figura 3.2-14. Concentración de ácido gálico en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

La cocción y cocción AA ocasionaron mayores reducciones que el rehogado y la fritura. Y de las dos modalidades de cocción, la primera generó mayores pérdidas con una reducción no significativa estadísticamente ($p > 0,05$) en la calabaza y berenjena. Por el contrario se produjo la total eliminación en el tomate. La excepción la constituye la patata con un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) respecto a la hortaliza cruda.

La observación relevante sobre el comportamiento de este fenol en los ensayos de las técnicas culinarias, es la ausencia en los medios de transferencia de calor. El ácido gálico no se encontró en el AOVE, solo en los casos de la cocción AA cuando intervino la patata ($0,01 \mu\text{g/g m.h.}$), y en la fritura cuando intervino la berenjena ($0,01 \mu\text{g/g m.h.}$) (Fig. 3.2-14). Tampoco tuvo una presencia importante en el agua de cocción pues solo se presentó en el caso aislado del agua de cocción de la patata ($0,09 \mu\text{g/g m.h.}$).

- **Ácido p-cumárico**

El ácido p-cumárico es un componente estructural que contribuye a la resistencia mecánica de la pared de las células vegetales, puede encontrarse esterificado a las pectinas y arabinosilanos o ligado con los polisacáridos en forma de dímeros. Se ha sugerido los enlaces entrecruzados que forman con los polisacáridos estructurales pueden jugar un rol significativo en la adhesión célula-célula, también sirven como un sitio de formación de linginas y contribuyen a la estabilidad térmica de la textura de frutas y hortalizas (Naczki and Shahidi, 2004).

El rango en el que se ubicaron todas las determinaciones de este fenol comprendió a la concentración mínima de $0,03 \mu\text{g/g m.h.}$ cuantificada en el AOVE recuperado del rehogado del tomate y la máxima de $3,11 \mu\text{g/g m.h.}$ encontrada en el agua de cocción de la berenjena (Tabla 3.2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8).

En este caso la magnitud de los datos cuantificados en las muestras de AOVE o en las de la hortaliza cruda o procesada no mostraron una agrupación precisa según la fracción analizada. Las de las hortalizas tendieron a tomar las concentraciones más altas o nulas, mientras que los datos del AOVE tendieron a los valores más bajos o nulos. El agua de cocción claramente presentó los valores más altos o nulos (Fig. 3.2-15)

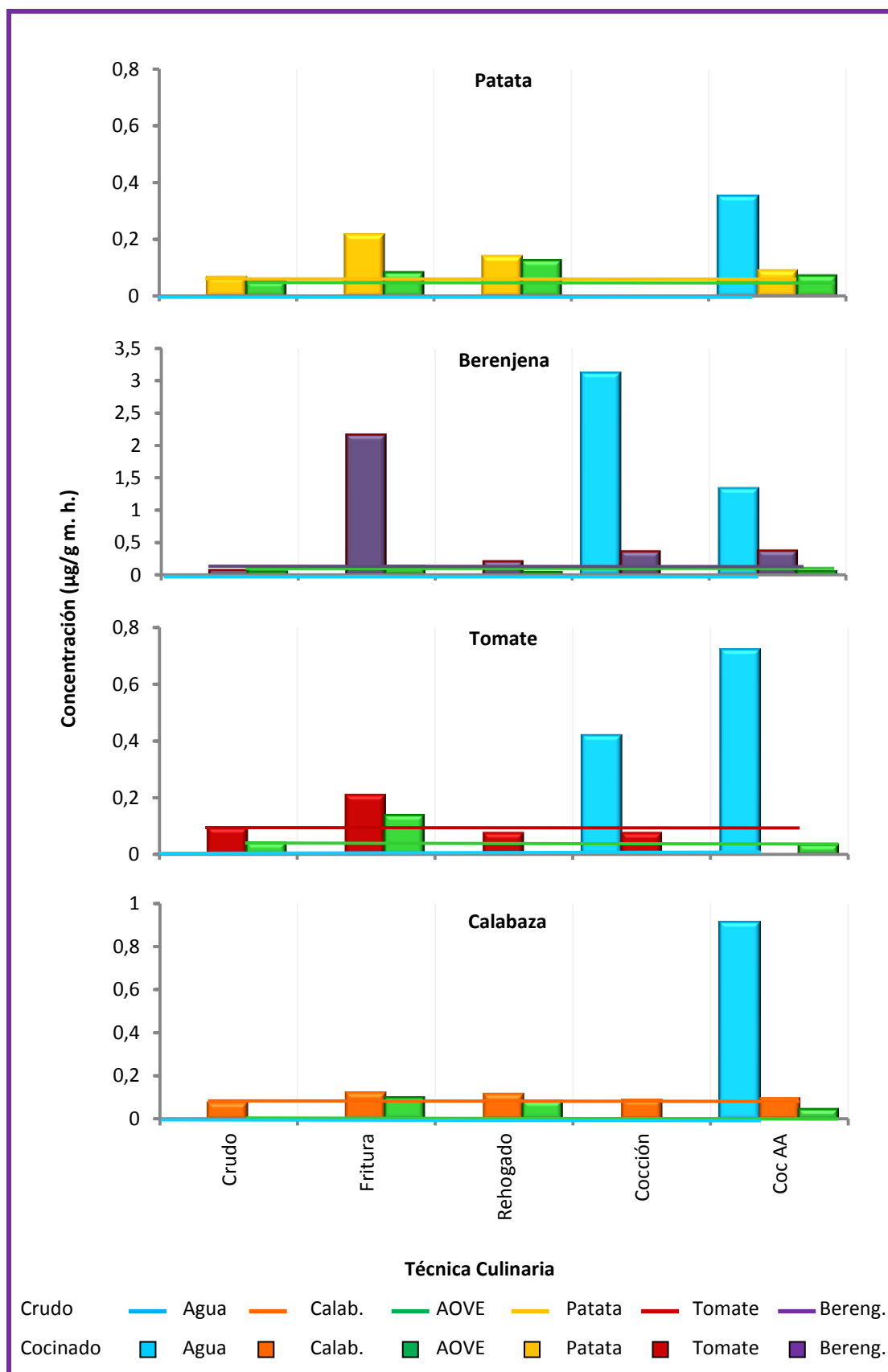


Figura 3.2-15. Concentración de p-cumárico en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

Nuevamente, la fritura incrementó significativamente ($p < 0,05$) las concentraciones de este fenol en las hortalizas cocinadas respecto de las cuantificadas en las crudas. El rehogado tuvo el mismo efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en la berenjena, calabaza y patata, pero se presentó una reducción no significativa ($p > 0,05$) en el tomate.

Durante la cocción AA se produjo un aumento importante en la concentración de este fenol en la berenjena, calabaza y patata, con valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) respecto a los encontrados en las correspondientes hortalizas crudas. En el caso del tomate, no fue detectado algún cambio significativo tras la cocción en agua ni tampoco en AA. El único caso de reducción estadísticamente significativa se encontró en la patata tras la cocción.

En la patata el ácido p-cumárico es uno de los ácidos fenólicos predominantes junto con el protocatéquico, vanillico y clorogénico y se ha descrito en la bibliografía que tras el horneado, hervido, fritura y horneado en microondas se reducen los niveles de los ácido p-cumárico y caféico (Rajarithnam, 2011).

En el AOVE recuperado de la fritura hubo incremento significativo ($p < 0,05$) en los cuatro casos analizados, además también hubo incremento significativo en los aceites ensayados con la calabaza en el rehogado y la cocción AA.

En el aceite procedente de la cocción AA de la berenjena el contenido fue mayor ($0,04 \mu\text{g/g m.h.}$) y en el rehogado se redujo ($0,03 \mu\text{g/g m.h.}$) pero en estos dos casos la diferencia respecto al crudo no fue significativa ($p > 0,05$). En el tomate además del incremento durante la fritura ($0,14 \mu\text{g/g m.h.}$), solo se presentó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la cocción AA y en el rehogado se eliminó por completo.

La cocción en agua generó un enriquecimiento de la misma en el caso de la berenjena y el tomate. En la cocción AA se enriqueció considerablemente el agua en este fenol tras el cocinado de las diferentes verduras (Fig. 3.2-15). Existen las referencias sobre el efecto de tratamientos hidrotérmicos sobre las concentraciones de fenoles totales e individuales en el caso de el ácido p-cumárico y sus derivados, en una de ellas fue cuantificada una reducción tras el procesamiento por hervido de raíces de arracacha (Pedreschi et al., 2011).

- **Luteolina**

En el estudio de este fenol se encontró que las concentraciones de las muestras de las tres fracciones (hortaliza, aceite y agua) se mantuvieron dentro del rango establecido entre 0,06 µg/g m.h. medido en el AOVE del rehogado del tomate y 0,18 µg/g m.h. encontrando en el tomate frito (Fig. 3.2-16).

En los alimentos frescos incluidos en los ensayos, este fenol se detectó únicamente en el tomate crudo (0,13 µg/g m.h.) y en el AOVE de los lotes destinados a los experimentos con patata (0,1 µg/g m.h.) y con calabaza (0,12 µg/g m.h.). Las concentraciones aquí encontradas de luteolina fueron más bajas que las cuantificadas en aceites italianos en donde alcanzaron contenidos que oscilaron entre 0,2 a 1,9 mg/l (Franconi et al., 2006; Salvini et al., 2006), y que las medidas en 8 aceites monovarietales españoles que se ubicaron en el rango entre 0,65 a 1,59 µg analito/Kg de aceite de oliva (Tabla 3.2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8).

Las concentraciones más altas en la fracción de hortaliza se encontraron tras la fritura de las muestras con valores de 0,18 y 0,14 µg/g m.h. en el tomate y patata, respectivamente. El enriquecimiento se observó en todas las muestras de patata después de la cocción AA (0,12 µg/g m.h.), del rehogado (0,13 µg/g m.h.) y de la fritura.

El único incremento observado ocurrió en la muestra de tomate frito pues fue la única hortaliza que presentó este fenol en crudo. Por la misma causa las reducciones se midieron también en los experimentos con esta hortaliza, uno no significativo en el rehogado ($p > 0,05$), y dos hasta la completa eliminación en la técnica de cocción por las dos modalidades.

En el AOVE incluido en los experimentos aumentó la concentración en los ensayos con tomate (0,06 en el rehogado, 0,07 en la cocción AA y 0,09 µg/g m.h. en la fritura) y en los ensayos con berenjena (0,07 en la cocción AA, 0,07 en el rehogado y 0,09 µg/g m.h. en la fritura). En las muestras del aceite procesado junto a la calabaza por fritura, rehogado y cocción AA, se cuantificaron reducciones significativas en las concentraciones ($p < 0,05$) respecto al AOVE crudo.

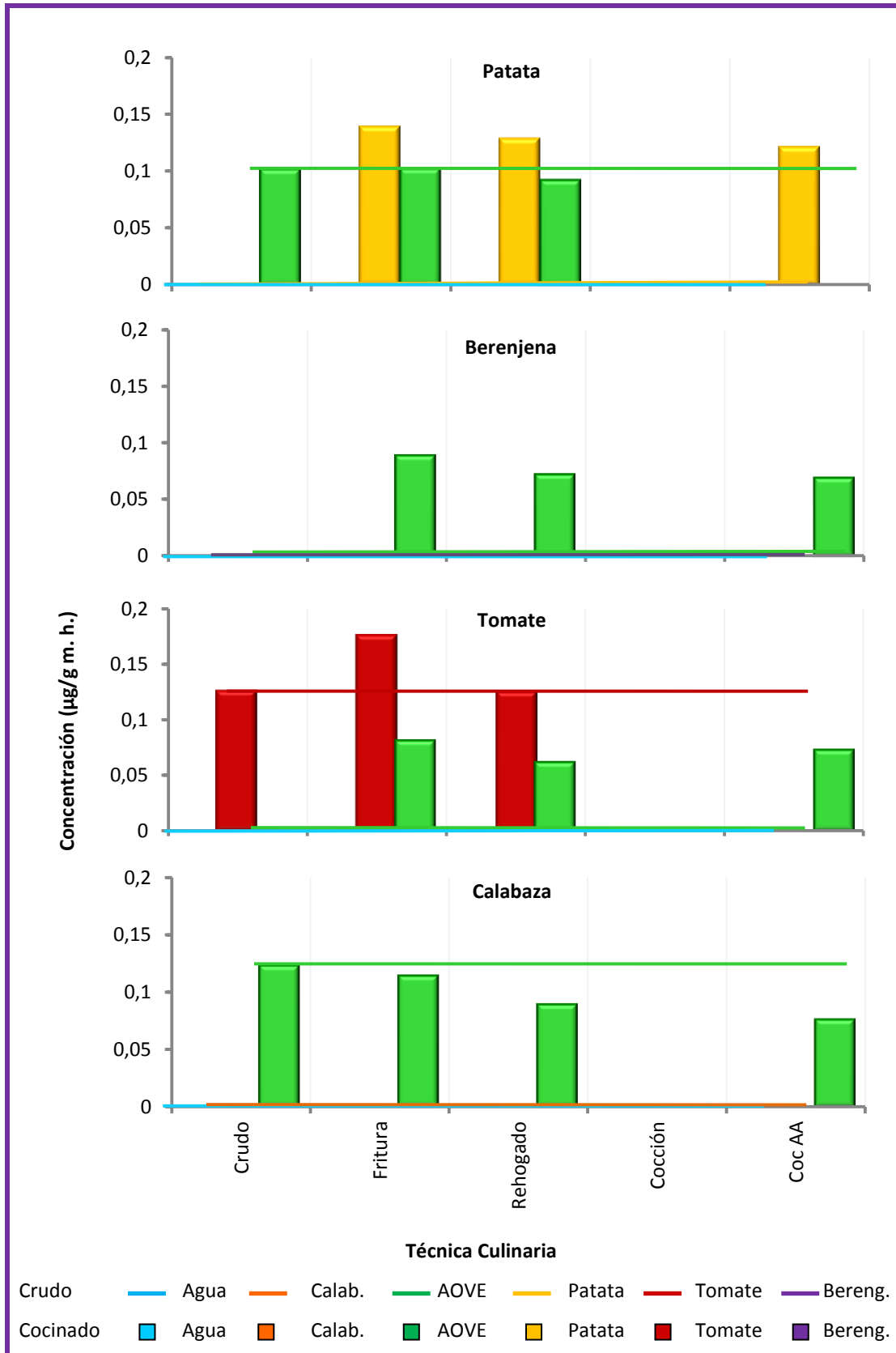


Figura 3.2-16. Concentración de luteolina en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

En otros estudios también se ha observado una reducción de la concentración de luteolina y luteolina-7-glucósido como resultado de una descomposición gradual durante el calentamiento a 100°C, aunque la descomposición fue más rápida a 180°C, también puntualizaron que algunos productos de la descomposición aún conservaron actividad como captadores de radicales (Parveen et al., 2010).

La luteolina no migró hacia el agua de cocción en ninguno de los casos estudiados (Fig. 3.2-16). Por el contrario otras autores mencionaron que el contenido de luteolina se redujo en la hortaliza cruda, y pasó hacia el agua y la sumatoria de los porcentajes de recuperación en la hortaliza y el agua indicó pérdida de un 10 % (Yao and Ren, 2011).

- **Apigenina**

Junto con la luteolina, la apigenina pertenece al grupo de compuestos fenólicos denominado flavonas que se forman por hidrólisis de los glucósidos presentes en la fibra. (Gómez-Alonso, Desamparados y Fregapane, 2002; Carrasco Pancorbo 2006).

El rango de los valores de los datos de este estudio comprendió el valor mínimo detectado en el AOVE de la fritura de la calabaza (0,1 µg/g m.h.) y el máximo (1,19 µg/g m.h.) en el agua de cocción del ensayo con berenjena (Fig. 3.2-17).

Este fenol no se encontró en la berenjena ni en la calabaza cruda, y en la patata cruda se cuantificó una concentración de 0,52 µg/g m.h., mientras que en el tomate la concentración fue de 0,23 µg/g m.h. (Tabla 3.2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8). Los valores encontrados en el AOVE crudo en este estudio (con valores medios que oscilan entre 0,14 µg/g m.h. y 0,23 µg/g m.h.) fue semejante a las cantidades encontradas en ocho aceites monovarietales, en donde variaron entre 0,36 a 2,2 µg/g, y en el aceite de oliva virgen extra Hojiblanca, la cantidad de apigenina fue superior que la de luteolina (Carrasco-Pancorbo et al., 2006).

En las muestras de las fracciones de tomate las concentraciones no fueron significativamente diferentes a la del tomate crudo en los casos de la hortaliza cocida (0,24 µg/g m.h.) y la cocida cocinada en AA (0,26 µg/g m.h.). En las muestras fritas y rehogadas la concentración se redujo hasta 0. La aplicación de las técnicas culinarias en la patata dio como resultado concentraciones significativamente más bajas ($p < 0,05$) que la de la cruda en la cocción AA, fritura y rehogado.

En algunos experimentos con hortalizas (apio) también se observó que los tratamientos acuotérmicos como el escaldado o el hervido, provocaron pérdidas de los contenidos de apigenina de 24,5 % y 37,5 % respectivamente, mientras que la cocción con vapor provocó un incremento de este fenol de 1,3 % y 5,7 %. En este caso, el efecto adverso del tratamiento térmico fue más severo para el hervido, y el menor para la cocción con vapor, pero la mayoría de pérdidas de m.s. fueron recuperadas en el agua de proceso (Yao and Ren, 2011).

En las muestras de berenjena, los procedimientos culinarios generaron concentraciones de 0,21 a 1,04 µg/g m.h. en la fritura, de 0,22 en el rehogado y de 1,04 µg/g m.h. en la cocción. La calabaza también se enriquece en este fenol después de los tratamientos culinarios a pesar de que no fue detectado en la muestra cruda.

El AOVE procesado mostró mayor concentración que el crudo en el caso de la cocción AA con patata, la concentración del aceite de la fritura de la patata no fue significativamente diferente a la de la cruda y la reducción causada por el rehogado ocasionó la eliminación de este fenol.

Las concentraciones de apigenina en el AOVE de los ensayos con berenjena fueron inferiores a las del aceite crudo en todos los casos, con contenidos de 0,1 µg/g m.h. después de la fritura, de 0,22 µg/g m.h. tras el rehogado y de 1,04 µg/g m.h. con la cocción AA. En la calabaza hubo enriquecimiento con la fritura hasta 0,1 µg/g m.h., en el tomate con la cocción AA hasta 0,12 µg/g m.h. y con el rehogado se cuantificaron 0,15 µg/g m.h.

En los casos en que se detectó alguna concentración de apigenina en la fracción de agua, esta tomó los valores más altos de todas las fracciones. La cocción enriqueció el agua de los ensayos con berenjena (1,19 µg/g m.h.) y la de los realizados con tomate (1,13 µg/g m.h.), la cocción AA solo generó concentraciones detectables durante el procesamiento del tomate (1,04 µg/g m.h.) y la patata (0,96 µg/g m.h.).

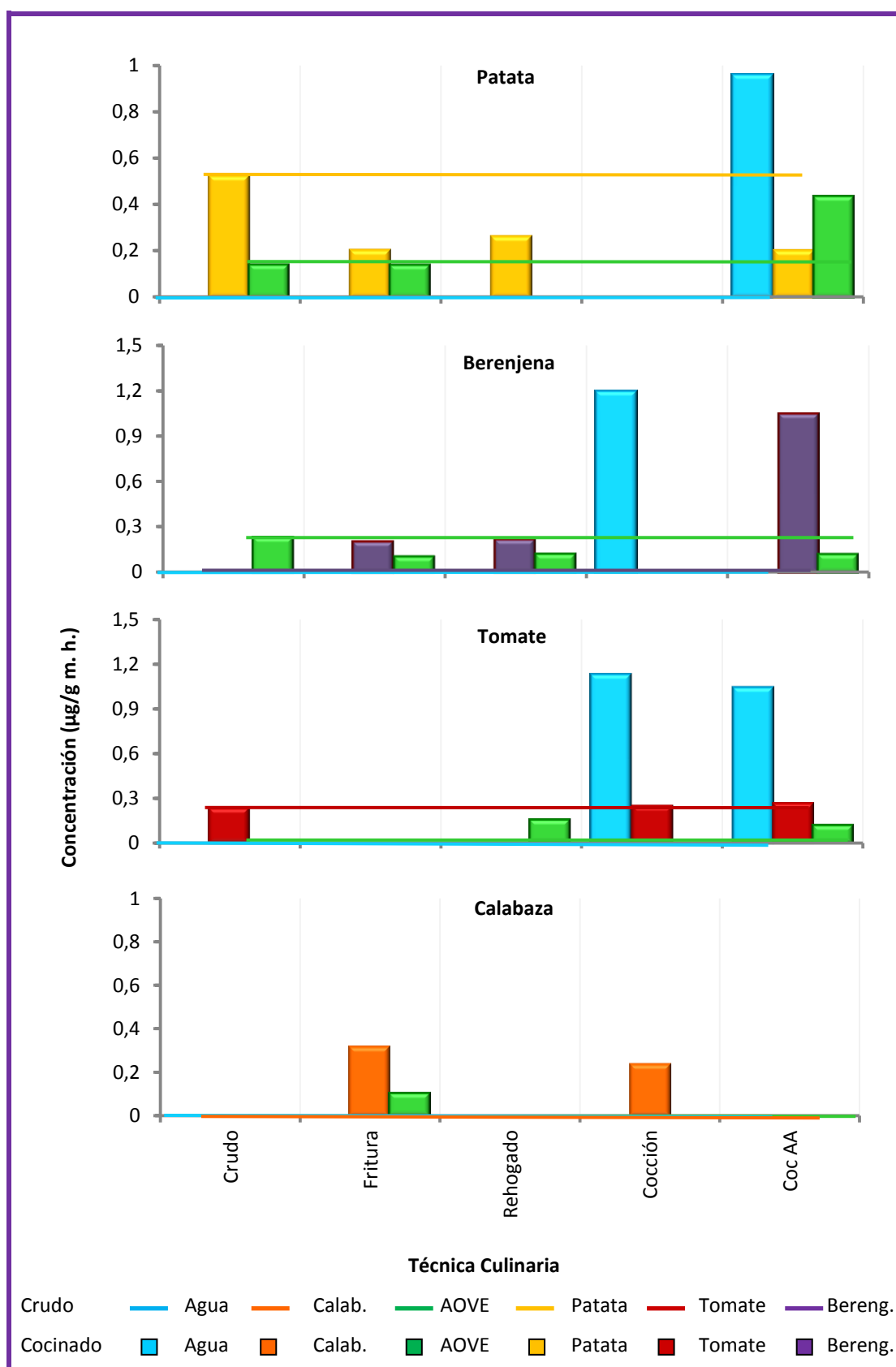


Figura 3.2-17. Concentración de apigenina en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n=3).

3.3. Estudio de las frecuencias de cambios en los fenoles analizados.

En el estudio de los compuestos fenólicos totales e individuales que fue abordado a lo largo de esta sección, se obtuvieron un total de 876 datos sobre la concentración de fenoles totales e individuales en todas las fracciones estudiadas (hortaliza, AOVE y agua). De los mencionados, 219 correspondieron a los valores cuantificados en los alimentos crudos que sirvieron como punto de referencia para las comparaciones con las concentraciones de los alimentos procesados por las cuatro técnicas culinarias, éstas últimas constituyeron las 657 observaciones restantes.

De estas 657 observaciones, 292 fueron cuantificadas en la fracción de hortalizas procesadas, 219 en la del aceite y 146 en la de agua recuperada tras los ensayos de los procesos culinarios.

Una a una, las observaciones de las fracciones de hortalizas, aceite y agua, fueron comparadas estadísticamente con su respectiva referencia cruda, obteniéndose así una población de datos constituida por el significado estadístico de los cambios. Es decir cambios significativos ($p < 0,05$) y no significativos ($p > 0,05$).

La naturaleza de los cambios detallados en cada compuesto (secciones 3.1 y 3.2) y cuyo significado estadístico se refleja como literales que pueden ser iguales o diferentes junto a los datos recogidos en las tablas (3.1-1, 3.2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8) consistió básicamente en incrementos o reducciones, que en caso de no ser estadísticamente significativas constituyeron observaciones en las que las concentraciones iniciales de los alimentos crudos se mantuvieron inalteradas, pese a que si hubo cambio real.

Otro fenómeno encontrado con frecuencia, fue la ausencia de algunos fenoles en la muestra cruda, pero en su posterior aparición en la muestra procesada, estos casos se consideraron incrementos, pero cuando los fenoles no fueron detectados aún después de los ensayos, fueron considerados como fenoles ausentes.

De esta manera establecimos cinco categorías para obtener una idea concreta de los cambios provocados por cada una de las técnicas culinarias en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua:

- a) Incrementos
- b) Incrementos no significativos
- c) Reducciones
- d) Reducciones no significativas
- e) Ausencias

- **Cambios en la fracción de hortaliza.**

En la Fig. 3.3-1 se observa la proporción de cambios ocurridos en los fenoles de la fracción de hortaliza tras la aplicación de las técnicas culinarias. En general, todas las técnicas culinarias ocasionaron tanto incrementos como reducciones en la concentración de los fenoles totales e individuales.

Es por lo que nosotros asumimos que junto con todas las causas que se establecen como explicación a los efectos adversos o positivos que generan determinadas técnicas culinarias sobre el contenido de fenoles de los alimentos; también la visualización de casos aislados en que se manifiestan únicamente incrementos o reducciones, contribuyen a la generación de reportes contradictorios en la bibliografía referente a los efectos del procesamiento culinario sobre el contenido de fenoles en las hortalizas (Andlawer et al., 2003; Wu et al., 2004; Kalogeropoulos et al., 2007; Kita et al., 2007; Lako et al., 2007; Ai et al., 2008; Chuah et al., 2008; Miglio et al., 2008; Sikora et al., 2008; Volden et al., 2004; 2009; Cerretani et al., 2009; Chioe et al., 2009; Ramírez-Anaya et al., 2010).

En este estudio, sin embargo, el efecto general de la aplicación de las cuatro técnicas culinarias sobre el contenido de fenoles totales e individuales en las cuatro hortalizas, tendió con mayor frecuencia hacia el incremento o la falta de efecto, que hacia la reducción (Fig. 3.3-1). El porcentaje de casos con incrementos significativos (50,3 %) fue superior a las reducciones causadas por el procesamiento culinario (12 %) y en el 23 % de los casos, el procesamiento “no tuvo influencia” sobre la concentración de fenoles totales e individuales.

La mayor contribución al porcentaje de incrementos significativos fue de las concentraciones cuantificadas en los casos de fritura, mientras que la contribución más baja fue la de la cocción. Con las frecuencias de incrementos estadísticamente significativos de las concentraciones de fenoles totales e individuales ($p < 0,05$) sobre las hortalizas, se ha conseguido establecer la siguiente clasificación:

Fritura (80,8 %) > Rehogado (58,9 %) > Cocción AA (38,4 %) > Cocción (23,3 %)

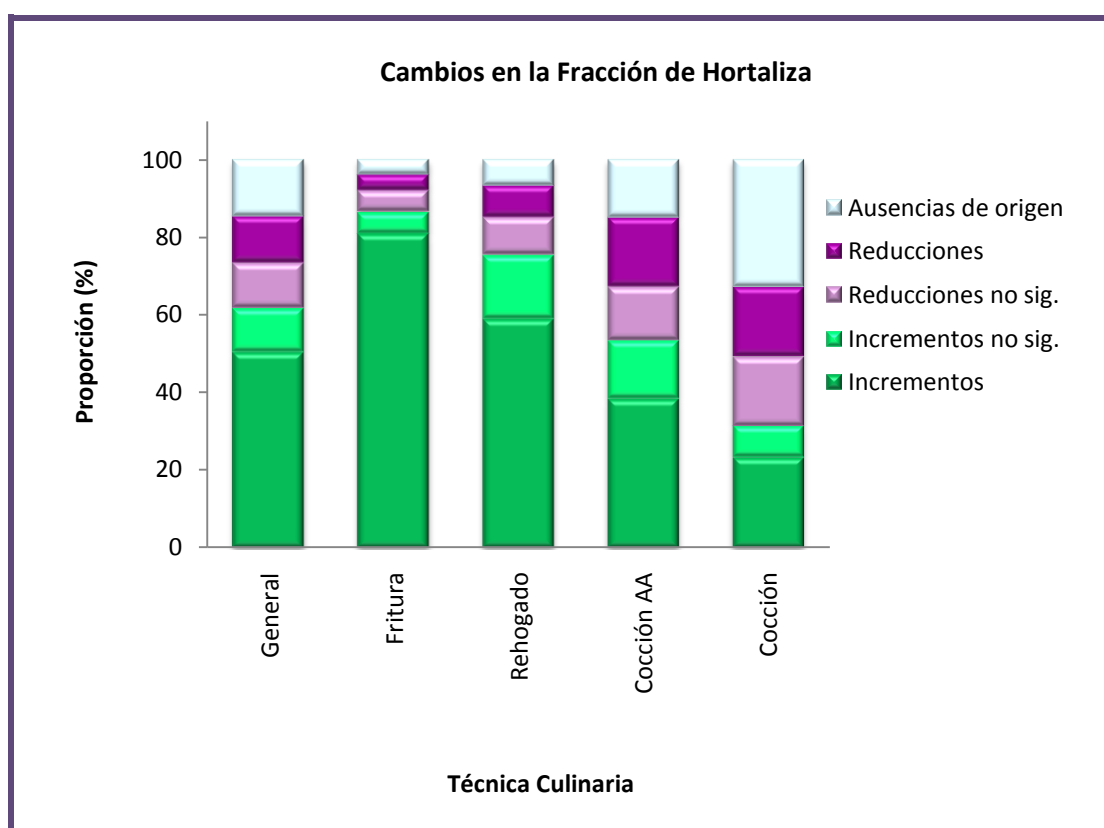


Figura. 3.3-1. Proporción de cambios originados por las técnicas culinarias en la fracción de hortaliza.

En la Fig. 3.3-1, se aprecia que los porcentajes de reducciones significativas siguieron el patrón inverso a los incrementos, encontrándose mayor porcentaje de reducciones en las hortalizas cocidas y el mínimo en las fritas. La clasificación general de las técnicas culinarias según la frecuencia de reducciones de la concentración de fenoles que generan sobre las hortalizas analizadas fue:

Cocción (18 %) > Cocción AA (18 %) > Rehogado (8 %) > Fritura (4 %)

También, son muy importantes los casos en los que la aplicación de técnicas culinarias no provocaron efecto sobre la concentración inicial de los fenoles presentes en la hortaliza cruda. Porque si bien, los incrementos no significativos no contribuyen a la proporción de incrementos, las reducciones no significativas tampoco ejercieron un efecto negativo, al no contribuir a la proporción de reducciones.

La proporción de casos sin cambios ascendió a 29 % en la cocción AA, a 26 % en la cocción, 25,5 % en el rehogado y 10,5 % en la fritura. Esos porcentajes podrían ser considerados como un efecto protector y sumarse a los porcentajes de incrementos, para conseguir así un porcentaje de efectos favorables o protectores de las técnicas culinarias sobre la concentración de fenoles.

La clasificación de las técnicas culinarias conforme a la frecuencia de los efectos favorables que ocasionan sería el siguiente:

Fritura (91,3 %) > Rehogado (84,4 %) > Cocción AA (67,4 %) > Cocción (49,3 %)

En las gráficas de las Fig. 3.3-1 los segmentos celestes de las barras de frecuencias se pueden asociar con la proporción de enriquecimiento del perfil cualitativo. De manera que, porcentajes altos representan un menor número de nuevos compuestos añadidos al perfil cualitativo de la hortaliza cruda. Así, en la hortaliza, fue la fritura la que añadió más fenoles no existentes en la hortaliza cruda, le siguieron en orden descendente, el rehogado, la cocción AA y la cocción.

- **Cambios en la fracción de aove.**

La proporción de cambios ocurridos en la fracción de AOVE procesado por las cuatro técnicas culinarias se presenta en la (Fig. 3.3-2).

Como se puede apreciar, el efecto general del procesamiento culinario con las técnicas aquí ensayadas, fue de reducción en la concentración de fenoles (38 %) por encima de la ganancia (15 %) y del efecto protector (21 %).

La pérdida es una tendencia que se esperaba por las múltiples razones que se han detallado anteriormente, sin embargo, la presencia de incrementos en el aceite era un hecho no previsto. Porque la naturaleza de los fenoles es hidrofílica, aunque el grado en que despliegan esta propiedad sea variable, y además, en el estudio de los fenoles exclusivos de las hortalizas se observó que el ácido clorogénico y la rutina no migran hacia el aceite, con lo que se descartó que el enriquecimiento haya sido resultado de la incorporación en el aceite, de fenoles presentes en la hortaliza.

Sin embargo, se han encontrado reportes de este tipo de incrementos por otros autores, quienes postulan que el aumento de temperatura durante la aplicación de las técnicas culinarias, puede producir una rotura supramolecular de los puentes glicosídicos entre las fracciones fenólicas y los azúcares (Bunea et al., 2008), lo que puede explicar el incremento de la concentración de fenoles observadas en algunas muestras de aceite procesado. El procesamiento doméstico altera la estructura química de compuestos antioxidantes lo que hace posible la conversión de fenoles insolubles en formas más solubles (Cohen, Sakihama, and Yamasaki, 2001).

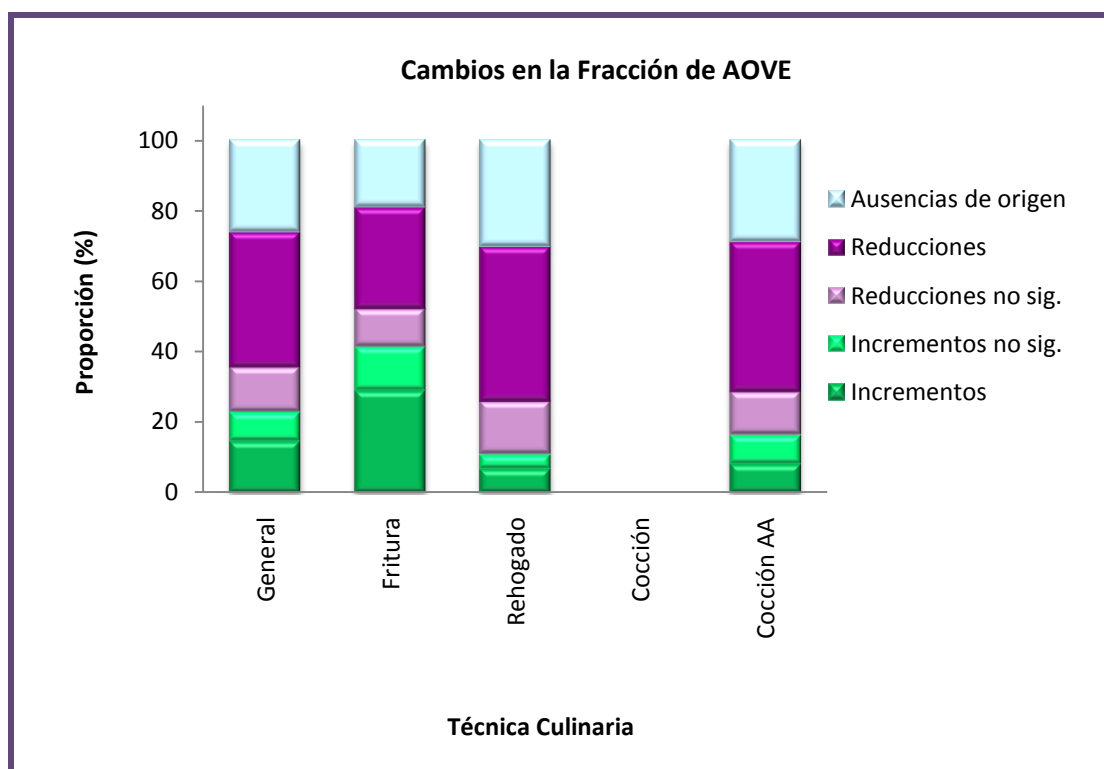


Figura. 3.3-2. Proporción de cambios originados por las técnicas culinarias en la fracción de AOVE.

En el análisis de los fenoles individuales, el incremento de su concentración en el AOVE fue considerado como un evento aislado, pero en el estudio de la población de datos, las frecuencias obtenidas indican lo contrario. El incremento se presenta con mayor frecuencia durante la fritura (29 %), pero también se detecta, aunque en menor proporción, durante la cocción AA (8,2 %), y en el rehogado (6,8 %).

El efecto predominante, como se dijo antes, fue hacia la reducción. La clasificación establecida de acuerdo a la frecuencia de reducciones significativas de la concentración de fenoles es el siguiente:

Rehogado (44 %) > Cocción AA (42 %) > Fritura (29 %)

Los porcentajes de casos de AOVE en los que no hubo efecto significativo sobre las concentraciones de fenoles tras la aplicación de las técnicas culinarias y que se consideran como efecto protector fueron de 23 % en la fritura, 10 % en el rehogado y 20 % tras la cocción AA. Los porcentajes del aceite fueron inferiores a los encontrados en la fracción de hortaliza en el caso del rehogado y la cocción AA, pero fueron casi del doble de los cuantificados en la fritura.

El orden decreciente de las técnicas culinarias según la frecuencia de casos favorables (incrementos más cambios no significativos) es el siguiente:

Rehogado (15 %) > Cocción AA (12 %) > Fritura (11 %)

De la observación de la fracción celeste de la Fig. 3.3-2, se desprende que no hubo un efecto evidente sobre el enriquecimiento cualitativo del perfil de fenoles del AOVE procesado en los casos del rehogado (30 %) y la cocción AA (29 %), ya que el tamaño relativo de los segmentos es casi equivalente entre los tratamientos, solo supera al resto el caso del aceite frito (19 %) en donde una reducción respecto a la proporción del resto de técnicas indicó la adición de nuevos fenoles al perfil cualitativo original del AOVE fresco de manera semejante a como se presentó en el caso de la hortaliza.

- **Cambios en la fracción de agua.**

En la fracción de agua, solo se presentaron incrementos que fueron considerados como enriquecimiento, pues la concentración de fenoles en el agua cruda es nula. Estos porcentajes fueron superiores en el agua de cocción AA (77 %) que en el agua de la cocción (55 %).

Después de restar al 100 % el porcentaje de casos de enriquecimiento, el porcentaje residual lo constituyeron los casos de los fenoles que no se transfirieron al agua de cocción, es decir aquellos que no fueron detectados aún después de la aplicación de las técnicas culinarias. Como se observa en la Fig. 3.3-3, fue mayor la cantidad de fenoles transferidos al agua de cocción durante la técnica de cocción que incluyó aceite, que cuando no fue incluido, así el perfil cualitativo del agua de cocción AA es más variado que el del agua de cocción sin AOVE.

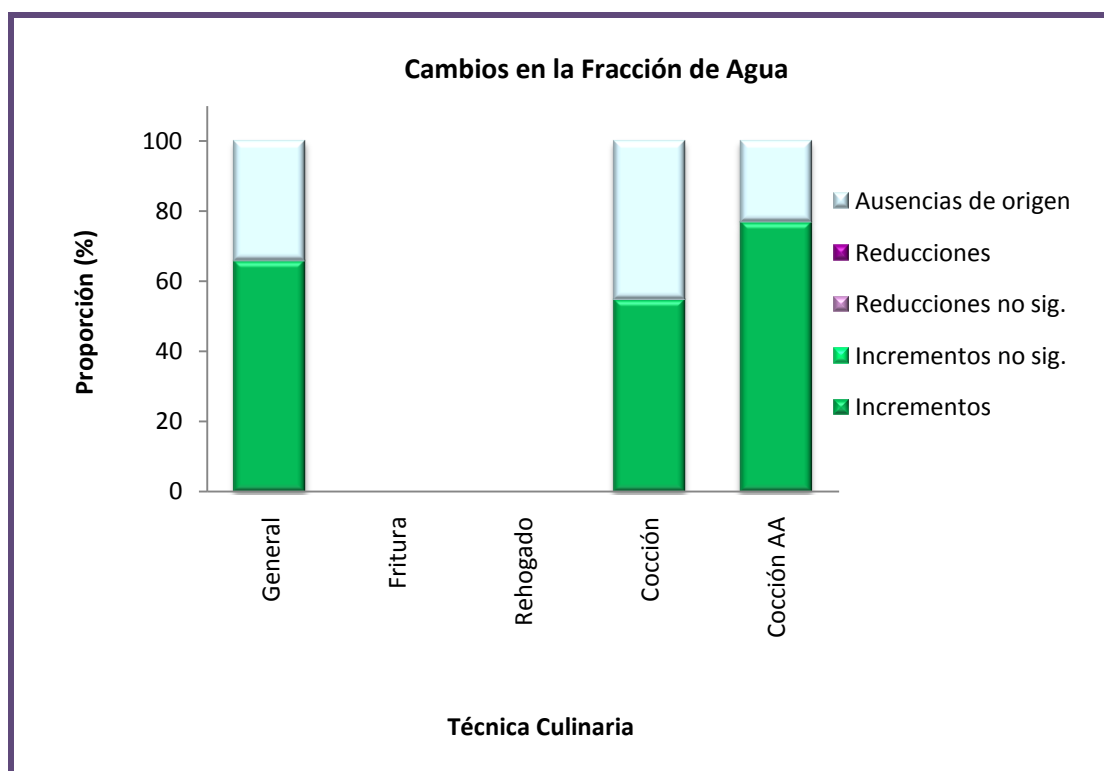


Fig. 3.3-3. Proporción de cambios originados por las técnicas culinarias en la fracción de agua.

En resumen:

Consideradas en conjunto, las técnicas culinarias aplicadas en cuatro hortalizas de la dieta mediterránea, generan tanto un efecto de incremento como de reducción (significativos) y protección (cambios no significativos) en la concentración de fenoles totales e individuales de las verduras. Así como también el enriquecimiento del perfil cualitativo de fenoles. Mientras la hortaliza y el agua enriquecen su perfil fenólico e incrementan las concentraciones, el AOVE pierde estas propiedades.

En la hortaliza frita son más frecuentes los efectos favorables sobre la concentración de fenoles totales e individuales y el enriquecimiento del perfil cualitativo de los mismos. A la fritura le siguió el rehogado, la cocción AA y la cocción, esta última ocasionó efectos adversos en el 50 % de los casos.

En el AOVE predomina la reducción en la concentración de fenoles totales e individuales por encima de los incrementos y el efecto protector. El orden de las técnicas culinarias de acuerdo a la magnitud de la frecuencia con que se presentan las reducciones fue la misma que la obtenida con los incrementos en las hortalizas, así la técnica que ocasiona reducciones con mayor frecuencia fue el rehogado, le siguió la cocción AA y finalmente la fritura.

El agua de cocción incorpora compuestos fenólicos que se diluyen desde la hortaliza y el AOVE. Así se observa que la cocción de hortalizas enriquece el perfil cualitativo y cuantitativo del agua de cocción y la adición de AOVE lo enriquece aún más con los fenoles propios de este aceite.

4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CA).

4.1. Evaluación de la capacidad antioxidante con el método DPPH.

Este método es comúnmente usado debido a la excelente reproducibilidad bajo ciertas condiciones de ensayo (Akanitapichat et al, 2010). El radical libre DPPH es considerado como un modelo de radical lipofílico estable. Se aplica en el estudio del potencial de productos naturales como captadores de radicales libres. Se dice que no es necesario el uso adicional de otros radicales como el ABTS pues no surgen problemas de solubilidad e interferencia durante el ensayo con DPPH (Arnao, 2000; Dorman et al., 2004).

La capacidad antioxidante (CA) cuantificada por el método DPPH en el agua de cocción y en los extractos metanólicos de las hortalizas y el aceite tanto crudos como tratados con las diversas técnicas culinarias se muestran en la (Tabla 4.1-1). Todas las determinaciones obtenidas se situaron dentro del rango delimitado por los valores de la CA del agua de cocción de la calabaza (0,01 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y el máximo cuantificado en la berenjena frita (13,39 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$). En este caso, la CA se estratificó conforme a la fracción analizada, con los valores más altos encontrados en la fracción de hortaliza, los medios en el AOVE y los bajos en el agua de cocción.

Los valores iniciales correspondientes a las materias primas crudas son el punto de referencia para valorar los cambios que se aprecian en la Fig. 4.1-1, y que fueron de 0,53 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la patata, 0,57 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la berenjena, el más elevado de 2,08 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ correspondió al tomate y el más bajo de todas las hortalizas crudas se detectó en la calabaza 0,03 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ En el AOVE la CA medida fue de 1,32, 0,91, 1,45 y 0,91 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ para los lotes de la patata, berenjena, tomate y calabaza, respectivamente.

En todos los ensayos de las técnicas culinarias se observó un efecto de incremento de la CA de las hortalizas respecto al vegetal crudo (Fig. 4.1-1). Estos cambios fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en las fracciones de patata, calabaza, tomate y en la berenjena frita, mientras que en esta última, el incremento originado por el rehogado y las dos modalidades de cocción no fue suficiente para generar diferencias con significado estadístico ($p > 0,05$).

Resultados y Discusión

El efecto de la fritura sobre la fracción de hortaliza fue el de generar los valores de CA más elevados de esta fracción, destacando la berenjena (13,38 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y el tomate (13,60 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) por encima de la patata (3,45 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y la calabaza (3,96 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) (Tabla 4.1-1). Los valores generados tras el rehogado fueron de 2,44 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la patata, 1,19 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la berenjena, 8,28 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en el tomate y 0,75 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la calabaza.

Tabla 4.1-1. Capacidad antioxidante medida por el método DPPH en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua, obtenidas en crudo y tras aplicar cuatro técnicas culinarias. Cada valor promedia tres repeticiones (n = 3).

Parámetro	Técnica culinaria	Fracción	Hortaliza			
			Patata*	Berenjena	Tomate	Calabaza
Capacidad Antioxidante ($\mu\text{mol ET/g m.h.}$) Método DPPH	Crudo	Hortaliza	0,53 \pm 0,04 d**	0,57 \pm 0,06 ab	2,08 \pm 0,07 e	0,03 \pm 0 e
		AOVE	1,32 \pm 0,02 g	0,91 \pm 0,61 ab	1,45 \pm 0 d	0,91 \pm 0,01 d
		Agua	0 \pm 0 a	0 \pm 0 a	0 \pm 0 a	0 \pm 0 a
	Fritura	Hortaliza	3,45 \pm 0,39 i	13,39 \pm 0,39 d	13,60 \pm 0,24 h	3,96 \pm 0,05 h
		AOVE	1,29 \pm 0,05 g	0,64 \pm 0,07 ab	2,91 \pm 0,32 f	0,69 \pm 0,03 f
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Rehogado	Hortaliza	2,44 \pm 0,02 h	1,19 \pm 0,07 c	8,28 \pm 0,28 g	0,75 \pm 0,01 g
		AOVE	0,52 \pm 0 d	0,07 \pm 0 a	1,45 \pm 0,11 d	0,31 \pm 0,02 d
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Cocción	Hortaliza	1,19 \pm 0,22 f	3,68 \pm 0,33 bc	0,98 \pm 0,09 c	0,06 \pm 0 c
		AOVE	-----	-----	-----	-----
		Agua	0,10 \pm 0,04 b	0,88 \pm 0,04 ab	0,52 \pm 0,02 b	0 \pm 0 b
Cocción AA	Hortaliza	0,89 \pm 0,13 e	2,66 \pm 0,12 abc	1,56 \pm 0,11 d	0,13 \pm 0 d	
	AOVE	0,08 \pm 0,0 ab	0,09 \pm 0 a	0,36 \pm 0,01 b	0,11 \pm 0,01 b	
	Agua	0,21 \pm 0,01 c	0,85 \pm 0,01 ab	1,42 \pm 0,08 d	0,20 \pm 0,01 d	

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.
**Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Con referencia a las técnicas de cocción, se observó una ventaja de la cocción en agua que generó cifras mayores de CA en los extractos de patata (1,19 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y berenjena (3,68 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) respecto a los de las mismas hortalizas procesadas en medio AA (0,89 y 2,66 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en patata y berenjena, respectivamente). Mientras que los extractos del tomate y calabaza fueron superiores (1,56 y 0,13 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$, respectivamente) tras los ensayos con la cocción AA, respecto a los cocidos solo en agua (0,98 y 0,06 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$, respectivamente).

En resumen, la magnitud de la CA de la fracción de hortaliza en las diferentes muestras de berenjena y patata se clasificaron de acuerdo a los siguientes patrones: fritura > rehogado > cocción > cocción AA. En los casos del tomate y calabaza se invierte el orden de las modalidades de cocción quedando la categorización de la siguiente manera: fritura > rehogado > cocción AA > cocción.

Al igual que en este estudio, Bellali et al. (2012) encontró un incremento significativo de los valores del poder reductor por el método DPPH en patata tras la aplicación de la cocción, horneado, fritura por inmersión y cocción en microondas. Y el efecto fue más acentuado en la patata frita con un incremento de seis veces el original. Con diferencias significativas en todos los procesos de acuerdo al siguiente orden: fritura > horneado > hervido > cocción en microondas > crudo. Adefegha and Oboh, (2011), también encontró un incremento tras el hervido y cocción al vapor de hojas verdes.

Otros autores no han referido efectos evidentes tras la aplicación de técnicas culinarias en patatas durante el hervido y horneado en donde la CA medida por el método DPPH se mantuvo sin cambio (Padda and Picha, 2008). Por otra parte Xianyun et al., (2009) observó que la capacidad antioxidante medida por DPPH disminuyó en patatas cocinadas, en setas hervidas (Nguyen, Nagasaka and Ohshima, 2012) y en apio (Yao and Ren, 2011). En zumos de hortalizas se midió un descenso de la CA con todos los tiempos (10 y 30 min) y a diferentes temperaturas ensayadas (50, 75 y 100°C) (Roy et al., 2007).

La capacidad antioxidante medida por el método DPPH mostró una correlación significativa (Tabla 4.1-2) de $r = 0,78$, con el contenido de fenoles y con la CA medida por el método FRAP ($r = 0,75$). La correlaciones con el método ABTS y DMPD fueron bajas ($r = 0,29$ y $0,05$ respectivamente), pero solo fue significativa en el primer caso ($p < 0,05$).

El incremento de la CA en las hortalizas procesadas por los diversos métodos estudiados en este trabajo se relaciona con el incremento de la disponibilidad de los fenoles química y físicamente ligados que se localizan dentro de la microestructura del alimento (Roy et al., 2007; Gökmen et al., 2009), esta afirmación se sostiene del hecho de que estuvieron correlacionados significativamente ($p < 0,05$, $r = 0,78$) el incremento simultaneo en la concentración de fenoles totales y la capacidad antioxidante cuantificada por el método DPPH.

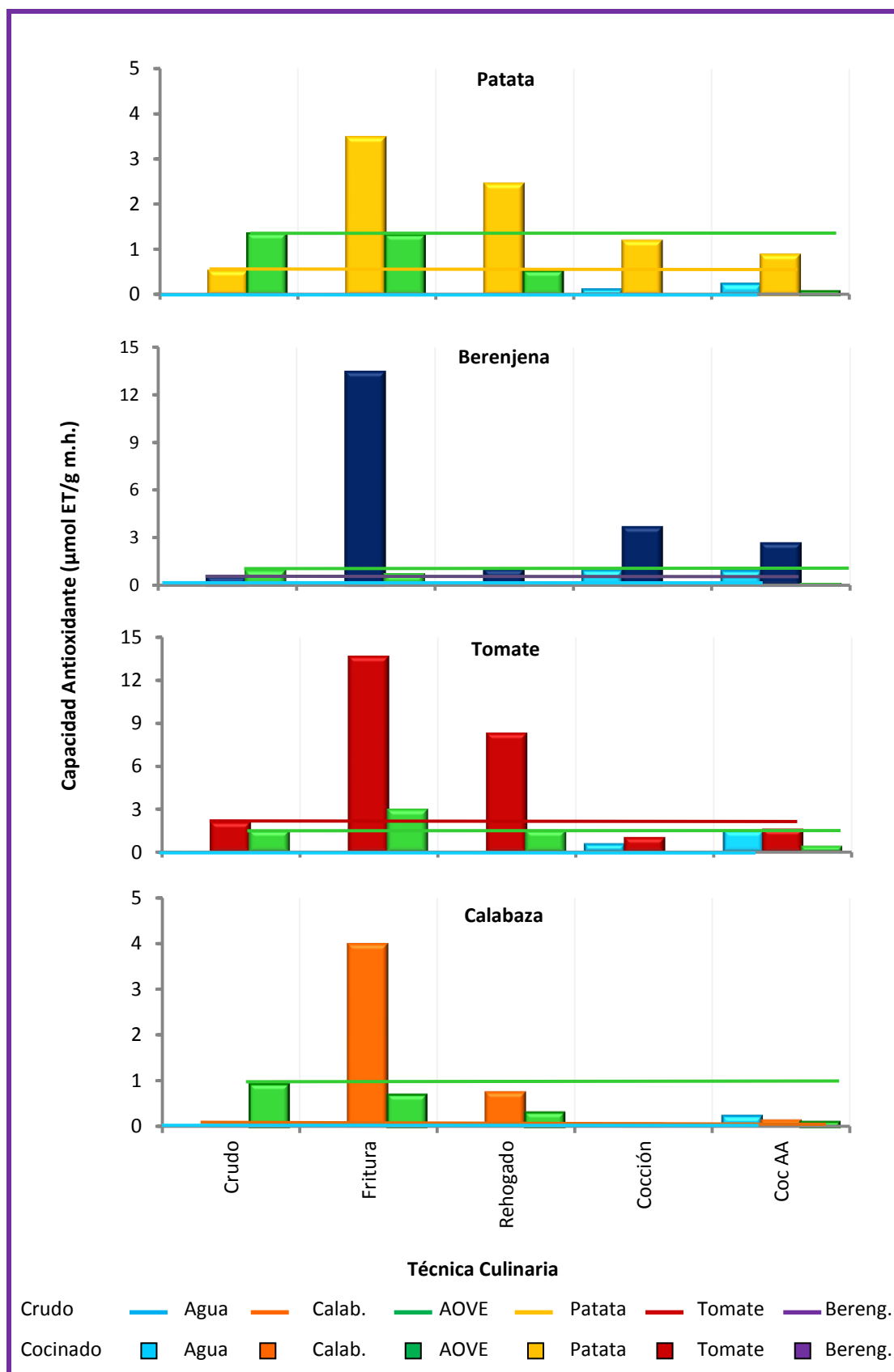


Figura 4.1-1. Capacidad antioxidante por el método DPPH en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

La correlación entre la CA cuantificada por DPPH y la concentración de fenoles totales ha sido referida en alimentos como aceite de oliva virgen extra (Samaniego-Sánchez, 2007), aunque la reportada por este autor fue superior ($r = 0,92$) a la obtenida en este estudio. En berenjena se han obtenido correlaciones entre fenoles totales y CA (método DPPH) que varían entre valores de $r = 0,53$ a $r = 0,79$ (Martínez-Hernández et al., 2013), en setas se obtuvo una correlación baja ($r = 0,52$) pero significativa (Nguyen, Nagasaka and Ohshima, 2012), en patatas fue elevada ($r=0,98$) (Padda and Picha (2008), al igual que en infusiones de té verde ($r = 0,92$) (Samaniego Sánchez et al., 2011) entre otros.

En las determinaciones con el método DPPH se observa (Fig. 4.1-1) que la CA fue significativamente ($p < 0,05$) más elevada en las cuatro hortalizas elaboradas por todas las técnicas que sus respectivos medios de transferencia de calor (AOVE, agua o la mezcla de ambos). Una excepción se encontró en la cocción AA de la calabaza donde la hortaliza presentó una CA menor que el agua de proceso. Otras excepciones son los casos en donde los equivalentes de Trolox de la hortaliza y el medio de cocción no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0,05$), que si bien fue más alta en la primera, no fue significativamente superior, en estos casos se incluyen el del tomate procesado por cocción AA y los de la berenjena cocida, cocida AA y rehogada.

Con la aplicación de las técnicas culinarias, los extractos metanólicos de las fracciones de hortalizas aumentaron la capacidad antioxidante medida por el método DPPH, respecto a la magnitud cuantificada en el aceite crudo, mientras tanto, esta propiedad se mantuvo o redujo en los extractos metanólicos del AOVE.

La fritura redujo la CA del aceite empleado en el ensayo de la patata ($1,29 \mu\text{mol ET/g m.h.}$), berenjena ($0,64 \mu\text{mol ET/g m.h.}$) y calabaza ($0,69 \mu\text{mol ET/g m.h.}$), pero solo en el de esta última la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$), como también significativo fue el incremento en el AOVE recuperado de la fritura del tomate ($2,91 \mu\text{mol ET/g m.h.}$).

Con el rehogado el aceite mantuvo o perdió parte de la CA original. Los cambios fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en la disminución ocasionada al aceite del proceso de la patata ($2,44 \mu\text{mol ET/g m.h.}$) y de la calabaza ($0,75 \mu\text{mol ET/g m.h.}$). Los cambios sin significado estadístico ($p > 0,05$) y en donde por ende se considera que la CA del aceite crudo en

Resultados y Discusión

estos casos se mantuvo inalterada, se detectaron con la reducción ocurrida en el aceite del proceso de la berenjena (1,19 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y durante el incremento en el del proceso del tomate (0,75 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$).

En el AOVE incluido en los ensayos, se observó la siguiente clasificación de acuerdo a la magnitud de la CA en los experimentos de todas las hortalizas: Fritura > Rehogado > Cocción AA.

Como se puede observar (Fig. 4.1-1), la cocción en mezcla AA ocasionó una reducción de la capacidad antioxidante en el aceite, en el de la patata con un valor de 0,08 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$, en el de la berenjena de 0,09 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$, del tomate 0,36 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ y de la calabaza 0,11 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$, la única reducción no significativa ($p > 0,05$) fue la del AOVE del ensayo con berenjena. Al comprobarse la correlación entre la concentración de fenoles y la CA, la reducción de la CA en el AOVE se asocia a la pérdida de fenoles por oxidación, polimerización, por la transferencia de fenoles hacia la hortaliza y por el efecto de dilución de estos hacia el agua (Mulinacci et al., 2004; Navarre, 2010; Rakic et al., 2007; Stewart et al., 2000; Oboh, Raddatz and Henle, 2008; Bunea et al., 2008; Kalt 2005; Blessington et al., 2010; Zhang et al., 2011; Lutz, Henríquez y Escobar, 2011).

La pertinencia de la explicación expuesta es sustentada por el incremento de las concentraciones de fenoles totales (Fig. 3.1-1) y de la CA observados en el agua de proceso. Ya que la modalidad de cocción en mezcla AA sí generó actividad antioxidante significativa en el agua tras la cocción de la calabaza (0,20 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$), tomate (1,42 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y patata (0,21 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$), pero en el ensayo con la berenjena no fue diferente al agua sin tratamiento ($p > 0,05$).

Como se puede observar en las gráficas de la Fig. 4.1-1, al final del proceso culinario de cocción AA, la CA del agua incluida en el ensayo siempre fue superior a la del AOVE con el que formó la mezcla. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en los ensayos de la patata, tomate y calabaza, pero en la berenjena, la CA del agua y el AOVE incluidos no fue estadísticamente diferente ($p > 0,05$).

La CA del agua de cocción resultó ser la más baja de las dos modalidades, pues a excepción del agua de cocción del tomate (0,52 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$), en el resto de muestras no hubo CA mensurable (0 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$).

Tabla 4.1-2. Correlaciones y niveles de significancia de diferentes parámetros en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua, crudas y tras aplicar cuatro técnicas culinarias.

	ABTS	DMPD	DPPH	FRAP	Fenoles	Cont. Humedad	Cont. Grasa	Extracto Seco
Ác. gálico	0,4138* 0,0010**	0,0004 0,9976	0,0882 0,5027	-0,2559 0,0485	0,1526 0,2444	-0,3782 0,0029	-0,0454 0,7306	0,5926 0,0000
Hidroxitirosol	0,5730 0,0000	0,2192 0,0925	0,3660 0,0040	0,2004 0,1247	0,7556 0,0000	-0,6373 0,0000	0,1013 0,4413	0,8732 0,0000
Ác. Dihidroxibenzoico	0,4173 0,0009	0,2171 0,0956	0,5107 0,0000	0,6012 0,0000	0,7216 0,0000	-0,6696 0,0000	0,4076 0,0012	0,6201 0,0000
Tirosol	0,1093 0,4058	0,1057 0,4214	0,4263 0,0007	0,4759 0,0001	0,3685 0,0038	-0,5415 0,0000	0,5244 0,0000	0,2954 0,0220
Ác. Hidroxifenilacetico	-0,1040 0,4292	-0,1738 0,1842	-0,0642 0,6262	-0,0350 0,7906	0,1167 0,3745	0,0272 0,8366	-0,0552 0,6755	0,0263 0,8418
Ác. Hidroxibenzóico	-0,0706 0,5917	0,0265 0,8406	0,5778 0,0000	0,9096 0,0000	0,4399 0,0004	-0,5347 0,0000	0,8078 0,0000	0,0222 0,8662
Ác. clorogenico	-0,1206 0,3588	0,0055 0,9669	0,5448 0,0000	0,8820 0,0000	0,3363 0,0086	-0,4095 0,0012	0,8187 0,0000	-0,1679 0,1996
Ác. vanillico	-0,2742 0,0340	-0,1305 0,3202	0,1342 0,3067	0,4022 0,0014	-0,1313 0,3173	-0,1690 0,1968	0,5105 0,0000	-0,2681 0,0383
Ác. cafeico	0,2811 0,0296	0,1440 0,2722	0,7351 0,0000	0,6701 0,0000	0,6962 0,0000	-0,7206 0,0000	0,7388 0,0000	0,3935 0,0019
Ác. siríngico	0,3825 0,0026	-0,0237 0,8573	0,4931 0,0001	0,3747 0,0032	0,6362 0,0000	-0,6007 0,0000	0,3936 0,0019	0,5366 0,0000
Ác. p-cumárico	-0,0619 0,6383	0,1006 0,4444	0,6018 0,0000	0,9241 0,0000	0,4268 0,0007	-0,5358 0,0000	0,8652 0,0000	-0,0276 0,8343
Ác. o-vaníllico	0,0836 0,5255	0,5593 0,0000	0,0050 0,9695	-0,0753 0,5674	0,0773 0,5571	-0,0710 0,5901	-0,1064 0,4185	0,2071 0,1123
Ác. o-cumárico	0,1511 0,2492	-0,0281 0,8314	-0,1826 0,1626	-0,1495 0,2542	-0,0001 0,9993	-0,3617 0,0045	0,0103 0,9377	0,4770 0,0001
Oleuropeina	0,6117 0,0000	0,0490 0,7099	0,2132 0,1019	0,0338 0,7977	0,2232 0,0865	-0,6030 0,0000	0,2143 0,1001	0,6625 0,0000
Rutina	0,2986 0,0205	0,0118 0,9287	0,5161 0,0000	0,1346 0,3054	0,5712 0,0000	-0,1902 0,1456	-0,0381 0,7725	0,3758 0,0031
Pinorresinol	0,5110 0,0000	0,0127 0,9232	0,6450 0,0000	0,4324 0,0006	0,5357 0,0000	-0,7304 0,0000	0,5653 0,0000	0,5543 0,0000
Luteolina	0,4748 0,0001	-0,0275 0,8346	0,3622 0,0045	0,0170 0,8972	0,4044 0,0014	-0,4870 0,0001	0,0367 0,7806	0,6890 0,0000
Apigenina	-0,0861 0,5130	0,0774 0,5567	-0,1005 0,4448	0,0761 0,5635	-0,1156 0,3791	-0,0214 0,8708	0,1388 0,2904	-0,1134 0,3881
ABTS	-	0,4491 0,0003	0,2979 0,0208	0,0850 0,5187	0,5182 0,0000	-0,5550 0,0000	0,0450 0,7328	0,7975 0,0000
DMPD	-	-	0,0495 0,7073	0,0692 0,5995	0,1711 0,1912	-0,1826 0,1626	-0,0229 0,8622	0,2958 0,0217
DPPH	-	-	-	0,7573 0,0000	0,7788 0,0000	-0,7046 0,0000	0,7001 0,0000	0,4141 0,0010
FRAP	-	-	-	-	0,7036 0,0000	-0,6572 0,0000	0,8386 0,0000	0,1982 0,1289
Fenoles totales	-	-	-	-	-	-0,7676 0,0000	0,5056 0,0000	0,7098 0,0000
Cont. humedad	-	-	-	-	-	-	-0,7534 0,0000	-0,7691 0,0000
Cont. grasa	-	-	-	-	-	-	-	0,1646 0,2089
Extracto seco	-	-	-	-	-	-	-	-

*Valor de la correlació (r).

**Nivel de significado estadístico (p < 0,05).

En un trabajo de Zhang et al., (2011) se hace referencia a la migración de una elevada cantidad de sustancias hacia el medio de cocción después del hervido de brotes de bambú, lo que dio lugar al descenso de la CA cuantificada por el método DPPH en los brotes y al incremento en el agua, e igual referencia se hizo durante el procesamiento de pimientos (Chuah et al., 2008). Estas observaciones motivan la recomendación del consumo del agua incluida en el cocinado de los alimentos (López-Berenguer et al., 2007).

4.2. Evaluación de la capacidad antioxidante con el método ABTS.

El modelo basado en el radical ABTS* para determinar la habilidad de captación de radicales libres, tiene la ventaja de ser más afín a compuestos hidrofílicos y de minimizar la interferencia con el espectro de absorción ya que el máximo aplicado es 760 nm, una longitud de onda que no se encuentra normalmente en productos naturales (Re et al. 1999; Pulido et al., 2003).

La capacidad antioxidante cuantificada en $\mu\text{mol ET/g m. h.}$ en el agua de cocción, en los extractos metanólicos de las hortalizas y en aceite tanto crudos como tratados en los ensayos con alimento y testigo se muestran en la Tabla 4.2-1.

Los valores cuantificados por el método ABTS variaron dentro de los límites establecidos por el valor mínimo de $0,15 \mu\text{mol ET/g m. h.}$ correspondiente al AOVE de la cocción AA del tomate y $19,19 \mu\text{mol ET/g m. h.}$ de la berenjena frita.

La CA se agrupó de acuerdo a la fracción analizada (hortaliza, AOVE, agua) de modo que las hortalizas mostraron los valores más elevados, el AOVE valores medios y el agua los valores bajos del estudio, excepto en el agua de cocción de la berenjena en donde se encontró un elevado valor de CA ($0,89 \mu\text{mol ET/g m. h.}$). La excepción al patrón descrito se encontró en las muestras de hortaliza de los experimentos con berenjena, en donde no hubo una estratificación clara de la magnitud de la CA de las fracciones.

Tabla 4.2-1. Capacidad antioxidante medida por el método ABTS en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua, obtenidas en crudo y tras aplicar cuatro técnicas culinarias. Cada valor promedia tres repeticiones (n = 3).

Parámetro	Técnica culinaria	Fracción	Hortaliza			
			Patata*	Berenjena	Tomate	Calabaza
Capacidad Antioxidante (μmol ET/g m.h.) Método ABTS	Crudo	Hortaliza	3,66 ± 0,19 g**	1,34 ± 0,08 cd	0,52 ± 0,02 d	3,51 ± 0,25 i
		AOVE	1,17 ± 0,07 d	2,27 ± 0,19 f	0,47 ± 0,02 de	1,31 ± 0,02 e
		Agua	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
	Fritura	Hortaliza	10,13 ± 0,13 k	18,19 ± 1,46 e	11,06 ± 0,14 j	1,71 ± 0,06 f
		AOVE	5,37 ± 0,35 i	1,52 ± 0,11 d	0,85 ± 0,09 g	1,17 ± 0,02 d
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Rehogado	Hortaliza	4,91 ± 0,30 h	3,43 ± 0,1 h	0,81 ± 0,02 f	2,96 ± 0,03 h
		AOVE	0,89 ± 0,02 c	0,27 ± 0,03 g	0,73 ± 0,03 e	0,72 ± 0,05 c
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Cocción	Hortaliza	2,57 ± 0,03 f	4,10 ± 0,06 i	2,94 ± 0,16 i	2,81 ± 0,14 g
		AOVE	-----	-----	-----	-----
		Agua	0,62 ± 0,04 b	0,89 ± 0,05 j	0,29 ± 0,01 c	0,25 ± 0,01 b
	Cocción A/A	Hortaliza	5,67 ± 0,16 j	2,43 ± 0,14 f	1,75 ± 0,05 h	1,35 ± 0,02 e
		AOVE	0,50 ± 0,02 b	0,34 ± 0,02 b	0,15 ± 0,01 b	0,32 ± 0,01 b
		Agua	1,69 ± 0,03 e	1,23 ± 0,06 c	0,54 ± 0,02 de	0,76 ± 0,1 c

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.
 **Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes (p>0,05).

Los valores iniciales cuantificados en las hortalizas fueron de 3,66 μmol ET/g m. h. en la patata, 1,34 μmol ET/g m. h. en la berenjena, 0,52 μmol ET/g m. h. en el tomate y 3,51 μmol ET/g m. h. en la calabaza. Por su parte la CA de los lotes de aceite empleados con cada hortaliza fue de 1,17, 2,27, 0,47 y 1,31 μmol ET/g m. h. para los ensayos con patata, berenjena, tomate y calabaza, respectivamente (Tabla 4.2-1).

En el estudio con el ABTS se observa que la tendencia general, es a incrementar la CA de las hortalizas como efecto de la aplicación de las técnicas culinarias (Fig. 4.2-1). El fenómeno persistente y constante al igual que en el método DPPH es que, al final de los ensayos, esta propiedad siempre fue superior a la CA inicial de la hortaliza cruda, a excepción de la calabaza procesada por todas las técnicas en la que todos los valores encontrados fueron significativamente (p < 0,05) inferiores a los de la hortaliza cruda (fritura y cocción AA) pero superiores al medio de transferencia de calor. A continuación se detallan los cambios generados tras la aplicación de cada técnica culinaria.

Durante la fritura se generó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de la CA respecto a las hortalizas crudas en la patata (10,13 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$), la berenjena (18,19 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$) y en el tomate (11,06 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$), pero una reducción en la calabaza (1,72 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$).

Durante el rehogado y la cocción se generó el mismo efecto sobre la CA de las hortalizas que en la fritura. El rehogado provocó cambios con significado estadístico ($p < 0,05$) en todas las hortalizas que estuvieron orientados hacia el incremento en la patata (4,91 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$), berenjena (3,43 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$) y en el tomate (0,81 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$) y hacia la reducción en la calabaza (2,96 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$).

En la cocción AA los incrementos y el descenso se desplegaron en las mismas hortalizas que en el rehogado pero con valores de 5,67 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$ en la patata, 2,43 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$ en la berenjena, 1,75 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$ en el tomate y 1,35 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$ en la calabaza. Durante la cocción, se midió un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de los equivalentes de Trolox respecto a las hortalizas crudas en la berenjena (4,1 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$) y el tomate (1,75 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$), y una reducción en la patata (2,57 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$) y la calabaza (2,81 $\mu\text{mol ET/g m. h.}$).

Del mismo modo que en el estudio con el DPPH, el incremento de la extractabilidad de los compuestos antioxidantes, que es favorecida por la destrucción térmica de la pared celular y de los compartimientos subcelulares (Martínez–Hernández et al., 2013) condicionó el incremento de la concentración de compuestos antioxidantes cuantificados en las hortalizas y con ello el incremento simultáneo de la CA.

Acorde con los resultados de este estudio, que muestran incrementos en la CA, son los presentados por (Adefegha And Oboh, 2011) en hojas verdes comestibles hervidas, y los expuestos por Miglio et al. (2008) en zanahorias y calabacines hervidos, salteados y cocidos al vapor. Por el contrario, en el estudio de Danesi and Bordoni (2008) se observó la reducción de la CA medida por el método ABTS (20 %) en tomates hervidos respecto a los frescos.

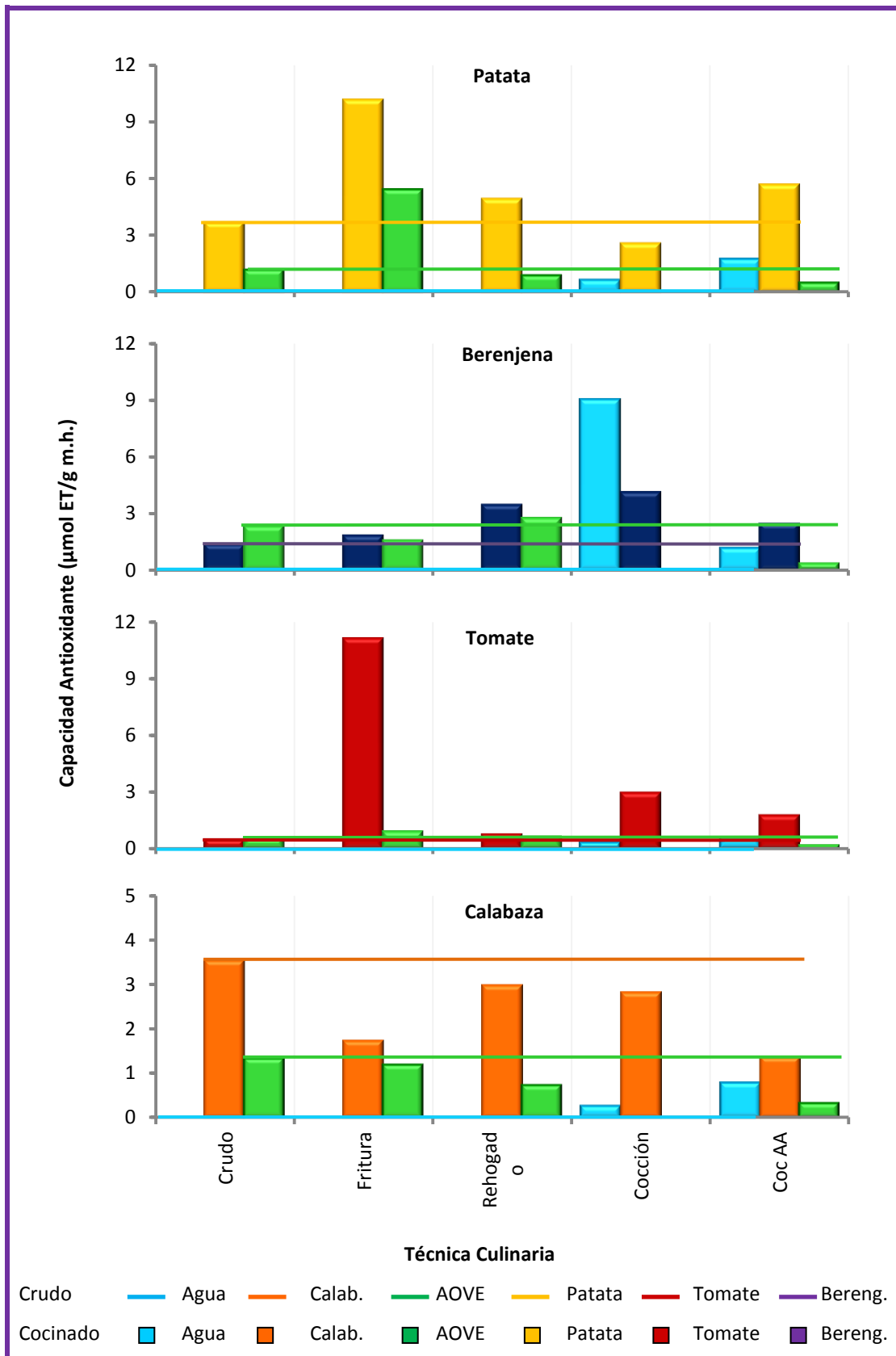


Figura 4.2-1. Capacidad antioxidante por el método ABTS en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

Las clasificaciones en orden decreciente de las técnicas culinarias según la CA medida en cada vegetal procesado fueron, para la patata “fritura > cocción AA > rehogado > crudo > cocción”, en la berenjena “cocción > rehogado > cocción AA > fritura > crudo”, “fritura > cocción > cocción AA > rehogado > crudo”, y en la calabaza “crudo > rehogado > cocción > fritura > cocción AA”.

Como se puede observar en los “ranking” expuestos, con los datos obtenidos con el método ABTS en las fracciones de hortaliza no se encontró una tendencia general clara que diera indicio de una clasificación de las técnicas culinarias aplicable a las cuatro hortalizas

Las limitaciones del método ABTS pudieron contribuir a que en el estudio de la CA solo hayan sido establecidas claramente las diferencias más marcadas por ejemplo entre crudos y procesados o incluso entre fritos, pero que las más sutiles entre las distintas técnicas culinarias no hayan sido correctamente diferenciadas, por ejemplo entre el crudo y las dos modalidades de cocción o entre éstas últimas y el rehogado.

Un efecto parecido fue observado por Gahler, Otto and Bohm, (2003) quien realizó estudios para determinar el efecto de diferentes etapas de la elaboración de productos a base de tomate sobre la CA determinada por los métodos ABTS y FRAP, donde hicieron referencia que no todos los efectos de las temperaturas y los procesos ensayados fueron detectados por ambos métodos. El aumento durante la homogeneización y el horneado a 180, 200 y 220°C se detectaron con el método FRAP y no con el ABTS. Pero con el ABTS se cuantificaron los cambios más intensos, por ejemplo los ocurridos a partir de los 200°C, y los de mayor magnitud como los originados durante la elaboración de salsa y de sopa solo fueron perceptibles con el test.

Como se aprecia en la Fig. 4.2-1, cuando se comparan los valores finales cuantificados en la fracción de hortaliza respecto a los del medio de transferencia de calor, sea aceite, agua o la mezcla de ambos, siempre fueron superiores los de la primera, excepto en la cocción de la berenjena en donde el agua de proceso mostró mayor CA que la hortaliza cocida. Tuvieron significado estadístico ($p < 0,05$) tanto las diferencias más notorias como las observadas en la patata y en la calabaza como en las menos aparentes como las de algunos tratamientos culinarios de la berenjena y el tomate.

En la fracción de aceite, las muestras de AOVE presentaron los menores valores de equivalentes de Trolox como resultado de la incorporación de aceite y/o sus compuestos antioxidantes por la hortaliza; así como por efecto de la disolución de estos compuestos desde el aceite hacia el agua de cocción en conjunto con la destrucción y transformación de antioxidantes por las elevadas temperaturas (Martínez–Hernández et al., 2013).

Durante el rehogado hubo cambios estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en el AOVE, reducciones en los casos de la patata ($0,89 \mu\text{mol ET/g m. h.}$) y calabaza ($0,72 \mu\text{mol ET/g m. h.}$) e incrementos en la berenjena ($0,27 \mu\text{mol ET/g m. h.}$). En el aceite del rehogado del tomate se conservó la CA inicial del aceite crudo, pues el aumento detectado no fue estadísticamente significativo ($p > 0,05$). Tras la fritura el número de incrementos y reducciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se igualaron. Hubo reducción en el AOVE del proceso de la berenjena ($1,52 \mu\text{mol ET/g m. h.}$) y la calabaza ($1,17 \mu\text{mol ET/g m. h.}$), e incrementos en la patata ($5,37 \mu\text{mol ET/g m. h.}$) y el tomate ($0,85 \mu\text{mol ET/g m. h.}$)

Durante la cocción en mezcla AA hubo reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la CA del AOVE que acompañó el procesamiento de la patata ($0,5 \mu\text{mol ET/g m. h.}$), de la berenjena ($0,34 \mu\text{mol ET/g m. h.}$), el del tomate ($0,15 \mu\text{mol ET/g m. h.}$), y de la calabaza ($0,32 \mu\text{mol ET/g m. h.}$). Por ende, se considera en este caso que parte de los fenoles que dan origen a esta propiedad migraron hacia el agua de cocción.

Efectivamente, en la modalidad de cocción AA la fracción de agua resultó enriquecida ($1,69$, $1,23$, $0,54$ y $0,76$, $\mu\text{mol ET/g m. h.}$, en la patata, berenjena, tomate y calabaza, respectivamente) (Fig. 4.2-1), hasta valores inferiores a las hortalizas procesadas, pero significativamente superiores ($p < 0,05$) a los del AOVE. También resultó enriquecida tras la cocción con valores significativamente inferiores a los de la hortaliza cocida ($0,62$, $0,89$, $0,29$ y $0,25 \mu\text{mol ET/g m. h.}$ en la patata, berenjena, tomate y calabaza, respectivamente).

La CA cuantificada por el método DPPH mostró una correlación significativa ($p > 0,05$) pero con valor bajo ($r = 0,51$) con el contenido de fenoles totales (Tabla 4.1-2). En otros estudios se ha encontrado una correlación positiva significativa entre el contenido de polifenoles y el método ABTS, como es el caso de patatas cocidas ($r=0,93$) (Rautenbach et al., 2010) y en AOVE los datos de capacidad antioxidante obtenidos por este método mostraron la mejor correlación con la concentración de fenoles totales ($r^2 = 0,89$) (Samaniego-Sánchez et al., 2007).

En la técnica que usa el radical sintético ABTS, a diferencia de la que usa el DPPH, el radical tiene mayor afinidad por compuestos solubles en agua y generalmente, en alimentos, se obtienen cuantificaciones superiores a las del método DPPH que está diseñado para la prueba de sustancias apolares y que es más selectivo en la reacción con donadores de H. Por lo expuesto, en este estudio se considera que la tendencia a lecturas superiores por el método ABTS en algunos de los ensayos culinarios fueron el resultado tanto de la mayor aplicación alimentaria del método; como de la cuantificación de otras sustancias polares diferentes a los fenoles en las fracciones estudiadas (aceite, agua y patata), ya que el radical ABTS tiene poca selectividad en la reacción con donadores de átomos de hidrógeno y además de reaccionar con los fenoles, tiene afinidad por cualquier compuesto aromático hidroxilado (ácidos aromáticos) independientemente de su potencial antioxidante real (Huang et al., 2005; Roginsky and Lissi, 2005).

A pesar de lo anterior, en experimentos como el que se plantea en este estudio, en donde no solo se estudian alimentos cuya composición mayoritaria consiste en agua, sino también se incluyen materias primas como el AOVE, cuya composición es lipídica, y productos elaborados con diferentes proporciones de agua y grasa, es importante valorar la versatilidad del método seleccionado para la evaluación de la capacidad antioxidante, pues la aplicación de un método tan enfocado al análisis de compuestos hidrosolubles como el ABTS no dará un panorama completo de la CA generada por fenoles cuya polaridad es variada, sobre todo con los correspondientes al AOVE (por ejemplo pinorresinol) y algunos presentes en las hortalizas (fenoles de hidrofobicidad intermedia como rutina y ácido clorogénico), que a pesar de ser hidrosolubles por naturaleza, el grado en que cada uno de ellos despliegan esta propiedad es propiedad (Abushita et al., 2000; Sacchi et al., 2002; Danesi and Bordon, 2008; Valverdú-Queralt, et al., 2012).

4.3. Evaluación de la capacidad antioxidante con el método FRAP.

Este método mide la habilidad del Hierro como agente reductor a pH básico del complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe^{3+} - TPTZ) a la forma ferrosa (Fe^{2+} - TPTZ) desarrollando una intensa coloración azul. La variación de la absorbancia a 593 nm está directamente correlacionada con la potencia de reducción del antioxidante donador de electrones presente en la reacción (Benzie and Strain, 1996)

Los datos de la CA determinada por este método en todas las fracciones de las cuatro hortalizas oscilaron entre los 0,03 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ del agua de cocción de la calabaza y los 99,17 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ del agua de cocción de la berenjena. Con la aplicación de este test se observaron valores excesivamente altos en algunos de los ensayos con berenjena, en la fracción del agua de la cocción y de la cocción AA, así como en la hortaliza frita (Tabla 4.3-1).

Los valores de CA en los alimentos crudos que sirvieron como parámetro de referencia en la valoración de los incrementos (Fig. 4.3-1) ascendieron a 0,68 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la patata, 1,41 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la berenjena, 2,02 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en el tomate y 1,27 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la calabaza, mientras que en el aceite crudo se midieron valores de 1,44, 2,45, 0,86 y 2,44 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en los lotes destinados al procesamiento de la patata, berenjena, tomate y calabaza, respectivamente.

Con la determinación de la CA por el método FRAP en las muestras sólidas obtenidas tras la aplicación de las técnicas culinarias en las cuatro hortalizas de este estudio se mantuvieron las tendencias descritas en los métodos ABTS y DPPH:

- A incrementar la CA de la fracción sólida respecto a la cuantificada en las hortalizas crudas. Siendo el tomate cocido por las dos modalidades y la calabaza cocida AA los únicos casos en que hubo reducción significativa ($p < 0,05$) de este parámetro.
- A encontrar valores más elevados de CA en la fracción de hortaliza que en su respectivo medio de transferencia de calor (aceite, agua, agua/aceite), la excepción en este caso fueron las fracciones de berenjena cocida y cocida AA, en donde el valor final de CA fue inferior al del agua de cocción (Fig. 4.3-1).

Tabla 4.3-1. Capacidad antioxidante medida por el método FRAP en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua, obtenidas en crudo y tras aplicar cuatro técnicas culinarias. Cada valor promedia tres repeticiones (n = 3).

Parámetro	Técnica culinaria	Fracción	Hortaliza			
			Patata*	Berenjena	Tomate	Calabaza
Capacidad Antioxidante ($\mu\text{mol ET/g m.h.}$) Método FRAP	Crudo	Hortaliza	0,68 \pm 0,01b	1,41 \pm 0,08ab	2,02 \pm 0g	1,27 \pm 0,06c
		AOVE	1,44 \pm 0,11d	2,45 \pm 0,14ab	0,86 \pm 0,01de	2,44 \pm 0,08e
		Agua	0 \pm 0a **	0 \pm 0a	0 \pm 0a	0 \pm 0a
	Fritura	Hortaliza	1,78 \pm 0f	38,88 \pm 1,02d	16,97 \pm 1,05i	8,1 \pm 0,59g
		AOVE	1,51 \pm 0,01de	2,21 \pm 0,08ab	2,31 \pm 0,13gh	2,84 \pm 0,69f
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Rehogado	Hortaliza	1,54 \pm 0,17e	2,69 \pm 0,28b	2,43 \pm 0,03h	2,78 \pm 0,05f
		AOVE	0,6 \pm 0,05b	0,33 \pm 0,01ab	1,38 \pm 0,09f	1,55 \pm 0,06d
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Cocción	Hortaliza	0,88 \pm 0,02c	10,42 \pm 0,82c	0,57 \pm 0,04cd	1,22 \pm 0,03
		AOVE	-----	-----	-----	-----
		Agua	0 \pm 0a	66,86 \pm 2,67e	0,15 \pm 0ab	0,03 \pm 0a
	Cocción A/A	Hortaliza	0,93 \pm 0,03c	10,13 \pm 0,49c	1,09 \pm 0,04ef	0,56 \pm 0,05
		AOVE	2,06 \pm 0,07g	0,25 \pm 0ab	0,41 \pm 0,03bc	0,42 \pm 0,2b
		Agua	0 \pm 0a	99,17 \pm 6,11f	0,53 \pm 0,05cd	0,47 \pm 0,02b

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.

**Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En la fracción de hortaliza, el efecto que originó cada técnica culinaria y que se vislumbra gráficamente en la Fig. 4.3-1 se detalla a continuación.

En la fritura, claramente se observan incrementos de la CA respecto a la hortaliza cruda a raíz del procesamiento culinario, estos incrementos resultaron significativos tras la valoración estadística. Las cuatro hortalizas resultaron enriquecidas hasta niveles de 1,78 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la patata, 38,88 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la berenjena, 16,97 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en el tomate y 8,1 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la calabaza.

Durante el rehogado los incrementos no fueron tan marcados como los observados en la fritura, de manera que los cuantificados en la patata (1,54 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y la calabaza (2,78 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) no fueron lo suficientemente grandes como para generar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), por el contrario, en la berenjena (2,69 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y el tomate (2,43

$\mu\text{mol ET/g m.h.}$) estas diferencias fueron más marcadas ($p < 0,05$) y resultaron estadísticamente significativas, por ello, se consideró que en estos dos casos las concentraciones iniciales se mantuvieron inalteradas por el tratamiento culinario.

La tendencia a incrementar el valor de equivalentes de Trolox en la hortaliza que fue detallada en las dos técnicas anteriores, se mantuvo en la cocción AA, sin embargo se vio atenuada por la presencia de una reducción con significado estadístico ($p < 0,05$) en la calabaza cocida ($0,56 \mu\text{mol ET/g m.h.}$) y la falta de diferencia estadística significativa ($p > 0,05$) tras el incremento cuantificado en el tomate ($1,09 \mu\text{mol ET/g m.h.}$). El incremento fue significativo en las dos hortalizas restantes con magnitudes que alcanzaron los $0,93$ y $10,13 \mu\text{mol ET/g m.h.}$ para la patata y la berenjena, respectivamente.

En la cocción se presentaron por igual incrementos y reducciones. Los incrementos en la patata ($0,88 \mu\text{mol ET/g m.h.}$) y en la berenjena ($10,42 \mu\text{mol ET/g m.h.}$), siendo en ambos casos significativos ($p < 0,05$), mientras que las reducciones, fueron significativas solo en el ensayo con tomate ($0,57 \mu\text{mol ET/g m.h.}$) y por lo tanto, no causaron diferencia significativa ($p > 0,05$) respecto a la CA de la hortaliza cruda en la calabaza ($1,22 \mu\text{mol ET/g m.h.}$).

En los resultados de la CA medida por el método FRAP sí fue posible vislumbrar una categorización de las técnicas culinarias, ya que en tres de las cuatro hortalizas ensayadas (patata, tomate y calabaza) se reprodujo la misma clasificación de las técnicas culinarias de acuerdo a la magnitud de la CA (Tabla 4.3-1). De manera que el alimento frito mostró mayor capacidad antioxidante que el rehogado, y este a su vez que el cocido. La CA de la fracción obtenida de la cocción AA fue inferior a la cocción en el caso de la calabaza, pero en la patata y el tomate las dos modalidades de cocción no fueron significativamente diferentes entre sí ($p > 0,05$). En la berenjena la secuencia descrita no se repitió, si bien, la CA de la muestra frita fue superior a las muestras procesadas por el resto de técnicas, las muestras cocidas por ambos métodos fueron superiores a las rehogadas.

Otros autores observaron incrementos en la CA medida por el método FRAP en brócoli hervido y asado a la parrilla de 2,9 a 5,4 veces respecto a la hortaliza cruda, incluso durante el hervido a pesar de la lixiviación de compuestos fenólicos hacia el agua de cocción (Martínez-Hernández, et al., 2013). En la calabaza se observó un efecto positivo sobre la CA con el hervido, asado y fritura (Dini, Tenore and Dini, 2013). Por su parte Pellegrini et al. (2009) reportó resultados variables

Resultados y Discusión

que dependían de la hortaliza y del método culinario aplicado, por ejemplo, en brasicáceas, patatas, calabacines y zanahorias el hervido incrementó la CA, pero lo redujo en la coliflor y calabacines. Este autor también encontró incrementos en las mismas hortalizas cuando fueron elaboradas por fritura de inmersión, pero reducción durante la fritura en superficie (salteado).

Volden et al. (2009) encontró una reducción de la CA y de las variables relacionadas con esta (contenido de fenoles totales) en coliflor de diversas variedades y estableció el siguiente ranking de orden descendente de acuerdo a la magnitud de las reducciones encontradas: hervido > escaldado > cocción al vapor. En todos estos casos fue encontrada la reducción en los parámetros relacionados con la capacidad antioxidante en el agua de proceso. Y en algunos casos las recuperaciones totales de FRAP, ORAC y fenoles totales fueron significativamente superiores al 100%.

En la fracción de hortaliza procesada fueron cuantificados valores de CA más altos que los de su respectivo medio de transferencia de calor (aceite, agua, agua/aceite). Fueron superiores a los del aceite de proceso, excepto en la cocción AA de la patata, en donde el aceite superó a la hortaliza, y en el del rehogado de la berenjena en donde no hubo diferencia estadística significativa entre la hortaliza y el aceite ($p > 0,05$). También fue superior la CA de la hortaliza respecto a la del agua de proceso en la cocción AA y la cocción, las excepciones fueron, el agua de cocción por ambas modalidades en los ensayos con berenjena, en donde el agua fue más antioxidante que la hortaliza, y la de la cocción AA de la calabaza que fue tan antioxidante como la hortaliza procesada (Fig. 4.3-1).

Con referencia a la fracción de AOVE incluido en los experimentos, también se puede observar (Fig. 4.3-1) que tiende a mantener o reducir la capacidad antioxidante respecto a la medida en el alimento crudo.

Las variaciones que no tuvieron significado estadístico en la fritura ($p > 0,05$), fueron el incremento en el AOVE del ensayo con la patata ($1,51 \mu\text{mol ET/g m.h.}$), y la reducción en el del proceso de la berenjena ($2,21 \mu\text{mol ET/g m.h.}$). En el aceite del rehogado hubo dos reducciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$), las del proceso con patata ($0,06 \mu\text{mol ET/g m.h.}$) y con calabaza ($1,55 \mu\text{mol ET/g m.h.}$), y dos cambios sin significado estadístico ($p > 0,05$) la reducción tras el rehogado de la berenjena ($0,33 \mu\text{mol ET/g m.h.}$) y el incremento con el tomate ($1,38 \mu\text{mol ET/g m.h.}$).

En la cocción AA hubo tres casos de reducción en el aceite recuperado del proceso pero solo una fue significativa, la del aceite de proceso con calabaza (0,42 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$), mientras que las variaciones de la CA de los aceites del proceso con berenjena (0,25 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y tomate (0,41 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) no tuvieron significado estadístico ($p > 0,05$).

Se observaron tres casos en donde hubo un incremento significativo ($p < 0,05$): el del aceite de la cocción AA de la patata (2,06 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$), y los de la fritura del tomate (2,31 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y la calabaza (2,84 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$).

Las reducciones de la CA del AOVE encuentran explicación en la asociación que existe de esta característica con la concentración de fenoles totales ($r = 0,70$) (Tabla 4.1-2), y la reducción de estos por oxidación, polimerización, por la dilución hacia la hortaliza o hacia el agua. Este último efecto es puesto en evidencia por el incremento de las concentraciones de fenoles propios del AOVE como la Oleoeuropeína y el Pinorresinol observadas en el agua de proceso que han sido detallados en los apartados anteriores (3.2.1) para explicar este evento.

Sin embargo, los incrementos de la CA del AOVE procesado respecto a la de las muestras frescas, aunque representan casos aislados, se repiten a lo largo de este estudio.

La explicación no es sencilla de abordar, pues, el AOVE al no presentar una matriz estructural como es el caso de las hortalizas, no hay posibilidad de atribuir el incremento de la CA al aumento de la concentración de antioxidantes por ruptura de estructuras o por liberación de moléculas fenólicas de las redes de fibra. Sin embargo se ha postulado que el incremento de temperatura durante la aplicación de las técnicas culinarias, puede producir una rotura supramolecular de los puentes glicosídicos entre las fracciones fenólicas y los azúcares (Bunea et al., 2008), lo que puede explicar el incremento de la concentración de fenoles observadas en algunas muestras de aceite procesado (el recuperado de la fritura del tomate y la calabaza, y el del rehogado de la segunda) y por ende también el incremento de la capacidad antioxidante. El procesamiento doméstico altera la estructura química de compuestos antioxidantes lo que hace posible la conversión de fenoles insolubles en formas más solubles (Cohen, Sakihama, and Yamasaki, 2001).

Resultados y Discusión

Incluso, el aumento de la CA sin el incremento simultáneo del contenido de antioxidantes ya ha sido previamente referido, y es que ciertos polifenoles parcialmente oxidados aumentan sus propiedades antioxidantes, este incremento puede atribuirse a su mayor habilidad de donar un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo aromático a un radical libre y/o a la capacidad de su estructura aromática de soportar el electrón desapareado a través de la deslocalización alrededor del sistema electrónico π (Nicoli et al., 1999).

En la fracción de agua de la cocción AA, la tendencia de la CA cuantificada por el método FRAP respecto a la CA del AOVE correspondiente, fue a disminuir o mantenerse sin cambio tras el ensayo culinario. Hubo una disminución neta en la patata (0 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$), tomate (0,53 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y calabaza (0,47 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$), que solo fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la segunda hortaliza y un incremento con significado estadístico ($p < 0,05$) en la berenjena (99,17 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$).

Como se observa en la Fig. 4.3-1, la fracción de agua de las dos modalidades de la técnica de cocción fue a ganar CA tras el tratamiento culinario. La tendencia de esta fracción en la cocción AA fue expuesta en el párrafo anterior, y en la cocción, como ya se mencionó, la CA del agua fue inferior a la de la fracción sólida recuperada del proceso, con valores de 0 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la patata, 66,86 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la berenjena, 0,15 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en el tomate y 0,03 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la calabaza. En el agua de cocción de la patata y el tomate, el efecto antioxidante adquirido con la aplicación de las técnicas culinarias fue tan bajo que no hubo diferencia significativa ($p > 0,05$) respecto al agua cruda, pero en la calabaza y la berenjena si lo fue ($p < 0,05$).

En este trabajo la ausencia de actividad antioxidante en el agua de cocción de los vegetales no necesariamente indica la falta de migración neta de las sustancias que la originan desde la hortaliza o el aceite hacia el agua (como ha sido comprobado). Mejor dicho, probablemente muestra la desaparición de los compuestos antioxidantes recién incorporados (fenoles principalmente) como resultado de una degradación tan acelerada que superó la tasa de solubilización. Este fenómeno fue demostrado por Mc Dougall, Dobson and Jordan-Mahy (2010) quienes encontraron durante la aplicación de tratamientos hidrotérmicos en ruibarbo una cinética de cambios en la CA y el contenido de fenoles totales del agua de proceso que consistió en un incremento de la concentración de los compuestos, seguido de una estabilización y, tras mayores tiempos de procesamiento (20-30 min), el descenso de estos parámetros.

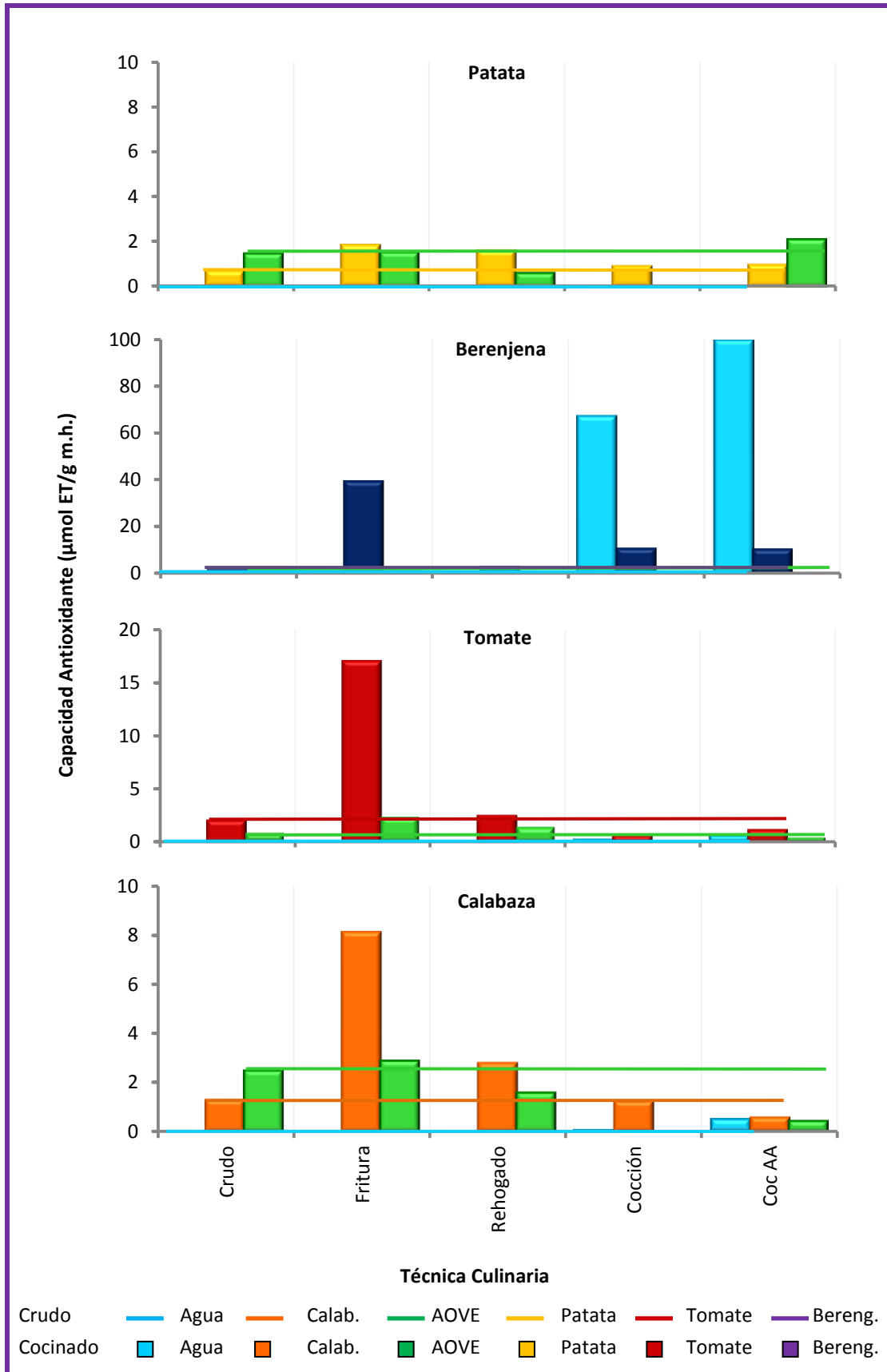


Figura 4.3-1. Capacidad antioxidante por el método FRAP en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

También se encontró una correlación significativa ($p < 0,05$) y más robusta ($r = 0,70$) con el contenido de fenoles totales, que la desplegada por el método ABTS pero que no supera la del método DPPH (Tabla 4.1-2). En el estudio con berenjenas se han descrito correlaciones significativas entre la CA (FRAP) y el contenido de Ácido Clorogénico y sus derivados (Devanand, 2012) y en patatas cocidas se encontró una correlación significativa positiva entre el contenido de polifenoles y el método FRAP ($r=0,95$) y ABTS ($r=0,93$) (Rautenbach et al., 2010)

Los resultados obtenidos en este estudio por los métodos FRAP y DMPD también estuvieron significativamente ($p < 0,05$) correlacionados ($r = 0,76$). Ambos ensayos suelen usarse en conjunto en el estudio del efecto del procesamiento doméstico sobre la CA. El primero para determinar la capacidad reductora de una muestra y el segundo para evaluar la actividad captadora de radicales libres (Dini, Tenore and Dini, 2013). Los compuestos antioxidantes, como los polifenoles, pueden ser agentes reductores del Hierro Férrico muy eficientes, pero algunos no son eficientes captadores de radicales DPPH a causa de obstáculos estéricos (Dini, Tenore and Dini, 2010).

4.4. Evaluación de la capacidad antioxidante con el método DMPD.

Este test asegura la sensibilidad y reproducibilidad en la cuantificación de la actividad antioxidante de compuestos hidrofílicos, aunque existen reportes de que también es eficaz para evaluar los liposolubles (Corral-Aguallo et al., 2008; Rodriguez-Nogales et al., 2011). La eficacia del método DMPD en alimentos fue evaluada inicialmente en muestras de vino italiano ya que la CA de esta bebida proviene casi exclusivamente de la cantidad de compuestos fenólicos presentes (Fogliano et al., 1999a).

Los valores de la CA cuantificados por este método en todas las fracciones, oscilaron en el rango comprendido entre el mínimo encontrado en el AOVE recuperado del rehogado de la berenjena ($0,49 \mu\text{mol ET/g m.h.}$) y el máximo ($15,54 \mu\text{mol ET/g m.h.}$) cuantificado en la patata cruda. Las magnitudes se agruparon de acuerdo a la fracción analizada con los valores más altos en la hortaliza, los intermedios en el AOVE y los más bajos en el agua de cocción (Tabla 4.4-1)

Los niveles en los alimentos crudos ascendieron a 15,54 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la patata, 3,25 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la berenjena, 3,95 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en el tomate, 7,47 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$ en la calabaza, y en cada uno de los lotes de los aceites de partida la CA tomó valores de 2,65, 5,83, 6,42 y 9,49 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$, respectivamente.

En las fracciones de hortaliza la tendencia tras la aplicación de las técnicas culinarias fue a incrementar o conservar la CA de las muestras crudas (Fig. 4.4-1).

Durante la cocción se encontró el mayor número de valores significativamente superiores ($p < 0,05$) respecto a la hortaliza cruda, en los casos de la berenjena (5,57 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$), tomate (6,51 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$), y calabaza (10,21 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$), mientras que la cocción redujo significativamente ($p < 0,05$) los equivalentes de Trolox en la patata (6,21 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$). A esta técnica le siguió la cocción AA en cuanto a número de casos de incremento significativo que correspondieron a la patata (6,43 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y el tomate (4,83 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$), en la berenjena el incremento no fue significativo ($p > 0,05$) y en la calabaza hubo reducción respecto a la CA de la hortaliza cruda (6,62 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$).

La fritura es la técnica en la que han sido observados el mayor número de incrementos en todos los parámetros estudiados, sin embargo en el caso de la CA cuantificada por este método no fue así. Todos los cambios fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) pero solo se registraron dos incrementos, el observado en la berenjena (8,8 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y el del tomate (9,53 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$), y dos descensos, el de la calabaza (10,72 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y la patata (7,73 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$).

En las hortalizas rehogadas el único incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) fue el verificado en la berenjena (4,82 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$). La CA de la patata (11,34 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) y el tomate (3,49 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) cambiaron significativamente ($p < 0,05$) pero a la baja, y en la calabaza la falta de significado estadístico ($p > 0,05$) en el incremento (7,9 $\mu\text{mol ET/g m.h.}$) la hizo semejante a su contraparte cruda.

Como se ha expuesto, el fenómeno de incremento de la CA es congruente con el hecho de que los tratamientos térmicos aumentan la disponibilidad de los antioxidantes por los fenómenos de lisis celular y por la liberación de compuestos fenólicos ligados a la red fibrosa de la matriz de los alimentos, lo que daría explicación satisfactoria a los incrementos observados en la CA (Navarre, 2010; Oboh, Raddatz and Henle, 2008; Blessington et al., 2010; Zhang et al., 2011; Lutz, Henríquez y Escobar, 2011), pese a la correlación no significativa del método con la concentración de fenoles totales (Tabla 4.1-2).

Tabla 4.4-1. Capacidad antioxidante medida por el método DMPD en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua, obtenidas en crudo y tras aplicar cuatro técnicas culinarias. Cada valor promedia tres repeticiones (n = 3).

Parámetro	Técnica culinaria	Fracción	Hortaliza			
			Patata*	Berenjena	Tomate	Calabaza
Capacidad Antioxidante ($\mu\text{mol ET/g m.h.}$) Método DMPD	Crudo	Hortaliza	15,54 \pm 0,57h	3,25 \pm 0,4c	3,95 \pm 0,14e	7,47 \pm 0,32e
		AOVE	2,65 \pm 0,19d	9,49 \pm 0,37h	5,83 \pm 0,44g	6,42 \pm 0,27d
		Agua	0 \pm 0a**	0 \pm 0a	0,07 \pm 0a	0 \pm 0a
	Fritura	Hortaliza	7,73 \pm 0,04f	8,8 \pm 0,21g	9,53 \pm 0,19i	10,72 \pm 0,28b
		AOVE	2,34 \pm 0,16c	3,78 \pm 0,16d	1,62 \pm 0,06b	6,99 \pm 0,27b
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Rehogado	Hortaliza	11,34 \pm 0,64g	4,82 \pm 0,16e	3,49 \pm 0d	7,91 \pm 0,1e
		AOVE	0,86 \pm 0,06b	0,49 \pm 0,04a	2,76 \pm 0,08c	2,62 \pm 0,17c
		Agua	-----	-----	-----	-----
	Cocción	Hortaliza	6,21 \pm e	5,57 \pm 0,26f	6,51 \pm 0,43h	10,21 \pm 0,89f
		AOVE	-----	-----	-----	-----
		Agua	0 \pm 0a	0,04 \pm 0a	1,47 \pm 0,05b	1,44 \pm 0,91b
	Cocción AA	Hortaliza	6,43 \pm 0,04e	3,32 \pm 0,17cd	4,83 \pm 0,09f	6,62 \pm 0,28b
		AOVE	0,55 \pm 0,03b	1,81 \pm 0,15b	1,68 \pm 0,05b	1,35 \pm 0,07b
		Agua	0 \pm 0a	1,41 \pm 0,05b	1,58 \pm 0,07b	1,68 \pm 0,03b

*Las comparaciones se realizaron entre los tratamientos de una misma hortaliza.

**Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Esta baja correlación del test DMPD con la concentración de fenoles totales en parte es generada por la naturaleza del método, al igual que como ocurrió con el método ABTS, porque de hecho los dos radicales catiónicos en que se basan ambos métodos, tienen las mismas propiedades químicas (Sochor et al., 2010). En vista de que el menor número de casos de

incremento se encontró en las dos técnicas donde se han medido las mayores concentraciones de fenoles y CA tras el proceso culinario (rehogado y fritura), se puede asumir que la naturaleza y el estado de oxidación de las sustancias antioxidantes presentes afectará su eficiencia en la captación de ambos radicales catiónicos.

Se hizo una anotación semejante a la recién presentada, durante el estudio de la CA de las melanoidinas del café (Borrelli et al., 2002), basada en el hecho de que conforme se incrementa el grado de tostado, las melanoidinas presentaron menor habilidad de captar el radical DMPD^{•+} y ABTS^{•+}. Como explicación el autor aludió a la naturaleza de los métodos, pues al estar basados en una actividad disruptora de cadena, proporcionan una medida cinética. Por lo tanto, la cuantificación de la actividad disruptora de cadena da una estimación de la captación de los compuestos más reactivos, es decir los más “rápidos” dejando de lado la cuantificación de los más “lentos”.

Mientras que otras técnicas que valoran el potencial redox, dan medidas termodinámicas que indican la eficiencia oxidación/reducción efectiva de todos los antioxidantes presentes, incluidos los “lentos”, que no pueden ser detectados por los métodos cinéticos (Anese and Nicoli, 2001).

En los casos en que se mantuvieron sin cambio los valores respecto a la hortaliza cruda se ha de asumir que no necesariamente hubo una ausencia de solubilización en conjunto con una falta de degradación, por el contrario, al estar estudiando un sistema dinámico hemos asumido que se

ha producido un incremento progresivo en la concentración de antioxidantes por las razones antes expuestas, pero que la velocidad con la que los antioxidantes presentes se oxidaron o degradaron fue suficiente como para evitar cualquier variación significativa en la CA (Mc Dougall, Dobson and Jordan-Mahy (2010).

Desde esta postura dinámica, el caso del descenso de la CA sería explicado como un cambio del balance hacia el extremo negativo en el momento en que se hizo la determinación, es decir, un punto en la cinética en donde la pérdida de CA por reducción de la concentración de antioxidantes o la pérdida de su capacidad de captar los radicales libres supera la rapidez con que se solubilizan los mismos desde la matriz alimentaria.

Resultados y Discusión

En este apartado no fue posible contar con una categorización única de las técnicas culinarias según la magnitud de la CA, porque el orden establecido en cada una de las hortalizas no se generalizó (Fig. 4.4-1). En la patata la categorización fue, crudo > rehogado > fritura > cocción AA = cocción, en la berenjena, fritura > cocción > rehogado > cocción AA = crudo, en el tomate, fritura > cocción > cocción AA > crudo > rehogado, y en la calabaza, cocción > rehogado = crudo > fritura = cocción AA.

No encontramos una correlación significativa ($p > 0,05$) entre los resultados obtenidos con el DMPD y la concentración de fenoles totales (Tabla 4.1-2), a pesar de que entre los resultados del DMPD y el ABTS sí hubieron correlaciones significativas ($p < 0,05$, aunque muy bajas ($r = 0,52$)).

En la bibliografía se ha considerado que la tendencia de los resultados obtenidos por el método DMPD son muy similares a los obtenidos en las mismas muestras por el ABTS, y que al igual que el ABTS, este método es más apropiado para la valoración de la CA de compuestos hidrosolubles, e inicialmente ha sido validado en la evaluación de vinos por el hecho de que los compuestos fenólicos de esta bebida son en su mayoría hidrosolubles (Fogliano et al., 1999), y en la actualidad encuentra excelente desempeño en la evaluación de antioxidantes provenientes de fuentes alimentarias en estado líquido (Rivero-Pérez, Muñiz and González-SanJosé, 2007) o de sustancias puras en solución (Centinkaya et al., 2012) en donde es alta la disponibilidad de moléculas para la reacción.

Por ello, la respuesta poco efectiva para establecer diferencias entre los métodos culinarios y la baja correlación con la concentración de fenoles totales que se observó en este estudio se pueda deber también a la mayor afinidad por los compuestos más hidrosolubles. De esta manera, en los estudios en donde se observa una buena correlación con los fenoles totales es posible postular que sea porque se ensayaron alimentos con bajo o nulo contenido de grasa, pero que no resulte completamente apropiado su desempeño en el estudio de alimentos con contenidos variables de lípidos como es el caso de este trabajo. Porque durante el diseño de esta técnica fue bien establecido que el principal inconveniente del DMPD es que la sensibilidad y reproducibilidad disminuyen dramáticamente cuando se aplica en el estudio de antioxidantes liposolubles como el Tocoferol y el BHT (Fogliano et al., 1999) y probablemente ocurra con los fenoles de hidrofobicidad intermedia como han sido definidos el ácido clorogénico y el pinorresinol que juegan un papel importante en este estudio ya sea por su mayor afinidad por los radicales libres o por la mayor proporción relativa respecto a otros antioxidantes.

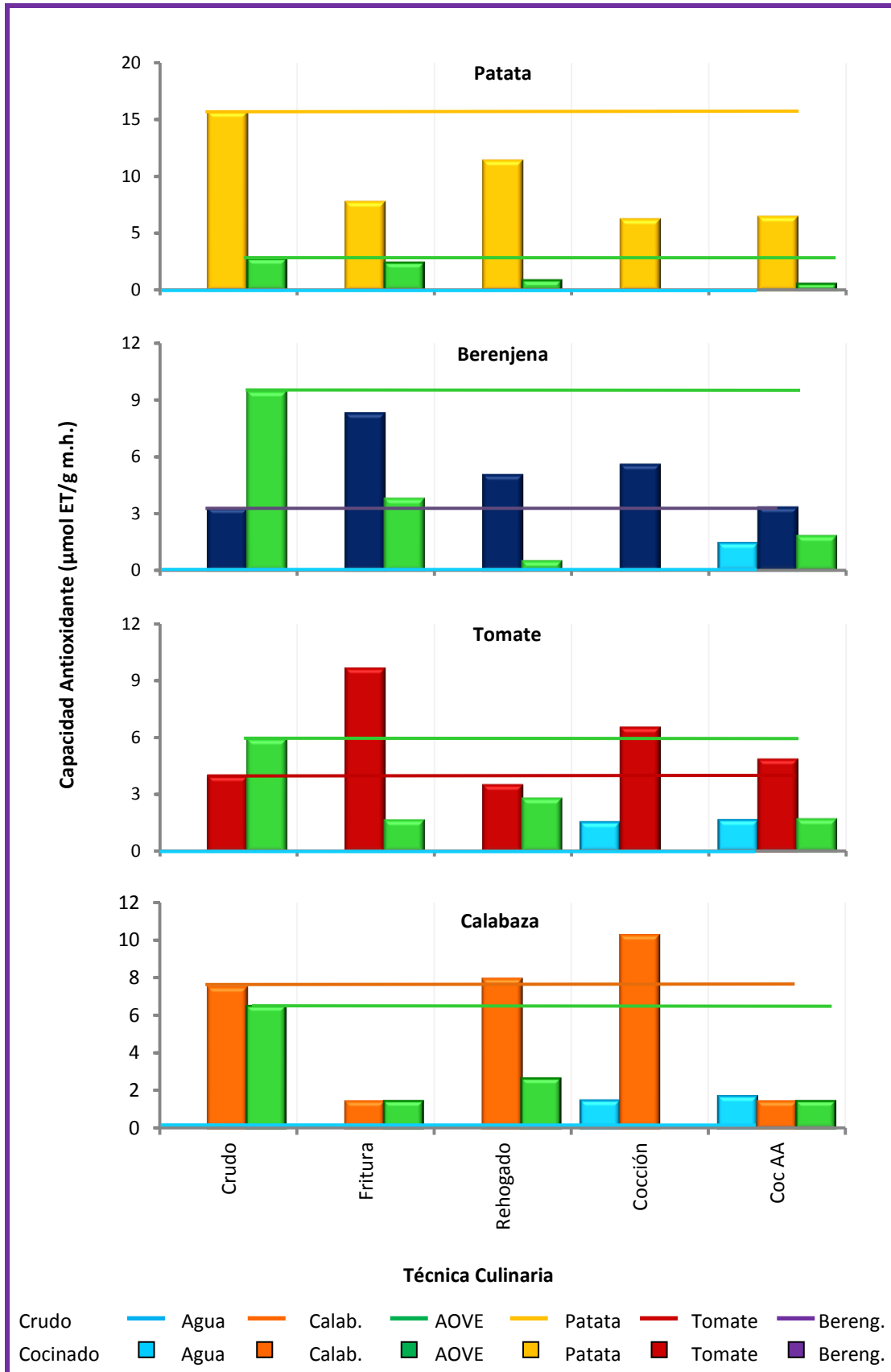


Figura 4.4-1. Capacidad Antioxidante por el método DMPD en las fracciones de hortaliza, AOVE y agua obtenidas en crudo y tras la aplicación de cuatro técnicas culinarias (n = 3).

Los valores de DMPD en las hortalizas procesadas siempre fueron superiores a los del medio de cocción empleado. La calabaza frita y la obtenida tras la cocción AA fueron los únicos casos en que la CA de la hortaliza procesada fue la misma que la del aceite empleado.

Como se observa en la Fig. 4.4-1, después de la aplicación de las técnicas culinarias, el AOVE incluido en la fritura, rehogado y cocción AA siempre redujo significativamente los equivalentes de Trolox, desde un punto de vista estadístico ($p < 0,05$), respecto a los valores del aceite crudo, quedando en todos una actividad antioxidante residual.

En el estudio de la CA con el método DMPD, del mismo modo que ocurrió con los datos obtenidos por el método ABTS, sucedió que a pesar de existir una tendencia constante del aceite procesado respecto crudo, no se obtuvo una categorización de las técnicas culinarias conforme a la magnitud de la CA residual que fuera común a las cuatro técnicas. Las magnitudes más elevadas de CA residual se observaron en el aceite recuperado de la fritura de la patata ($2,34 \mu\text{mol ET/g m.h.}$), en el de la fritura de la berenjena ($3,78 \mu\text{mol ET/g m.h.}$), en el del rehogado del tomate ($2,76 \mu\text{mol ET/g m.h.}$) y el de la cocción AA de la calabaza ($6,99 \mu\text{mol ET/g m.h.}$). Por otro lado, las magnitudes más bajas fueron de $0,55 \mu\text{mol ET/g m.h.}$ en el de la cocción AA de la patata, $0,40 \mu\text{mol ET/g m.h.}$ en el del rehogado de la berenjena, $1,62 \mu\text{mol ET/g m.h.}$ en el de la fritura del tomate y $1,32$ en el de la cocción AA la calabaza.

El agua de la cocción solo presentó concentraciones detectables tras el procesamiento del tomate ($1,47 \mu\text{mol ET/g m.h.}$) y la calabaza ($1,43 \mu\text{mol ET/g m.h.}$). Por otro lado, después de aplicar la cocción AA, el agua resultó enriquecida en los ensayos con la patata ($0,21 \mu\text{mol ET/g m.h.}$), berenjena ($1,41 \mu\text{mol ET/g m.h.}$), tomate ($1,58 \mu\text{mol ET/g m.h.}$) y calabaza ($1,66 \mu\text{mol ET/g m.h.}$). Estos valores no fueron significativamente diferentes desde el punto de vista estadístico ($p > 0,05$) respecto a la CA del AOVE incluido, es decir, la concentración del agua y del aceite no fueron diferentes al final de los procesos culinarios.

Como se observa en la Fig. 4.4-1 la excepción fue el aceite procesado por cocción AA con la patata, en el que la magnitud fue significativamente inferior ($p < 0,05$) a la del agua del mismo proceso.

La presencia de CA en el agua de cocción está relacionada con la lixiviación de compuestos antioxidantes desde el vegetal en el caso de la cocción y adicionalmente desde el AOVE en el caso de la cocción en mezcla AA. Este efecto también ha sido evaluado por el método DMPD en hojas de té, e incluso se ha detectado igual contenido de fenoles y CA cuando la infusión se realiza con agua caliente o agua fría (Venditti et al., 2010).

5. ANÁLISIS MULTIVARIADO.

5.1. Análisis de conglomerados (Cluster analysis).

Es una técnica de análisis exploratorio de datos para resolver problemas de clasificación. Su propósito consiste en ordenar objetos (personas, cosas, animales, plantas, variables, etc, ...) en grupos (conglomerados o clusters) de forma que el grado de asociación/similitud entre miembros del mismo cluster sea más fuerte que el grado de asociación/similitud entre miembros de diferentes clusters. En los métodos de clasificación jerárquica aglomerativa, se parte de tantos conglomerados como el número de objetos a clasificar, se toman los dos más semejantes y se fusionan en un conglomerado que reemplaza a los dos objetos originales. El procedimiento se repite hasta obtener un solo conglomerado (Catena, et al., 2003).

En cada caso de análisis se obtuvo un número de conglomerados con base a un diagrama de aglomeración. El criterio de decisión para definir el número de conglomerados fue: Cuando los valores sucesivos entre los pasos dio un salto súbito, entonces se seleccionó la solución conglomerativa previa a dicho salto (Lago, Mauro and Alvarez, 2000). Los objetos analizados fueron los 20 casos resultantes al combinar las cinco técnicas culinarias con las cuatro hortalizas.

Se procedió a la elección del método más adecuado para obtener una clasificación que reflejara una agrupación natural de los 20 casos combinando tres métodos jerárquicos aglomerativos y tres algoritmos de medida de la distancia entre conglomerados:

- a) Métodos jerárquicos aglomerativos.
 - a. Método del vecino más próximo
 - b. Método del vecino más lejano (Complete linkage)
 - c. Método de Ward (Método de varianza mínima)

- b) Algoritmos de medida de la distancia entre conglomerados.
 - a. Distancia euclidiana
 - b. Cuadrado de la distancia euclidiana
 - c. City block

5.1.1. Elección del método de análisis y del algoritmo de medida de la distancia entre conglomerados.

Cuando se obtuvieron los gráficos de distancias de aglomeración para los análisis de cada caso considerando un solo conglomerado se determinó el número de clusters en el punto de la gráfica en donde los valores sucesivos entre los pasos dio un salto súbito, entonces se seleccionó la solución conglomerativa previa a dicho salto.

En la Fig. 5.1-1 se ejemplifica la definición del número de conglomerados con el gráfico de distancia de aglomeración del método Ward usando el algoritmo city block (elegidos para este estudio) en el que se observa como el mayor salto se encuentra en la distancia 116,94 que corresponde a la etapa con 5 conglomerados.

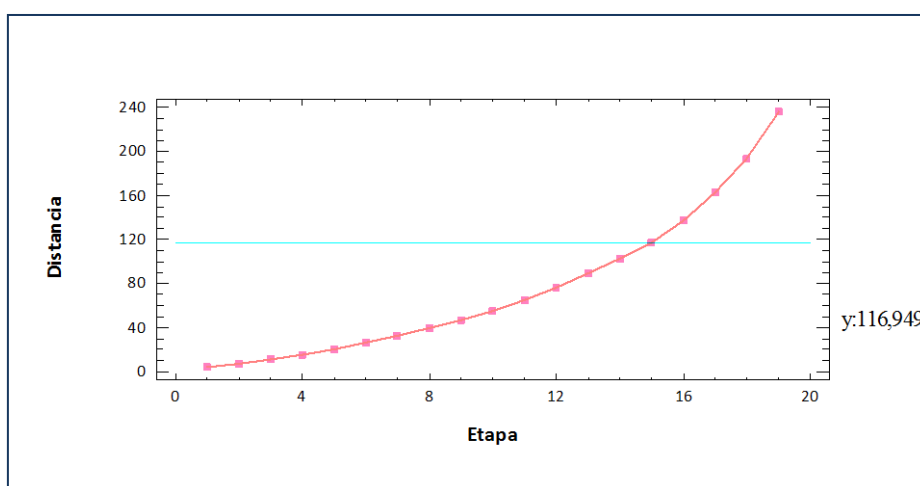


Figura 5.1-1. Gráfico de aglomeración del método de Ward para el análisis cluster de las 20 combinaciones de técnicas culinarias y hortalizas en la etapa con cinco conglomerados.

Así, con cada combinación de método con algoritmo, se procedió a obtener la respectiva gráfica de aglomeración, a definir el número de conglomerados, y una vez definido, a ensayar el caso de análisis. En cada caso de análisis se evaluó el número de conglomerados obtenidos, la definición entre ellos, el número de objetos cada uno, la cantidad de clusters constituidos por un solo objeto, y la agrupación o segregación de los objetos de acuerdo a asociaciones con explicaciones lógicas.

A continuación se muestra el resumen de los casos de análisis de conglomerados con los tres métodos y los tres algoritmos (Tabla 5.1-1). Al comparar los tres métodos se observó que variaron tanto el número óptimo de clusters, como el número de objetos por conglomerado. Y los tres diferentes algoritmos para el cálculo de la distancia también generaron variaciones en estas características.

Con el método del vecino más próximo se obtuvo un número óptimo de cuatro conglomerados; sin embargo al aplicarlo en conjunto con el algoritmo city block aumentó a cinco. También con el método del vecino más distante combinado con los tres algoritmos se obtuvo un número óptimo de cinco conglomerados. Con ambos métodos se formó un número elevado de clusters individuales y el resto de observaciones se agruparon en uno solo. Por esta razón no se consideraron adecuados para definir una clasificación con significado práctico.

Tabla 5.1-1. Grupos obtenidos en el Análisis de Conglomerados con tres variantes de los métodos del vecino más próximo, vecino más lejano y Ward en las combinaciones de técnicas culinarias y hortalizas estudiadas.

Caso estudiado	Número de Conglomerados	Número de Objetos por Conglomerado
Vecino más próximo + cuadrado de distancia euclidiana	4	17, 1, 1, 1
Vecino más próximo + distancia euclidiana	4	17, 1, 1, 1
Vecino más próximo + city block	5	16, 1, 1, 1, 1
Vecino más lejano + cuadrado de distancia euclidiana	5	14, 1, 3, 1, 1
Vecino más lejano + distancia euclidiana	5	14, 1, 3, 1, 1
Vecino más lejano + city block	5	14, 1, 3, 1, 1
Ward's + cuadrado de la distancia euclidiana	5	14, 1, 3, 1, 1
Ward's + distancia euclidiana	5	14, 1, 3, 1, 1
Ward's + city block	5	6, 4, 8, 1, 1

En los nueve casos estudiados, la fritura con berenjena y tomate formaron cada uno un grupo

individual. En los casos del método del vecino más cercano la calabaza frita también se agrupó de esta manera. Es importante considerar la generación del mínimo número de clusters formados por un solo objeto entre los criterios de elección del método más apropiado, ya que estos casos dificultan la interpretación de los resultados finales (Álvarez, 1995).

Con el método Ward's (Tabla, 5.1-1) se establecieron 5 clusters, conformados de manera semejante a los obtenidos con los otros métodos, es decir, la mayoría de ellos constituidos por un solo objeto. Cuando se aplicó en conjunto con el city block se redujo el número de clusters individuales, la composición del resto fue más equilibrada en cuanto a número de objetos y se obtuvieron distancias entre objetos que permitieron discernir claramente tanto la relación entre los primeros pares como entre los últimos.

5.1.2. Definición del número de conglomerados.

Si bien, el método de Wards en combinación con el algoritmo city blok generó una agrupación más equilibrada que el resto de métodos en cuanto a número de objetos por conglomerado, aún persistió la presencia de un conglomerado excesivamente grande. Por este motivo se procedió a añadir un sexto y séptimo grupos (Fig. 5.1-2), así se consiguió mejorar la resolución del cluster número tres que inicialmente contenía todas las observaciones del tomate y la berenjena (Tabla 5.1-2).

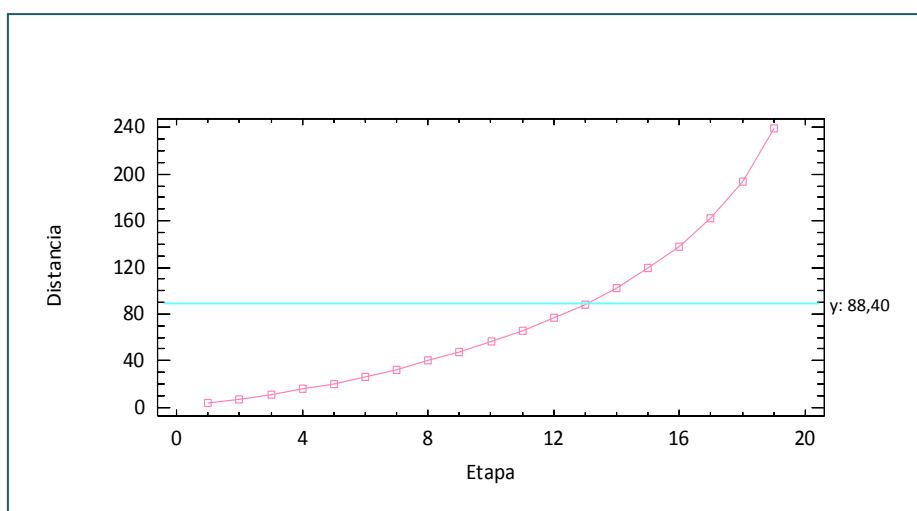


Figura 5.1-2. Gráfico de aglomeración del método de Ward para el análisis cluster de las 20 combinaciones de técnicas culinarias y hortalizas estudiadas, en la etapa con siete conglomerados.

En el nuevo estudio con siete conglomerados las diferencias respecto a la distribución de objetos con el estudio de cinco, fueron que la calabaza frita se segregó en un solo grupo y que los objetos del conglomerado tres se distribuyeron en dos grupos. En el número 4 con el tomate crudo, cocido y cocido AA y en el 6 con la berenjena cruda, cocida, cocida AA y rehogada.

Tabla 5.1-2. Grupos obtenidos en el Análisis de Conglomerados realizado con el método de Ward y City Block en las veinte combinaciones de técnicas culinarias y hortalizas estudiadas, considerando cinco y siete conglomerados.

Caso estudiado	Número clusters	Número objetos x cluster	Composición de conglomerados				
			Calabaza*	Patata	Tomate	Berenjena	
Ward's + city block	5	1	6	Cr, C, R, CA	Cr, C		
		2	4	F	F, R, CA		
		3	8			Cr, C, R, CA	Cr, C, R, CA
		4	1			F	
		5	1				F
Ward's + city block	7	1	6	Cr, C, R, CA	Cr, C		
		2	1	F			
		3	3		F, R, CA		
		4	3			Cr, C, CA	
		5	1			F	
		6	5			R	Cr, C, R CA
		7	1				F

*Cr= Crudo, C=Cocción, CA=Cocción en mezcla agua/aceite, R= Rehogado, F= Fritura.

Para el propósito de esta tesis, el método de Ward en conjunto con el cálculo de la distancia por city block facilita el estudio de la relación entre las variables.

A continuación se muestra el dendrograma en donde se aprecia gráficamente la configuración de los conglomerados (Fig. 5.1-3). Se aprecia que, a pesar de que se formó un nuevo cluster constituido por un solo objeto, el número de objetos en el resto fue más equilibrado, la distancia entre clusters permitió una buena diferenciación de los grupos, y se observó la posibilidad real de obtener información con significado práctico del análisis. Adicionalmente se proporciona la composición de cada cluster en la tabla 5.1-3.

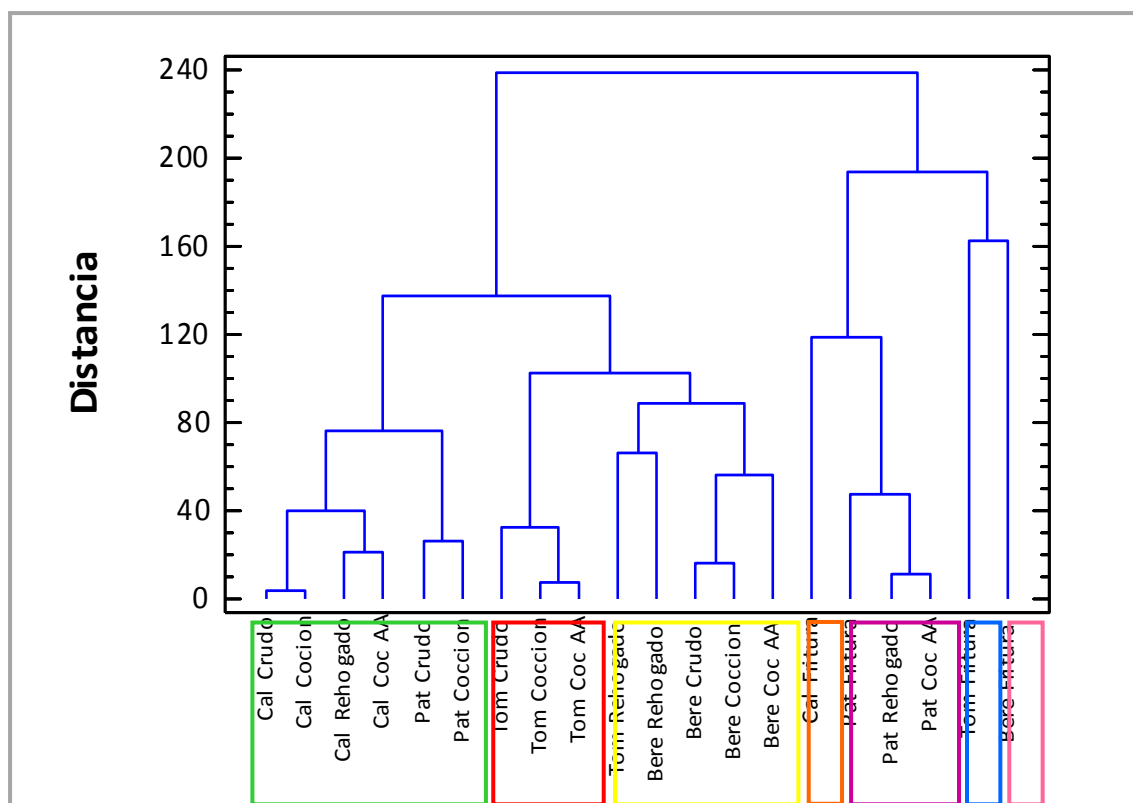


Figura 5.1-3. Dendrograma del Análisis de Conglomerados de 20 combinaciones de técnicas culinarias y hortalizas.

Tabla 5.1-3. Grupos obtenidos del análisis de conglomerados por el método Ward en conjunto con city block de las veinte combinaciones de técnicas culinarias y hortalizas estudiadas.

Combinación	Conglomerado
Calabaza Cruda, Cocido, Cocción AA Patata Cruda, Cocida	1
Calabaza Fritura	2
Patata Fritura, Rehogado, Cocción AA	3
Tomate Crudo, Cocido, CocidoAA	4
Tomate Fritura	5
Tomate Rehogado Berenjena Crudo, Cocido, Rehogado, Cocción AA	6
Berenjena Fritura	7

La interpretación de la clasificación obtenida por el Análisis de Conglomerados requiere del conocimiento del problema analizado, una aproximación a este conocimiento se obtiene tras la aplicación de pruebas de hipótesis y/o el análisis discriminante (Gutiérrez and González, 1991; Santos and Pérez, 1996).

Los resultados de las pruebas de hipótesis de las variables agrupadas de acuerdo a los conglomerados se recogen en la Tabla 5.1-4 en donde se observa que las variables significativamente diferentes fueron: contenido de humedad, extracto seco, DPPH, fenoles totales, ácido gálico, ácido dihidroxibenzóico, ácido clorogénico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido o-cumárico, oleuropeína, pinorresinol y luteolina.

En la estructuración de los clusters se puso de manifiesto el carácter atípico del tomate, calabaza y la berenjena fritos al conformar cada uno un grupo independiente del resto de casos (Fig. 5.1-3). La calabaza frita constituyó el conglomerado 2, el tomate frito el 5 y la berenjena frita el 7.

Tabla 5.1-4. Comparación estadística de los siete conglomerados formados a partir de combinaciones de técnicas culinarias y hortalizas.

Variable	Test de Normalidad *	Test de Barlett	ANOVA	Test de Kruskal-Wallis	Estudio Significativo (p<0,05)
Contenido humedad	0,0004	0,01	-	0,029	Si
Contenido grasa	1,4 E-7	0,0006	-	0,164	No
Extracto seco	8,1 E-5	0,0004	-	0,010	Si
ABTS	0,0004	0,21	-	0,088	No
DMPD	0,255	0,048	-	0,11	No
DPPH	2,5 E-5	0,001	-	0,03	Si
FRAP	8,6 E-9	0,0009	-	0,06	No
Fenoles totales	2,8 E-11	0,24	-	0,04	Si
Ác. gálico	0,0017	0,04	-	0,034	Si
Hidroxitirosol	9,66 E-7	0,008	-	0,09	No
Ác dihidroxibenzóico	0,0028	0,04	-	0,04	Si
Tirosol	5,05 E-10	0,09	-	0,166	No
Ác. hidroxifenilacético	1 E-5	8 E-6	-	0,26	No
Ác. hidroxibenzóico	5,2 E-6	0,04	-	0,08	No
Ác. clorogénico	0,0	4,1 E-8	-	0,02	Si
Ác. vanílico	1,8 E-5	0,08	-	0,03	Si
Ác. caféico	0,0011	0,006	-	0,31	No
Ác. siríngico	5,2 E-5	0,04	-	0,03	Si
Ác. p-cumárico	1,5 E-11	0,06	-	0,19	No
o-vanillina	8,2 E-14	8,7 E-6	-	0,58	No
Ác. o-cumárico	2,7 E-9	0,0002	-	0,02	Si
Oleuropeína	1,2 E-6	0,53	-	0,04	Si
Rutina	0,0	0,90	-	0,09	No
Pinorresinol	5,0 E-10	0,25	-	0,02	Si
Luteolina	0	0,09	-	0,02	Si
Apigenina	2,4 E-7	0,0008	-	0,44	No

* Se valoró aplicando las pruebas de bondad de ajuste de Chi-cuadrada, la estadística W de Shapiro-Wilks, la prueba de Z para oblicuidad y para kurtosis, tomando como límite el valor de p más bajo.

5.1.3. Análisis de los conglomerados.

En la Fig. 5.1-4 a, b, c, y 5.1-5 se muestran los perfiles medios de las variables en los siete conglomerados recién conformados. Se observa que el 2, 5 y 7 que corresponden a la calabaza, tomate y berenjena fritos, respectivamente, presentaron, a diferencia del resto de clusters, niveles altos de CA medida por DPPH, FRAP, fenoles totales, ácido dihidroxibenzóico, oleoeuropeína, pinorresinol, y bajo contenido de humedad.

En sí mismas, las variables antes mencionadas representan características distintivas de los clusters 2, 5 y 7 por la magnitud en que se presentan en ellos, ya que los valores cuantificados son singularmente altos respecto a los valores del resto de conglomerados. La excepción a los valores excesivamente altos, fueron la concentración de ácido dihidroxibenzóico, pinorresinol y el contenido de humedad, que si bien, también resultaron superiores, se mantuvieron en una escala afín al resto de cifras del estudio que les da cierta base comparativa común con el resto de grupos.

Los alimentos de estos clusters podrían visualizarse como “concentrados grasos de antioxidantes”, porque además, comparten como característica común un elevado contenido de grasa (Fig. 5.1-5).

Lo antes expuesto es una de las causas que provocaron que las tres hortalizas procesadas por fritura se segregaran en clusters separados, ya que literalmente, se encuentran en niveles distintos respecto al resto de técnicas culinarias por ser diferentes a ellas, y por ello, buscar la agrupación con el resto de técnicas para reducir el número de objetos aislados hubiera sido una estrategia forzada que habría dado lugar a una afinidad “artificial” entre objetos.

Dado que las Figuras 5.1-4 y -5, son útiles para el análisis detallado de los clusters 2, 5 y 7 porque en ellas se diferencian claramente los perfiles de los parámetros más altos y característicos, pero tiene como consecuencia la reducción de la resolución gráfica de los perfiles del resto de variables y del resto de clusters, se decidió completar el resto del análisis en otro conjunto de gráficas en donde se eliminó el sesgo que causan los datos atípicos de los clusters individuales formados por el tomate, la calabaza y la berenjena fritos, y solo fueron representados los conglomerados 1, 3, 4 y 6 (Fig. 5.1-6 a, b, c y 5.1-7).

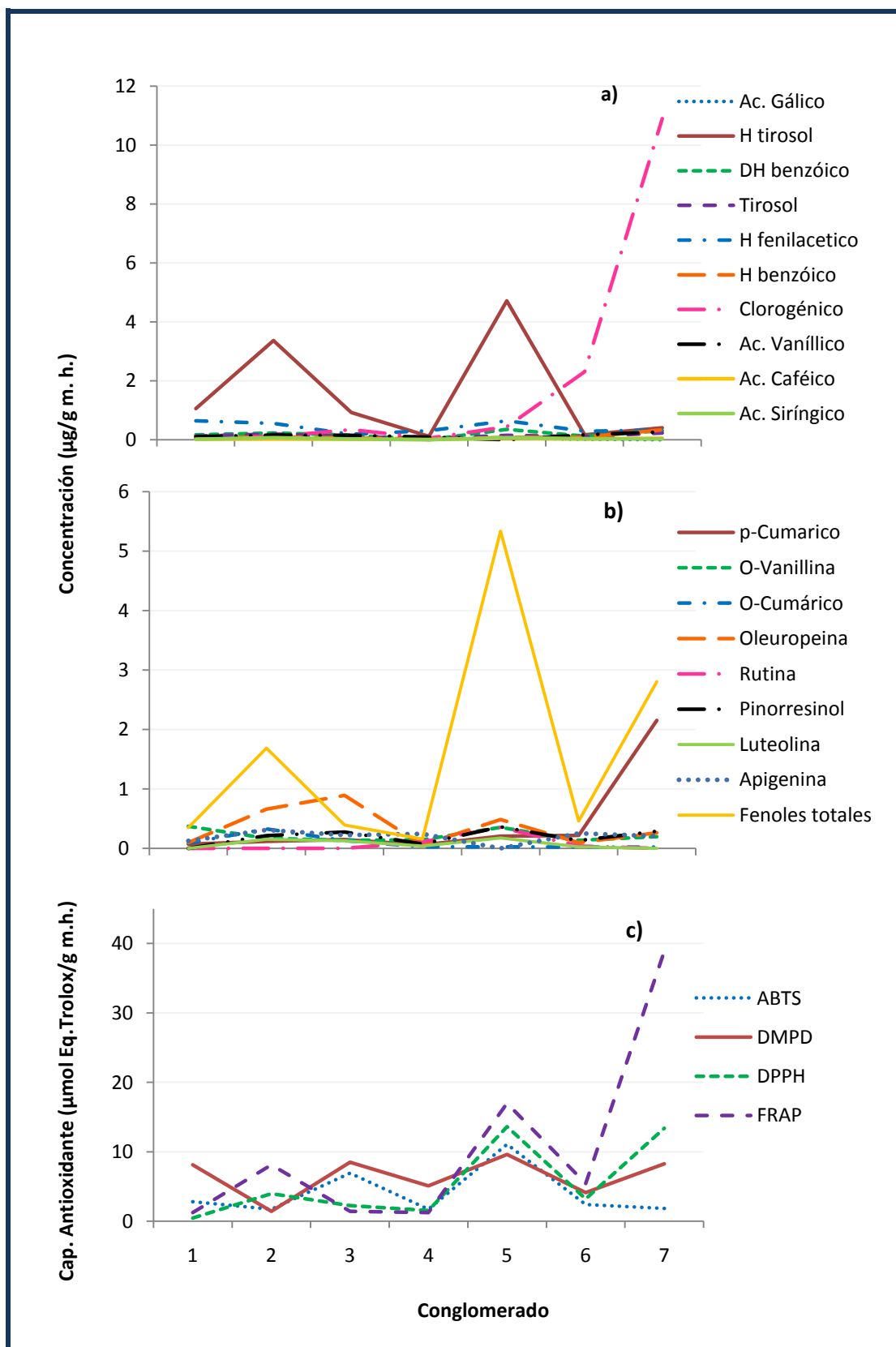


Figura 5.1-4. Perfiles medios en masa húmeda (m.h.) de a) algunos fenoles individuales, b) algunos fenoles individuales y totales y c) Capacidad antioxidante, en siete conglomerados formados con las combinaciones de técnicas culinarias y hortalizas.

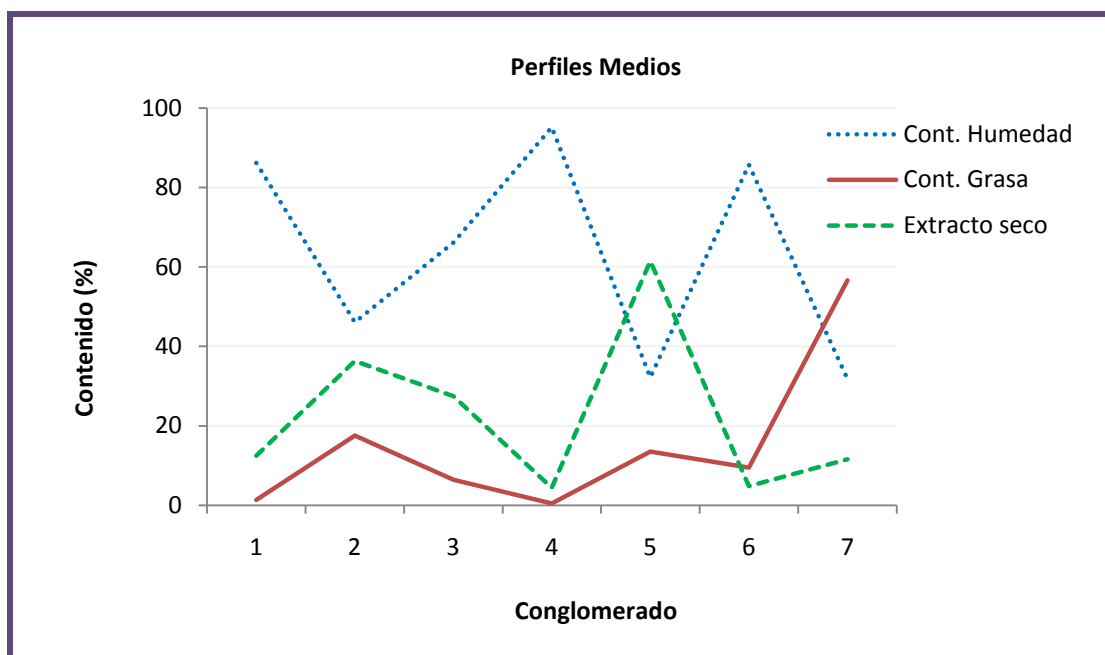


Figura 5.1-5. Perfiles medios en masa húmeda de parámetros bromatológicos, en siete conglomerados formados con las combinaciones de técnicas culinarias y hortalizas.

Como se observa en las nuevas gráficas (Fig. 5.1-6 y -7), al retirar los casos atípicos se cumplió el cometido de mejorar la resolución de los perfiles de los grupos más numerosos. Sin embargo en la Fig. 5.1-6a se observa la persistencia de un dato cuya gran magnitud causa la compactación del resto de perfiles. Este dato es el del ácido clorogénico del cluster número 6, en donde se agrupa la berenjena cruda, rehogada y cocida por las dos modalidades, esta observación de magnitud tan elevada coincide con el hecho de que la berenjena es reconocida como una hortaliza que proporciona un elevado contenido de este fenol (Hanson et al., 2006; Nisha et al., 2009).

A pesar del efecto causado por el dato de la concentración del ácido clorogénico del cluster 6, sí fue posible proseguir con el análisis para el estudio de la agrupación del resto de objetos. De modo que, se observa que los cluster 1, 3, 4 y 6 tendieron a agruparse por hortaliza, pero no se observó una separación completa de acuerdo al vegetal, quedando asociados entre sí los cluster 1 y 3, y el 4 con el 6 (Fig. 5.1-3).

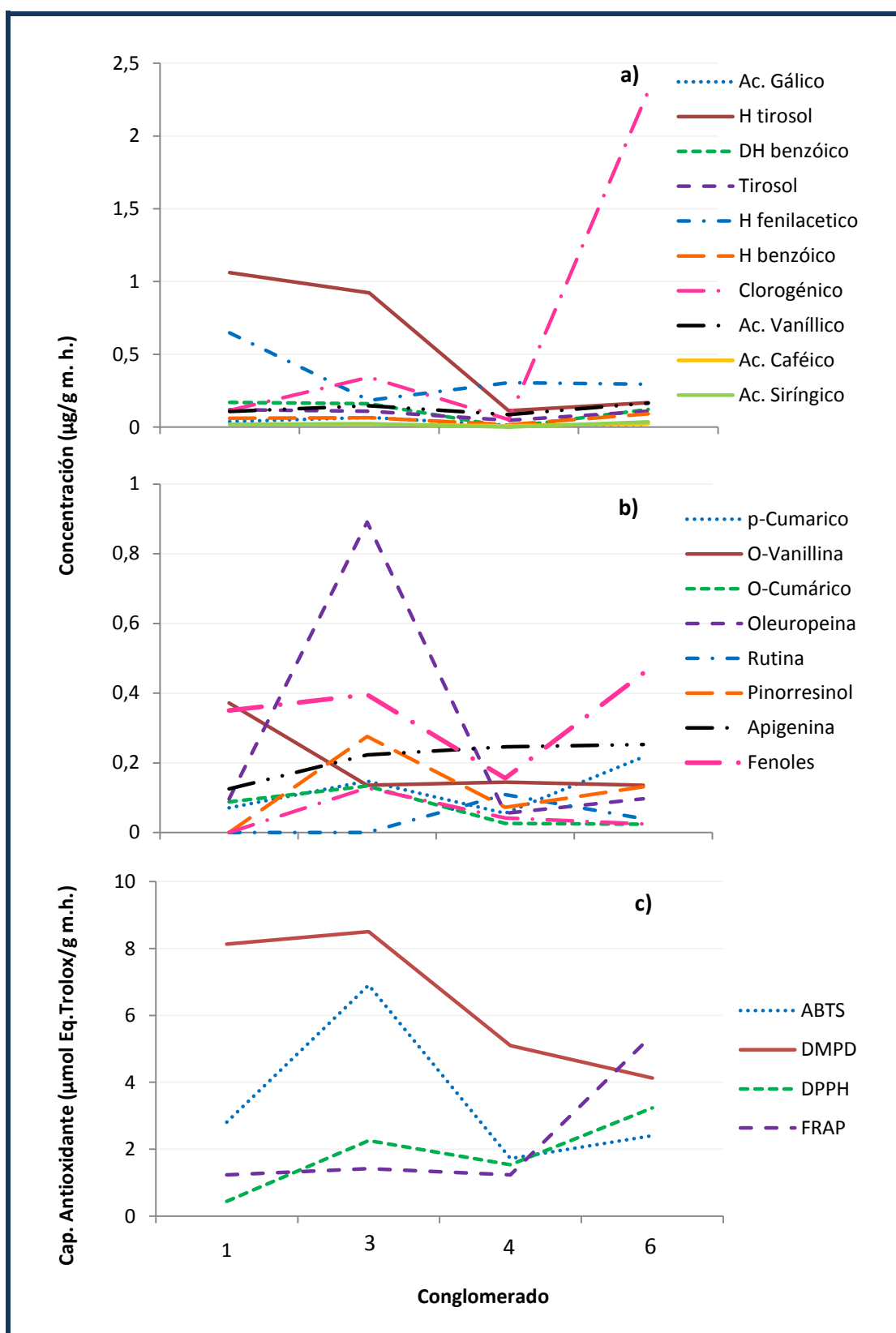


Figura 5.1-6. Perfiles medios en masa húmeda (m.h.) de a) algunos fenoles individuales, b) algunos fenoles individuales y totales y c) Capacidad antioxidante, en cuatro conglomerados formados con las combinaciones de técnicas culinarias y hortalizas.

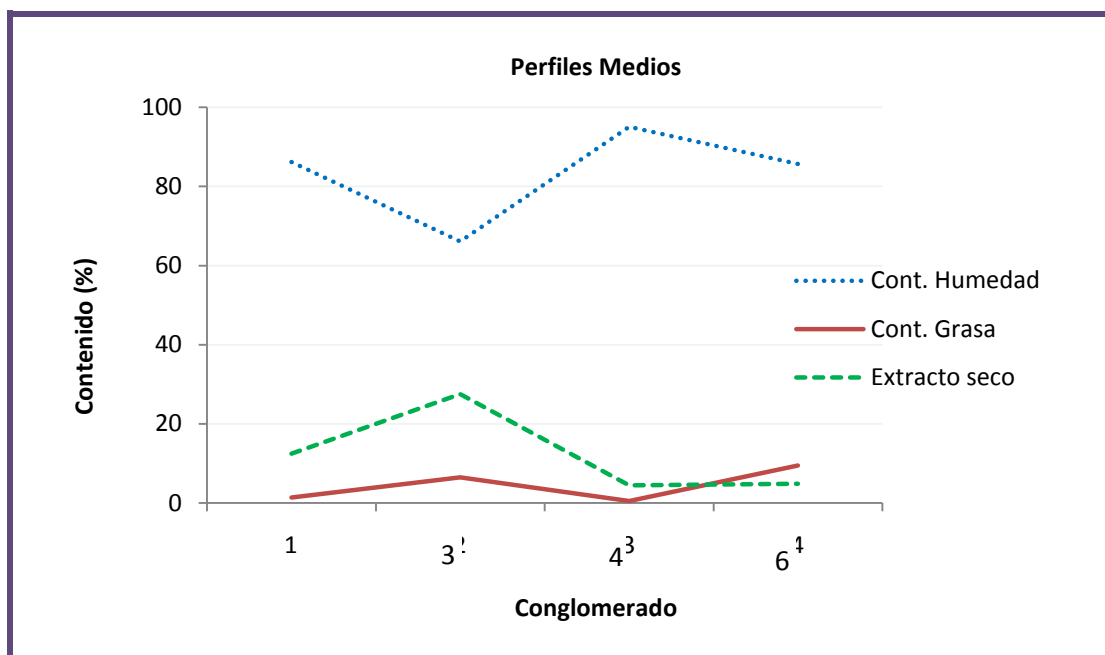


Figura 5.1-7. Perfiles medios en masa húmeda (m.h.) de parámetros bromatológicos en cuatro conglomerados formados con las combinaciones de técnicas culinarias y hortalizas.

Dado que se ha iniciado el análisis del cluster 6 con la referencia al elevado contenido de ácido clorogénico, se proseguirá con el análisis de este y su cluster más relacionado, el 4. En los conglomerados 6 y 4 convergieron todas las combinaciones que incluían tomate y berenjena excepto en su modalidad frita, que como se mencionó en párrafos anteriores, formaron en sí mismas conglomerados independientes. El conglomerado 4 reunió los casos de tomate crudo, cocido y cocido AA, en el 6 se agruparon todas las modalidades de cocción de la berenjena y el tomate rehogado.

El conglomerado 6 presentó más características benéficas que el resto de clusters (sin incluir los de la fritura) en conjunto con mayor contenido de grasa. Estas características fueron: un nivel alto de fenoles totales y fenoles específicos (ácidos clorogénico, vanílico, hidroxibenzoico, Dihidroxibenóico y siríngico) y de CA cuantificada por los métodos FRAP y DPPH (Fig. 5,1-6a, b y c). Cabe recalcar que todos estos valores elevados en los parámetros antioxidantes se presentaron a pesar del también elevado contenido de humedad (Fig.5.1-7), que podría haber actuado en contra generando un efecto de dilución, y que, sin embargo, fue compensado por los altos niveles de los parámetros antioxidantes descritos. El cluster 4 mostró las características opuestas al 6, por ello se le consideró como un cluster integrado por casos con poco aporte de sustancias antioxidantes y CA. Adicionalmente, presentó un elevado contenido del fenol rutina, que es propio y característico del tomate.

Con respecto a los conglomerados restantes, se observa que, la asociación que guardan los conglomerados 1 y 3, consiste en que están incluidos todos los casos de la calabaza y la patata. En el conglomerado 3 se agruparon la patata frita rehogada y cocida AA, todas ellas procedentes de técnicas culinarias que incluyeron AOVE. En el cluster 1 se encuentra la patata cruda y cocida, y todos los casos de calabaza excepto la frita que por sí sola conformó un solo cluster. El 1 y 3 son conglomerados que no contienen rutina, con niveles elevados de fenoles totales, ácido hidroxibenzoico, ácido o-cumárico, oleuropeína y extracto seco (Fig. 5.1-6 a, b, c y 5.1-7).

Como recién se explicó, los cluster 1 y 3 presentaron el mismo nivel elevado de fenoles totales, pero el conglomerado 3 ostentó características benéficas adicionales porque fue superior en cuanto a fenoles específicos (ácido clorogénico, oleuropeína, pinorresinol y luteolina) y CA medida por el método DPPH, estos altos niveles surgieron a raíz de un efecto de concentración (Fig. 5.1-5 b y c). Dicho efecto fue el resultado de un menor contenido de humedad y mayor de grasa que generó una concentración de los compuestos antioxidantes semejante a la observada en los casos de la fritura, pero en menor escala (Fig. 5.1-6). Este efecto se presentó en el conglomerado número 3, mientras que en el 1 se observó un efecto opuesto de dilución determinado por un mayor contenido de humedad, junto con una reducción del extracto seco, esta dilución actuó en contra de las características benéficas, pues las redujo.

De este análisis se puede deducir a priori que los casos de los cluster 2, 5 y 7, constituidos por la calabaza, tomate y berenjena fritos, respectivamente, son superiores al resto, porque son los que aportan la mayor concentración de fenoles totales, pinorresinol, oleuropeína y poseen la mayor CA cuantificada por los métodos DPPH y FRAP.

El conglomerado 6 le sigue en cuanto a nivel de las características benéficas y consiste en un grupo que se aglomera porque la naturaleza de la hortaliza es en sí misma altamente antioxidante, sin la influencia marcada de un efecto de concentración de los componentes antioxidantes, como ocurrió en los conglomerados 2, 5 y 7.

A este conglomerado le siguió el 3, una agrupación que también proporciona beneficios, acentuados por un efecto de concentración de antioxidantes en la hortaliza y un aporte de aceite en su composición, en el que la naturaleza del alimento no corresponde al de una fuente de elevadas cantidades de antioxidantes como sí lo fue la berenjena en el caso del 6.

Finalmente, los conglomerados 1 y 4 contienen los casos con una menor concentración de fenoles totales e individuales, ya sea por la naturaleza del alimento o porque las técnicas culinarias causaron un efecto de dilución que los perjudica (mayor contenido de humedad en conjunto con reducción de extracto seco) o por ambos.

Por lo tanto la elección de la técnica culinaria apropiada dependerá de la naturaleza del alimento crudo, si el alimento crudo no se distingue por presentar concentraciones elevadas de fenoles, se deben elegir técnicas culinarias que enriquezcan la composición original, preserven los principios funcionales originales, y promuevan un efecto de concentración de estas moléculas, como son la fritura y el rehogado, si el consumo de alimentos así elaborados no es posible por condiciones fisiológicas específicas o porque no es recomendable una ingesta calórica elevada asociada a las grasas. Se puede optar por las técnicas de cocción hidrotérmicas siempre y cuando el alimento sea consumido junto con el agua de cocción, pues al no hacerlo de este modo, el alimento final se estará empobreciendo aún más, en estos casos la adición de un volumen de AOVE mejorará el perfil inicial de fenoles y compensará las carencias propias de la naturaleza del alimento.

Por otra parte, si el alimento crudo es una fuente natural de elevados contenidos de fenoles, el abanico de posibilidades culinarias se amplía. La aplicación de tratamientos culinarios que incluyen el AOVE intensificarán los beneficios, y la aplicación de tratamientos hidrotérmicos como los aquí presentados no afectarán la concentración final, de hecho, pueden incluso intensificarla si se aplican en tiempos y proporciones de agua/alimento discretos, en estos casos es altamente recomendable consumir el agua de cocción o usarla para procesar hortalizas menor densidad de antioxidantes.

5.2. Análisis discriminante

Es un procedimiento estadístico que identifica las variables que sirven para la diferenciación de grupos preestablecidos. Para realizarlo, se intenta hacer una combinación lineal de las variables que expliquen la agrupación de las mismas (Gutierrez and González, 1991). En cada caso de análisis se obtuvo un número de funciones discriminatorias que fueron evaluadas como satisfactorias cuando cumplían los siguientes criterios: significancia estadística ($p < 0,05$), correlación canónica ($> 0,90$) y porcentajes de clasificación correcta de las muestras de 100%.

Se procedió a la obtención de una función que diferenciara según las cinco técnicas culinarias y entre las cuatro hortalizas de acuerdo a los siguientes casos de análisis:

- c) Considerar todas las variables de forma conjunta.

- d) Considerar por separado los de valores más significativos:
 - a. Fenoles
 - b. La capacidad antioxidante.
 - c. Los parámetros bromatológicos.

- e) Combinaciones de los grupos de valores.
 - a. Fenoles y capacidad antioxidante.
 - b. Fenoles y bromatológicos.
 - c. Capacidad antioxidante y bromatológicos.

5.2.1 Análisis discriminante según la técnica culinaria

En la tabla 5.2-1, se muestra un resumen del análisis discriminante en todos los casos estudiados según la técnica culinaria.

Se encontró que todas las ecuaciones fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en cuatro de los siete casos estudiados, las excepciones fueron el estudio con los valores de la capacidad antioxidante, con los parámetros bromatológicos y capacidad antioxidante + bromatológicos.

En los estudios con capacidad antioxidante, con bromatológicos y en donde se incluyeron simultáneamente ambos grupos de variables en el análisis, se encontraron correlaciones canónicas que fueron inferiores al 0,9 establecido como criterio de satisfacción.

Las ecuaciones obtenidas en los estudios con la CA, los parámetros bromatológicos y los bromatológicos + CA solo sirvieron para discriminar entre técnicas culinarias, en un 55, 60 y 75 % respectivamente, de las ocasiones en que fueron aplicadas para comprobar la efectividad de su aplicación en la clasificación de los casos.

Como se observa en la Tabla 5.2-1 en los estudios con todas las variables, con fenoles, con fenoles + bromatológicos y con fenoles + CA, el denominador común entre ellos fue la presencia de los fenoles totales e individuales en los casos satisfactorios que discriminaron al 100 % las técnicas culinarias, de hecho los fenoles por sí solos fueron suficientes para obtener ecuaciones significativas, con altas correlaciones y que clasificaran correctamente un 100 % de los casos. Mientras que los parámetros bromatológicos y la CA cuantificada por los cuatro métodos, ya fuera juntos o por separado, no fueron suficientes para obtener ecuaciones satisfactorias que permitieran discriminar con exactitud entre las técnicas culinarias.

A continuación se detalla la primera y más importante función de discriminación de cada uno de los cuatro modelos calculados para los casos con eficacia superior al 100 % (Tabla 5.2-2), en esta tabla también se ejemplifica el desarrollo de la ecuación de la función discriminante del modelo obtenido con todas las variables del estudio (fenoles + CA + bromatológicos) a partir de los coeficientes proporcionados.

Las ecuaciones del resto de casos (fenoles, fenoles + bromatológicos y fenoles + CA) se configurarían del mismo modo haciendo uso de los coeficientes recogidos en su columna correspondiente.

Tabla 5.2-1. Resumen de los estadísticos del análisis discriminante según la técnica culinaria.

Caso estudiado	No. de Funciones Discriminantes	Probabilidad (Significancia $p < 0,05$)	Correlación Canónica	Clasificación (%)	Satisfactorio
Todos los Componentes	1	0,0*	0,999*	100*	Si
	2	0,0*	0,996*		
	3	0,0*	0,995*		
Fenoles	1	0,0*	0,998*	100*	Si
	2	0,0*	0,989*		
	3	0,0*	0,983*		
Capacidad Antioxidante	1	0,0*	0,835	55	No
	2	0,0*	0,541		
	3	0,19	0,321		
Bromatológicos	1	0,0*	0,953*	60	No
	2	0,87	0,198		
	3	0,90	0,060		
Fenoles + Capacidad Antioxidante	1	0,0*	0,998*	100*	Si
	2	0,0*	0,996*		
	3	0,0*	0,989*		
Fenoles + Bromatológicos	1	0,0*	0,998*	100*	Si
	2	0,0*	0,995*		
	3	0,0*	0,962*		
Capacidad antioxidante + Bromatológicos	1	0,0*	0,970*	75	No
	2	0,0*	0,644		
	3	0,07	0,467		

* Valores que cumplen los criterios de clasificación.

Tabla 5.2-2. Primer función discriminante de los cuatro modelos analizados en el estudio según técnica culinaria.

	Coeficientes de la Primer Función Discriminante			
	Todas las Variables	Modelo		
		Fenoles	Fenoles + Capacidad Antioxidante	Fenoles + Bromatológicos
Ácido gálico	-14,8543	-5,5898	-8,0232	-11,0723
Hroxitiroso	-5,1591	3,1259	2,9600	-2,31847
Ácido dihidroxibenzoico	-0,3168	-2,6755	-0,0557	-2,48256
Tirosol	3,6215	4,5770	3,2111	4,26148
Ácido hidroxifenilacetico	-0,9469	-1,9236	-0,7608	-1,4673
Ácido hidroxibenzoico	5,8692	7,6069	4,4008	8,3669
Ácido clorogénico	-13,0314	-16,5705	-14,5954	-12,9544
Ácido vanílico	-2,4722	0,2674	-3,6617	1,9725
Ácido caféico	9,0577	4,4330	7,3356	5,1836
Ácido siringico	-3,7933	-0,2194	1,4152	-2,8089
Ácido p-cumárico	-1,6268	3,8474	5,8939	-4,7241
O. vanillina	1,4246	0,3133	1,9597	-0,2536
Ácido o-cumárico	4,1431	0,0502	-1,1292	5,3236
Oleuropeina	7,8395	1,4231	8,1911	0,3661
Rutina	-0,8640	-1,4286	-2,2840	1,0838
Pinoresinol	-0,1859	4,7636	2,1867	3,3972
Luteolina	2,4794	-1,4905	-0,8736	0,6333
Apigenina	-0,4557	-2,7101	2,2610	-5,6722
Fenoles totales	6,5272	-1,6446	-0,7095	1,2925
ABTS	-2,1267		-1,7176	
DMPD	-4,5571		-4,0624	
DPPH	0,4570		0,4575	
FRAP	-2,5380		-0,0295	
Contenido de humedad	-8,3616			-5,2577
Contenido de grasa	-7,3862			-3,1387
Extracto seco	-4,9403			-0,9581

*Ejemplo de la función discriminante estandarizada elaborada a partir de la primer función del modelo que incluye todas las variables.

-14,8543*Ac Galico - 5,1591*H tirosol - 0,316825*Dh Benzoico + 3,62155*tirosol - 0,946957*H Fenilac + 5,86927*H Benzoico - 13,0314*Clorogenico - 2,47229*Ac. vanillico + 9,05778*Ac. cafeico - 3,7933*Ac siringico - 1,62685*p cumarico + 1,42464*o vanillico + 4,14312*o cumarico + 7,83954*oleuropeina - 0,864024*rutina - 0,185942*pinorresinol + 2,47941*luteolina - 0,455767*apigenina - 2,12671*ABTS - 4,55719*DMPD + 0,457062*DPPH - 2,53804*FRAP + 6,52729*Fenoles - 8,36162*Cont. humedad - 7,38623*Cont. grasa - 4,94033*Extracto seco

- **Estudio con todas las variables**

En el estudio con todas las variables se obtuvieron cuatro ecuaciones discriminantes de las que 3 fueron suficientes para explicar el 95,75 % de la variación entre las técnicas culinarias, a la primera le correspondió un 65,05 %, un 18,03 % a la segunda y un 12,67 % a la tercera.

A partir de la magnitud relativa de los coeficientes de la ecuación de discriminación se deduce como fueron usadas las variables independientes para discriminar entre las técnicas culinarias (Santos and Pérez, 1996).

Como se aprecia en la primer columna de la Tabla 5.2-2, las variables con coeficientes altos fueron los ácidos gálico, clorogénico, caféico, la oleuropeína y el Contenido de humedad, mientras que a el ácido Dihidrobencóico, el pinorresinol, apigenina, rutina y la CA medida por el método DPPH les correspondieron los coeficientes más bajos de la ecuación.

- **Estudio con fenoles**

En el estudio en donde se incluyeron solo fenoles como variables, de las cuatro ecuaciones discriminantes obtenidas, tres fueron suficientes para explicar el 99,61 % de la variación entre las técnicas culinarias, la primera explicó un 79,39 %, la segunda 12,60 %, y la tercera 7,64%. En la Tabla 5.2-2 se aprecia que los fenoles con mayor impacto en la primera ecuación discriminante fueron los ácidos gálico, clorogénico, hidroxibencóico, tirosol y pinorresinol, entre los cinco menos importantes por contar con los coeficientes más bajos se encontraron los ácidos vanílico, o-cumárico, siríngico, o-vanillina y oleuropeína.

- **Estudio con concentración de fenoles + capacidad antioxidante**

En este caso analizado, tan solo las tres primeras funciones discriminantes explicaron el 95,66 % de la variación. De este porcentaje le correspondió el 64,18 % a la primera, el 22,28 % a la segunda y el 8,20 % a la tercera. En la Tabla 5.2-2 se detallan los coeficientes de las variables incluidas en este caso de estudio.

En la función discriminante más importante, la primera, no estuvo presente la CA determinada por ninguno de los cuatro métodos entre las cinco variables con coeficientes más altos (ácidos gálico, clorogénico, caféico, p-cumárico y oleuropeína). Por el contrario el DPPH y el FRAP destacaron como dos de las variables con coeficientes más bajos junto con los ácidos dihidroxibenzóico, hidroxifenilacético y los fenoles totales.

- **Estudio con concentración de fenoles + bromatológicos**

En el último caso del estudio por técnica culinaria, de las cuatro ecuaciones obtenidas, las tres primeras explicaron un 99,18 % de la variabilidad presente. Le correspondió un 69,49 % a la primera, un 19,62 % a la segunda, y el 10,01 % a la tercera.

En la ecuación más importante (Tabla 5.2-2), los cinco mayores coeficientes estuvieron asociados a fenoles (ácidos gálico, hidroxibenzóico, clorogénico, o-cumárico y apigenina), y de los parámetros bromatológicos solo destacó el contenido de extracto seco como una de las cinco variables menos importantes para clasificar la técnicas culinarias (o-vanillina, oleuropeína, luteolina, rutina y extracto seco).

Las variables comunes a los cuatro estudios con coeficientes particularmente altos fueron, el ácido gálico y el ácido clorogénico. No hubo variables de coeficientes bajos que fueran comunes a los cuatro, ni casos comunes a tres de los cuatro estudios de interés, tan solo pocos casos de variables de alta y baja importancia que fueran comunes a dos de ellos. Entre las primeras están la oleuropeína y el ácido hidroxibenzóico, y entre los de baja importancia la rutina, la o-vanillina y la CA por el método DPPH.

Es importante recalcar que en los estudios que incluyeron los datos de la CA cuantificada por todos los métodos, la oleuropeína fue uno de los fenoles con coeficientes más elevados, es decir fue uno de los que más contribuyó como criterio para discriminar entre técnicas culinarias, en contraste, cuando en los estudios no fue incluida la CA medida por los 4 métodos, la oleuropeína fue una de las variables con contribución menos importante.

Resultados y Discusión

En el estudio según la técnica culinaria, la primera función discriminante de los cuatro casos seleccionados presentó el mayor porcentaje de impacto en la clasificación. Destacó la del estudio de fenoles que por sí sola casi cubrió el 80 %, mientras que la primera ecuación del caso de fenoles + CA desplegó el menor (64,18 %).

La segunda, tercera y cuarta funciones, aunque participan con porcentajes mucho menores son importantes para resolver con precisión la discriminación entre los diferentes casos (Catena, Ramos and Truillo, 2003). En la Figura 5.2-1 se representa gráficamente la clasificación de las técnicas culinarias conforme a las dos funciones discriminantes más importantes. Los puntos calculados con las ecuaciones que incluyeron los datos de todas las variables (Fig. 5.2-1a) muestran una distribución uniforme en torno a su centroide correspondiente, no presentan dispersión y se encuentran bien definidos. Sin embargo no están uniformemente distanciados, como se aprecia, los grupos más cercanos entre sí fueron los correspondientes a las técnicas culinarias de cocción, cocción en medio agua/aceite, crudo y rehogado. El alimento frito se ubica distante del resto de técnicas.

En el gráfico (Fig. 5.2-1b) que corresponde al estudio con los fenoles, la dispersión que se observa en los datos generados con las ecuaciones de discriminación es mayor que en el caso anterior, pues los datos no se encuentran aglutinados de manera compacta en torno al centroide, a pesar de eso, sigue existiendo una agrupación clara en torno a este y se sigue manteniendo la homogeneidad de los grupos. Un punto a favor de esta clasificación por encima del resto de conjuntos de datos es que todas las técnicas se muestran uniformemente distanciadas entre sí.

Al incluir los datos de fenoles y los de CA (Fig. 5.2-1c) se siguen manteniendo conjuntos de puntos homogéneos, la mejora en la de la distribución de los valores en torno al centroide respecto al empleo único de los fenoles es notoria, pues los grupos son más compactos. Sin embargo la adición de los datos de CA ocasionó que se redujera la distancia entre los grupos correspondientes a los alimentos crudos y cocidos aunque se siguen apreciando claramente diferenciados, el resto de grupos se mantuvieron distanciados entre sí.

Cuando se estudiaron los datos de los fenoles en conjunto con los bromatológicos (Fig. 5.2-1d), ocurrió algo semejante que cuando se estudiaron junto con los datos de CA. Se conformaron grupos compactos, bien definidos, y distanciados entre sí, excepto en el caso de la cocción y el crudo que al aproximarse entre sí, se apartaron del resto de tratamientos que incluían AOVE.

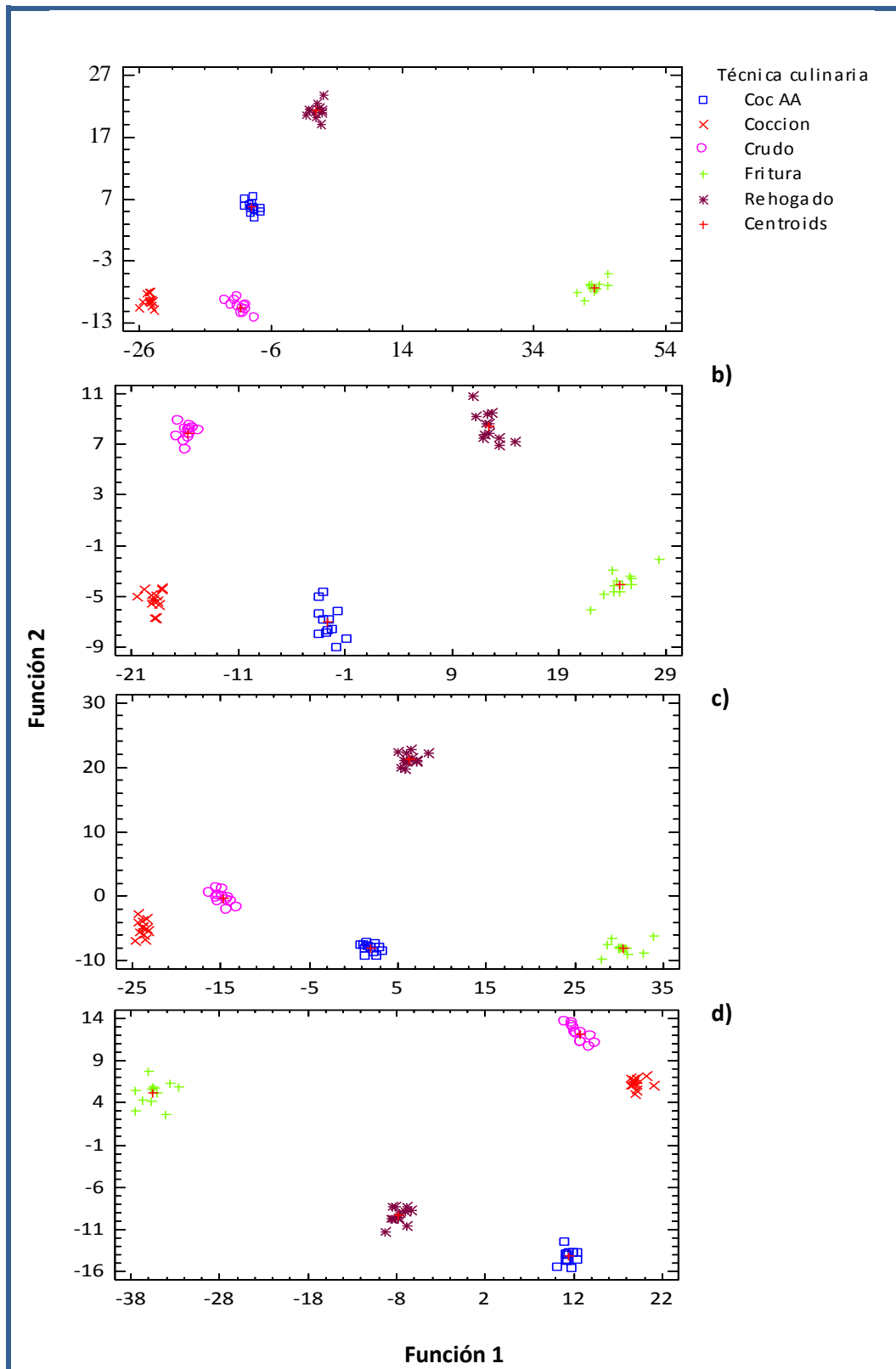


Figura 5.2-1. Gráfica de las funciones discriminantes estandarizadas según técnica culinaria incluyendo a) fenoles, b) bromatológicos, c) fenoles + CA, y d) fenoles + bromatológicos.

De la evaluación y comparación de los modelos de discriminación obtenidos de los cuatro estudios se desprende que, con los cuatro modelos, se obtiene una clara diferenciación de las cuatro técnicas culinarias aplicadas y de las hortalizas crudas. Sin embargo, en los estudios que incluyeron como variables a todas las técnicas, fenoles + CA y fenoles + bromatológicos, tiende a haber mayor grado de segregación de la fritura y/o el rehogado, y de acercamiento entre la cocción y crudo.

Por lo tanto, se consideró como modelo idóneo para la discriminación entre técnicas culinarias al que incluyó solo los fenoles como variables, pues se obtuvieron las ventajas mencionadas para el resto de modelos, al mismo tiempo que todas las técnicas culinarias se muestran uniformemente distanciadas entre sí. Otro punto extra en favor de este modelo es su simplicidad, ya que es el que cuenta con el menor número de variables.

5.2.2 Análisis discriminante según la hortaliza

En la Tabla 5.2-3, se muestra un resumen de los casos estudiados en el análisis según hortaliza.

Al igual que en el estudio según la técnica culinaria, las ecuaciones obtenidas en los estudios con los valores de capacidad antioxidante, bromatológicos y capacidad antioxidante + bromatológicos no fueron satisfactorias. Ya que no fueron significativas, las correlaciones canónicas fueron bajas y además, proporcionaron porcentajes de casos correctamente clasificados inferiores a 100 (CA 60%, bromatológicos 66,67 % y bromatológicos + CA 83,3 %).

Por otra parte, se obtuvieron ecuaciones discriminantes satisfactorias incluyendo como elementos variables de dichas ecuaciones las determinaciones de fenoles.

Tanto en el caso de su estudio individual como cuando fueron analizadas en conjunto con los datos de la capacidad antioxidante y/o los bromatológicos. En estos cuatro casos las ecuaciones fueron significativas, presentaron correlaciones canónicas adecuadas al criterio de satisfacción y se consiguió un 100% de efectividad en la discriminación entre hortalizas.

Tabla 5.2-3. Resumen de los estadísticos del análisis discriminante según hortaliza (patata, berenjena, tomate y calabaza) procesadas por cinco técnicas culinarias.

Caso estudiado	No. de Funciones Discriminantes	Probabilidad (Significancia $p < 0,05$)	Correlación Canónica	Clasificación (%)	Satisfactorio
Todos los Componentes	1	0,0*	0,999*	100	Si
	2	0,0*	0,998*		
	3	0,0*	0,993*		
Fenoles	1	0,0*	0,998*	100	Si
	2	0,0*	0,994*		
	3	0,0*	0,985*		
Capacidad Antioxidante	1	0,0*	0,706	60	No
	2	0,0*	0,523		
	3	0,06	0,307		
Bromatológicos	1	0,0*	0,742	66,67	No
	2	0,01*	0,447		
	3	0,43	0,104		
Fenoles + Capacidad Antioxidante	1	0,0*	0,999*	100	Si
	2	0,0*	0,997*		
	3	0,0*	0,993*		
Fenoles + Bromatológicos	1	0,0*	0,999*	100	Si
	2	0,0*	0,996*		
	3	0,0*	0,990*		
Capacidad antioxidante + Bromatológicos	1	0,0*	0,849	83,33	No
	2	0,0*	0,641		
	3	0,0*	0,496		

* Valores que cumplen los criterios de clasificación.

En la Tabla 5.2-4 se detalla la primera y más importante función de discriminación de cada uno de los cuatro modelos calculados para los casos con eficacia superior al 100 %, en esta tabla también se ejemplifica el desarrollo de la ecuación de la función discriminante del modelo obtenido con todas las variables del estudio (fenoles + CA + bromatológicos) a partir de los coeficientes proporcionados.

Las ecuaciones del resto de casos (fenoles, fenoles + bromatológicos y fenoles + CA) se configurarían del mismo modo haciendo uso de los coeficientes recogidos en su columna correspondiente.

- **Estudio con todas las variables**

Cuando se realizó el estudio incluyendo todos los elementos, se obtuvieron tres ecuaciones significativas que explicaron, cada una, el 68,6, 26,5 y 4,9 % de la variabilidad. Los coeficientes estandarizados obtenidos, se recogen en la Tabla 5.2-4. A partir de la magnitud relativa de estos coeficientes, se determinó como fueron usadas las variables independientes para discriminar entre las hortalizas (Álvarez, 1995).

En el estudio para discriminar entre hortalizas se observa que, a pesar de que solo en los modelos en que fueron considerados los fenoles se obtuvieron ecuaciones satisfactorias, siempre estuvo presente un parámetro ajeno a los fenoles individuales entre las cinco variables con mayor importancia relativa (con los coeficientes más altos).

En el caso que nos ocupa en este apartado “todas las variables”, tres de las cinco variables más importantes con mayor impacto relativo por presentar los coeficientes más altos, no fueron fenoles individuales (los fenoles totales, el contenido de humedad, la CA cuantificada por el método FRAP), aunque también se incluyeron el ácido p-cumárico, y el pinorresinol.

También se destacaron con una importancia menor para la discriminación de variables, la CA medida por los métodos DPPH y DMPD, el contenido de grasa, el ácido vanílico y el ácido hidroxifenilacético.

- **Estudio con fenoles**

El modelo desarrollado para discriminar entre las cuatro hortalizas eligiendo el grupo de fenoles como variables predictivas consistió en tres ecuaciones. De las tres, fue la primera, la que cubrió un mayor porcentaje relativo de la predicción, que ascendió al 67,47 %, a la segunda le correspondió el 24,13 % y a la tercera el 4,88 %. En la Tabla 5.2-4 se despliegan los coeficientes de las variables predictivas de la primer ecuación del modelo.

Como se puede observar, los cinco fenoles más importantes por la magnitud de los coeficientes fueron: el ácido gálico, p-cumárico, dihidroxibenzóico, pinorresinol y luteolina. Mientras que los de menor importancia relativa fueron la oleuropeína, los Ácidos hidroxifenilacético, o-cumárico, vanílico, e hidroxitirosol.

Tabla 5.2-4. Primer función discriminante de los cuatro modelos en el estudio según hortaliza.

	Coeficientes de la Primer Función Discriminante			
	Todas las Variables	Fenoles	Fenoles + Capacidad Antioxidante	Fenoles + Bromatológicos
Ácido gálico	-6,6224	5,1172	-6,4966	4,3104
Hidroxitirosol	-9,0692	0,0092	-2,2910	-0,1004
Ácido dihidroxibenzoico	14,9855	6,7914	12,2575	11,2624
Tirosol	-1,1288	-2,1347	-1,8695	-2,3901
Ácido hidroxifenilacetico	-0,2228	0,0285	-0,0131	0,4236
Ácido hidroxibenzoico	3,1315	2,6235	0,8529	2,6094
Ácido clorogénico	11,4938	-12,5406	-0,8581	-10,5622
Ácido vanílico	-0,5098	-1,3242	1,2442	-2,6880
Ácido caféico	14,9745	2,1789	15,9444	6,6473
Ácido siríngico	5,8240	5,3923	5,2037	3,6509
Ácido p-cumárico	-21,7008	12,577	-3,5309	5,5931
O. vanillina	-12,1358	-3,4402	-9,1954	-5,3256
Ácido o-cumárico	4,8171	1,5964	4,8072	6,3931
Oleuropeina	10,0394	0,4864	1,7925	3,6235
Rutina	-4,0409	-3,8590	-2,3977	-3,4278
Pinoresinol	-15,0799	-6,1284	-4,8195	-9,2348
Luteolina	-10,9585	-6,1772	-10,7086	-9,3426
Apigenina	2,9962	3,0407	1,3494	3,7949
Fenoles Totales	17,7684	-4,4892	-0,4886	-0,9963
ABTS	-8,0555		-3,7090	
DMPD	-1,8448		-3,3638	
DPPH	0,1505		0,0277	
FRAP	-16,2833		-6,7952	
Contenido de humedad	-17,7676			10,2838
Contenido de grasa	-1,9864			7,6806
Extracto seco	-14,508			-1,2946

*Ejemplo de la función discriminante estandarizada elaborada a partir de la primer función del modelo que incluye todas las variables.

$-6,62244 * \text{Ac Galico} - 9,06923 * \text{H tirosol} + 14,9855 * \text{Dh Benzoico} - 1,1288 * \text{tirosol} - 0,222877 * \text{H Fenilac} + 3,1315 * \text{H Benzoico} + 11,4938 * \text{Clorogenico} - 0,509801 * \text{Ac. vanillico} + 14,9745 * \text{Ac. cafeico} + 5,82407 * \text{Ac siríngico} - 21,7008 * \text{p cumarico} - 12,1358 * \text{o vanillico} + 4,81719 * \text{o cumarico} + 10,0394 * \text{oleuropeina} - 4,04093 * \text{rutina} - 15,0799 * \text{pinorresinol} - 10,9585 * \text{luteolina} + 2,99628 * \text{apigenina} - 8,05555 * \text{ABTS} - 1,84482 * \text{DMPD} + 0,150599 * \text{DPPH} - 16,2833 * \text{FRAP} + 17,7684 * \text{Fenoles} - 17,7676 * \text{Cont. humedad} - 1,98643 * \text{Cont. grasa} - 14,508 * \text{Extracto seco}$

- **Estudio con concentración de fenoles + capacidad antioxidante**

De las tres ecuaciones obtenidas en este caso, el mayor porcentaje de predicción se observó en la primera con 67,42 %, a la segunda le correspondió el 24,5 % y a la tercera el 8,1 %. La primera ecuación del modelo predictivo con sus respectivos coeficientes se muestran en la Tabla 5.2-4.

En la primera ecuación, la más significativa en cuanto a porcentaje relativo, los cinco coeficientes más altos correspondieron a las variables predictivas ácido dihidroxibenzóico, ácido clorogénico, contenido de humedad, luteolina y pinorresinol. Las menos importantes y por lo tanto con coeficientes más pequeños fueron el extracto seco, los fenoles totales, el tirosol, el hidroxitirosol y el ácido hidroxifenilacético.

- **Estudio con la concentración de fenoles + bromatológicos**

En este último caso de estudio, el modelo predictivo también estuvo conformado por tres ecuaciones, pero fue aquí en donde se encontró la primera ecuación con el mayor porcentaje de contribución a la predicción (71,83 %), a la segunda le correspondió un porcentaje menor que a las de los otros modelos (20,77 %) y la tercera quedó con 7,04 %.

En base a la magnitud de los coeficientes, las cinco variables predictivas más importantes fueron: los ácidos dihidroxibenzóico y clorogénico, la luteolina, el Pinorresinol y el contenido de humedad. Entre las de menor impacto se encontraron el ácido hidroxifenilacético, el hidroxitirosol, tirosol, fenoles totales y el extracto seco.

Finalmente, al observar en conjunto las cinco variables con coeficientes de mayor valor absoluto en la primera ecuación de discriminación de todos los estudios, no se encontraron casos de variables predictivas que fueran comunes a los cuatro casos de este apartado (todos los componentes, fenoles, fenoles + capacidad antioxidante y fenoles + bromatológicos).

Los fenoles pinorresinol, luteolina y el ácido dihidroxibenzóico presentaron coeficientes altos en las ecuaciones de tres de los cuatro modelos predictivos, y pareciera que la presencia del primero estuvo asociada a los modelos que incluyeron los bromatológicos solos o en conjunto con la CA.

El método FRAP fue la única modalidad para la determinación de la CA con importancia como

variable predictiva, y se presentó como tal en los modelos de los dos estudios en que se incluyó la CA. Algo semejante al FRAP ocurrió con el contenido de humedad, fue el único parámetro bromatológico con importancia como variable predictiva y se presentó en ambos modelos que los incluyeron en los cálculos. Otras variables que fueron comunes a los modelos de dos estudios fueron el ácido p-cumárico y el clorogénico.

Entre las cinco variables con coeficientes más bajos de los cuatro modelos, si se encontró un caso común a todos los estudios de este apartado. Fue el ácido hidroxifenilacético. La importancia del DPPH fue mínima en las primeras ecuaciones de los modelos que incluyeron todas las variables y en el de fenoles + CA, el ácido vanílico en el de todas las variables y en el de fenoles, el hidroxitirosol fue poco relevante en el de fenoles y en el de fenoles + bromatológico y por último los fenoles totales tuvieron poco impacto en los modelos de fenoles + CA y fenoles + bromatológicos.

Como se mencionó en el apartado anterior, aunque en la evaluación de los modelos obtenidos, solo fue considerada la primera ecuación por ser la de mayor contribución en la discriminación, los modelos no estarían completos ni se obtendría una clasificación precisa sin las ecuaciones restantes (Martínez, Mauro and Alvarez, 2003).

Para facilitar la evaluación de modelos los obtenidos, se muestran las gráficas de las dos funciones más importantes de cada uno de los cuatro modelos Fig. 5.2-2a, b, c y d. En ellas se aprecia la distribución de los valores generados con las funciones discriminantes respecto al centroide.

Los puntos de las ecuaciones elaboradas con los datos de todos los componentes, los fenoles, fenoles + capacidad antioxidante, y fenoles + bromatológicos muestran una distribución uniforme en torno a su centroide correspondiente. Se consiguieron grupos compactos, definidos y distanciados entre sí, de manera que las cuatro hortalizas se aprecian claramente diferenciadas con todos los modelos.

Cuando se realizó el análisis considerando solo los fenoles como variables (Fig. 5.2-2b) se observa un incremento de la dispersión. Como se puede observar, esta dispersión disminuyó cuando se asociaron para el análisis discriminante, la capacidad antioxidante (Fig. 5.2-2c) y/o los bromatológicos (Fig. 5.2-2a y b). Pero en ninguno de los casos la dispersión causó confusión de los grupos.

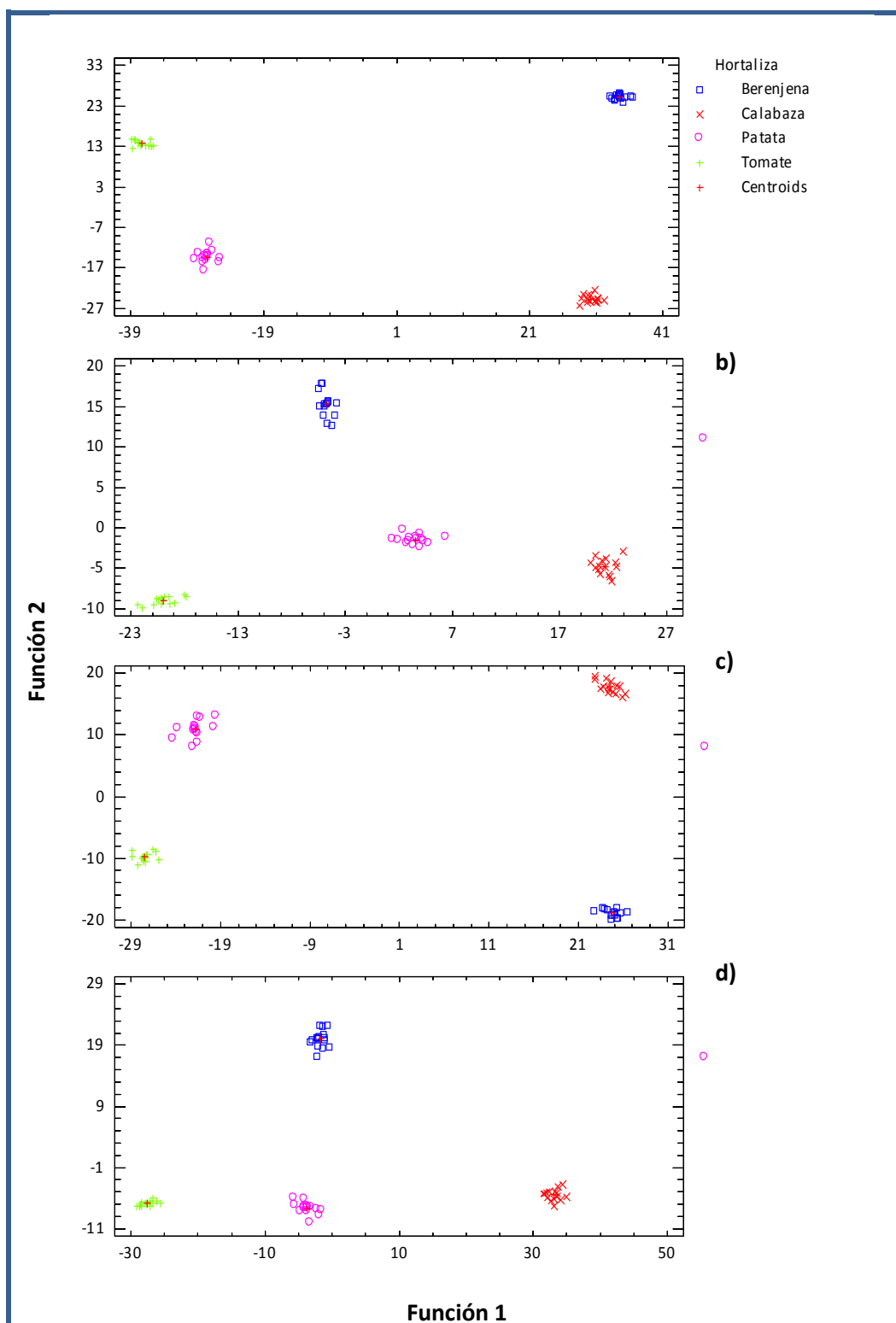


Figura 5.2-2 Gráfica de las funciones discriminantes estandarizadas según hortaliza incluyendo a) todos los componentes, b) fenoles, c) fenoles + capacidad antioxidante y d) fenoles + bromatológicos.

Por lo anterior, se considera el modelo más simple (con el menor número de variables predictivas) como el idóneo para la discriminación entre hortalizas. De entre los modelos ensayados el que presentó menor número de variables fue el que incluyó los fenoles (19 variables).

Una diferencia fundamental entre los modelos obtenidos de los estudios por técnica culinaria y por hortaliza fue que en los primeros, las variables de los parámetros bromatológicos y de los métodos de CA no estuvieron presentes entre los más importantes como variables predictivas en las ecuaciones. En contraste, para diferenciar entre hortalizas, el contenido de humedad y la CA por el método FRAP sí se hicieron presentes entre los principales cuando sus grupos de parámetros fueron incluidos en los estudios (bromatológicos y capacidad antioxidante).

Finalmente, tras el estudio para la discriminación por técnica culinaria y por hortaliza se pudo observar que los fenoles individuales y totales por sí solos sirven como base suficiente para la obtención de modelos discriminantes satisfactorios, proporcionan como resultado una buena agrupación en torno a los centroides, buena diferenciación entre grupos y simplicidad por el bajo número de variables incluidas.

En el análisis cluster se observó que la agrupación de observaciones fue función tanto de las características antioxidantes y bromatológicas de la hortaliza como las de la técnica culinaria empleada, ya que los conglomerados obtenidos aunque tendieron a agruparse de acuerdo a la hortaliza, no estuvieron conformados por grupos homogéneos definidos exclusivamente por técnicas culinarias u hortalizas específicas.

Con el análisis discriminante se pudo constatar que, a pesar de haber semejanzas en los parámetros aquí estudiados entre las diferentes hortalizas elaboradas por las cinco técnicas culinarias que las agrupan en conjuntos mezclados, las diferencias que guardan entre sí las técnicas culinarias o las hortalizas, son lo suficientemente claras como para discriminar entre las categorías de cada una.

Se puede afirmar que la combinación de las variables cuantificadas es tan específica de cada técnica culinaria, que el perfil generado por cada una será el mismo independientemente de que la hortaliza procesada haya sido patata, berenjena, tomate o calabaza. Del mismo modo, cada hortaliza tiene un perfil tan específico, que independientemente de la técnica por la que haya sido procesada, esa combinación se conservará aún después de haber procesado la hortaliza.

Resultados y Discusión

Así, de cualquiera de las hortalizas (patata, berenjena, tomate y calabaza) aquí estudiadas, y tras haber sido elaboradas con alguna de las técnicas en estudio y bajo las mismas condiciones, desarrollará un perfil final de fenoles, capacidad antioxidante y parámetros bromatológicos que dependerán tanto de las características iniciales de la hortaliza como de los perfiles propios generados por cada técnica culinaria.

6. DETERMINACIONES COMPLEMENTARIAS.

6.1. Análisis periódico del estado de oxidación del lote de aceite de oliva virgen extra crudo durante el almacenamiento previo a la experimentación.

Además de la importante influencia que ejercen los antioxidantes y la composición de los ácidos grasos sobre la reactividad química de los aceites, factores físicos como la exposición al aire, el calor, la luz o la presencia de humedad y trazas de metales afectan de manera determinante la estabilidad de este alimento. Sin embargo, el aceite de oliva virgen extra presenta un contenido de antioxidantes fenólicos y no fenólicos y un perfil de ácidos grasos en el que predominan los ácidos grasos monoinsaturados, que le confieren una alta estabilidad pues la velocidad de reacción de estos con el oxígeno es relativamente baja (Shahina, et al., 2005).

Para asegurar que la calidad del aceite de oliva utilizado en la realización de las técnicas culinarias correspondiera a la categoría de “virgen extra”, se analizaron los parámetros químicos relacionados con el estado de oxidación en el aceite almacenado a 4 °C tanto al inicio del estudio como rutinariamente a lo largo del periodo de experimentación. Los resultados se compararon con los límites legales establecidos para la denominación, así se consiguió asegurar que la pérdida de calidad del aceite no fuera un factor que afectara los resultados.

En la Tabla 6.1-1 se recogen los promedios de los parámetros químicos estudiados antes del almacenamiento del volumen total de aceite de cada lote (3 l) dividido en alícuotas de 500 ml, los análisis se practicaron el mismo día de la adquisición de cada uno de los cuatro lotes de AOVE utilizado en los ensayos, y a este día se le denominó como “0”. Como se observa, los promedios de los parámetros cuantificados en el aceite de oliva crudo de cada uno de los lotes, no superó los estándares establecidos por la normativa (UE, 2011) para asignar la categoría de “virgen extra”, sin embargo como también se aprecia, sí hubieron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) de cada parámetro entre los cuatro lotes analizados.

La designación del aceite de oliva virgen extra se caracteriza por niveles reducidos de oxidación e hidrólisis, y cantidades superiores de compuestos antioxidantes minoritarios (Casal et al., 2010).

El AOVE con mayor acidez titulable (0,29 % de ácido oléico) fue el del empleado en los experimentos con tomate, el índice de peróxido más elevado le correspondió también a este lote de aceite (5,79 meq O₂ activo). El destinado al ensayo con la berenjena presentó la magnitud más elevada del parámetro K₂₃₂ (1,74 g/100 ml), mientras que el más alto del K₂₇₀ (0,14 g/100 ml) le correspondió al lote del ensayo con patata.

Los valores encontrados del índice de peróxido se pueden considerar bajos respecto a los reportados por Lerma-García et al. (2009) de 11,96 y 12,44 meq O₂ activo/Kg, pero los de la acidez titulable (0,24 y 0,18 % de ácido oléico) fueron semejantes a los de este estudio.

A partir de estos resultados se afirma que los parámetros relacionados con el estado de oxidación del AOVE de este estudio, mostraron conformidad con los límites establecidos por la norma al momento de su adquisición, y que estos, efectivamente correspondieron al de un aceite de oliva de la categoría “virgen extra”.

La realización de los quince ensayos de las cinco técnicas culinarias en cada hortaliza se llevó a cabo en un tiempo máximo de 60 días desde la obtención del AOVE y el envasado de las alícuotas.

Tabla. 6.1-1. Parámetros químicos relacionados con el estado de oxidación del AOVE de los cuatro lotes incluidos en el estudio.

Lote según hortaliza	Acidez titulable (% Ácido Oléico)	Índice de peróxidos (meq O ₂ activo)	K ₂₃₂ (g/100ml)	K ₂₇₀ (g/100ml)
Patata	0,13 ± 0,0 a*	3,41 ± 0,0 ab	1,76 ± 0,01 a	0,20 ± 0,07c
Berenjena	0,20 ± 0,01 b	2,64 ± 0,06 a	1,67 ± 0,06 b	0,03 ± 0,02 a
Tomate	0,29 ± 0,05 c	5,79 ± 0,98 c	1,74 ± 0,27 a	0,14 ± 0,04 b
Calabaza	0,19 ± 0 b	4,12 ± 0,65 b	1,81 ± 0,1 a	0,05 ± 0,01 c
Valores de referencia para AOVE**	≤ 0,8	≤ 20	≤ 2,50	≤ 0,22

* Los promedios seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes (p > 0,05).

**Según UE, 2011.

En las gráficas de la Fig. 6.1-1 se observa la evolución de los resultados de los análisis periódicos desde el inicio hasta el final del lapso de experimentación. En ellas se muestra que la calidad del aceite utilizado en esta investigación se mantuvo a lo largo del estudio dentro de los parámetros estipulados para la categoría de virgen extra (UE, 2011). Los límites establecidos por la norma para cada parámetro químico conforman la longitud de los ejes verticales, así se facilita la visualización de la proporción de la magnitud de las oscilaciones respecto a estos.

En el ANOVA no se detectaron diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) entre los valores de cada parámetro químico a lo largo del tiempo de almacenamiento, excepto en los valores del K_{232} del tomate en los días 40 y 50, que fueron significativamente más bajos que los de los días 0 y 60. Al comparar cada una de las determinaciones con los valores de referencia para el aceite de oliva virgen extra, se observó que en ningún momento el aceite superó los valores establecidos para esta denominación.

El índice de peróxidos fue el único parámetro con tendencia aparente a incrementar, pero la falta de diferencias significativas en este parámetro a lo largo de los dos meses de estudio, demuestra que se mantuvo estable. Lo mencionado por Bester et al., (2008) indica que el comportamiento esperado es hacia la reducción, es decir, el opuesto a lo que observamos, ya que estos productos primarios de la oxidación son muy inestables y además reaccionan rápidamente para formar productos secundarios. Por lo tanto, conforme la oxidación transcurre, la concentración de los hidroperóxidos disminuye y da lugar a un aumento en los productos secundarios de la oxidación.

La absorbancia a 232 nm indica la presencia de dienos conjugados y de hidroperóxidos linoleicos. El aumento en este parámetro es debido a que en la oxidación de la materia grasa se forman hidroperóxidos que absorben en la zona próxima a 232 nm. En su oxidación posterior se originan una serie de productos secundarios que absorben a 270 nm aproximadamente (Sánchez-Muñiz, et al., 1994; Casal, 2010).

En nuestros aceites, el incremento del valor de K_{232} durante el almacenamiento del AOVE indicó el curso de una etapa temprana de la oxidación, y los valores bajos del K_{270} mostraron la formación poco importante de productos de oxidación secundarios a partir de los hidroperóxidos, circunstancia que corresponde a un estado de oxidación poco avanzado.

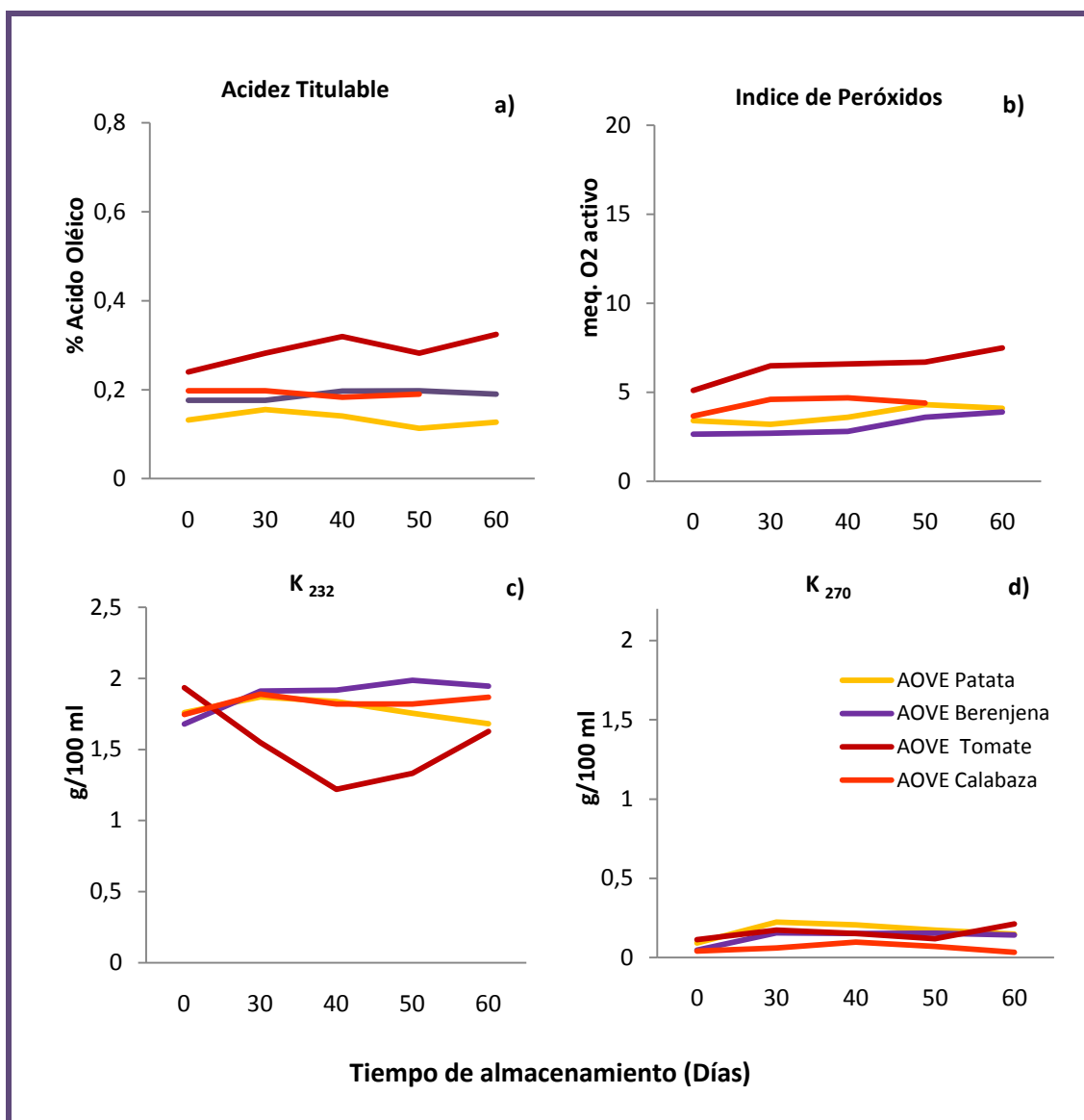


Figura 6.1-1. Tendencia de los parámetros químicos de calidad medidos en el aceite de oliva virgen extra durante el almacenamiento a) acidez titulable, b) índice de peróxidos, c) K₂₃₂ y d)

K₂₇₀.

Los resultados obtenidos en cuanto a la conservación de la calidad oxidativa del aceite crudo de experimentación fueron satisfactorios. Y La estabilidad de los parámetros químicos durante el lapso de almacenamiento fue la esperada considerando que el tiempo de almacenamiento fue breve respecto a la vida media que ha sido observada en el AOVE.

La vida media del AOVE es de gran importancia, y su valor máximo se ha establecido por algunos autores entre 12 a 18 meses (Morelló et al., 2004, Pasini et al., 2009, Kirchene et al., 2010). Nenadis et al. (2013) afirmó que aún tras doce meses de almacenamiento (oscuridad, 23 ± 3°C), las muestras de AOVE satisfacían los límites oficiales de acidez, peróxidos, K₂₃₂ y K₂₇₀.

Fregapane et al. (2013) observó una alta estabilidad de los productos después de un periodo de venta de un año, durante ese tiempo hubo una baja tasa de oxidación con un descenso no significativo simultáneo de los fenoles totales y los o-difenoles y un incremento relevante de los fenoles simples (Hidroxitirosol y Tirosol).

IV. CONCLUSIONES

Conclusiones

1. CONCLUSIONES

1. Se han empleado diferentes métodos para la determinación de la capacidad antioxidante. Siendo el método DPPH el idóneo para el estudio de este tipo de muestras, al presentar mejor correlación con el índice de fenoles totales.
2. La fritura, rehogado, cocción y cocción en mezcla agua/aceite aplicadas en cuatro hortalizas de la dieta mediterránea, favorecen, el enriquecimiento del perfil en fenoles y según el caso, el incremento, la reducción o la conservación de la capacidad antioxidante, de las concentraciones de fenoles totales, y de las concentraciones de los compuestos fenólicos identificados.
3. Mientras la hortaliza enriquece cualitativa y cuantitativamente su perfil fenólico, e incrementa la capacidad antioxidante, por la disponibilidad de de sus propios fenoles y la incorporación de AOVE. El agua se enriquece por la captación de los compuestos que migran desde el AOVE y la hortaliza. El AOVE pierde estas propiedades que ha cedido al agua y las hortalizas y por los propios procesos de degradación térmica que afectan a los fenoles.
4. En las hortalizas estudiadas de la dieta mediterránea, las cuatro técnicas culinarias generan el enriquecimiento del perfil de los fenoles, e incremento en las variables cuantificadas. La fritura causa el incremento y la conservación con mayor frecuencia que el rehogado y la cocción es la técnica que con mayor frecuencia genera pérdidas en las variables antioxidantes.
5. En el AOVE, predomina la reducción por encima de los incrementos y la conservación de las variables antioxidantes del aceite crudo, el rehogado origina reducciones con mayor frecuencia.

Conclusiones

6. El agua durante la cocción, se enriquece por la incorporación de compuestos fenólicos, con ello también incorpora la capacidad antioxidante que se asocia a estas moléculas; la adición de AOVE durante la cocción intensifica este efecto.
7. El efecto de la técnica culinaria depende de las características de la hortaliza cruda. Cuando la hortaliza cruda no presenta concentraciones elevadas de fenoles, ni de capacidad antioxidante, las técnicas culinarias de fritura y rehogado en AOVE provocan la absorción de aceite y un efecto de concentración. La cocción reduce la concentración de fenoles y la capacidad antioxidante de la hortaliza, pero enriquecen el agua. La adición de AOVE durante la cocción, mejora aún más el perfil cualitativo y cuantitativo de fenoles y la capacidad antioxidante. En estos casos es altamente recomendable consumir el agua de cocción.
8. En las hortalizas con elevada capacidad antioxidante y contenido de fenoles. La aplicación de la fritura y el rehogado incrementa la magnitud de ambas variables; la aplicación de la cocción y la cocción en mezcla agua/aceite, no afectan su concentración final. En estos casos es altamente recomendable consumir el agua de cocción.
9. La combinación de las variables bromatológicas, de fenoles y capacidad antioxidante de cada técnica culinaria, es el mismo, independientemente de la hortaliza procesada. Del mismo modo, el perfil de cada hortaliza también se conserva sin que interfiera la técnica de elaboración.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Abu Bakar, M.F., Mohamed, M., Rahmat, A., Fry, J. 2009. Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*). Food Chem. 113:479–83.

Abushita, A.A., Daood, H.G., Biacs, P.A. 2000. Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors. J Agric Food Chem. 48:2075–81.

Adams, G. G., Imran, S., Wang, S., Mohammad, A., Kok, S., Gray, D.A., Channell, G.A., Morris, G.A., Harding, S.E. 2011. The hypoglycaemic effect of pumpkins as anti-diabetic and functional medicines. Food Research International. 44:862–867.

Adefegha, S.A. and Oboh, G. 2011. Enhancement of total phenolics and antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables by steam cooking. Journal of Food Processing and Preservation. 35: 615–622.

Agudo, A., Cabrera, L., Amiano, P., Ardanaz, E., Barricarte, A., Berenguer, T., D Chirlaque, M., Dorronsoro, M., Jakšzyn, P., Larrañaga, N., Martínez, C., Navarro, C., Quirós, J. R., Sánchez, M. J., Tormo, M. J., and González, C. A. 2007. Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). Am J Clin Nutr. 85:1634–42.

Ak, T., Gulcin, I. 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. Chemo-Biological Interactions. 174:27–37.

Akanitapichat, P., Phraibung, K., Nuchklang, K., Prompitakkul, S. 2010. Antioxidant and hepatoprotective activities of five eggplant varieties. Food and Chemical Toxicology. 48:3017–3021.

Alamed J., Chaiyasit W., McClements D. J., Deckere, A. 2009. Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. J. Agric. Food Chem. 57:2969–2976.

Ali M.A., Chanu K. V., Devi, L.I. 2011. Antioxidant capacities of vegetables consumed in north east India assessed by three different in vitro assays. Int. J. Res. Pharm. Sci., 2(2):118-123.

Allalout, A., Krichène D., Methenni, K., Taamalli, A., Oueslati, I., Daoud, D., Zarrouk, M. 2008. Characterization of virgin olive oil from Super Intensive Spanish and Greek varieties grown in northern Tunisia. Sci. Hortic. doi:10.1016/j.scienta.2008.10.006

Al-Saikhan, M.S., Howard, L.R., Millar, J.C. 1995. Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). J Food Sci. 60:341-343.

Álvarez, C. R. 1995. Estadística multivariante y no paramétrica con SPSS: aplicación a las ciencias de la salud. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España.

Andersen, J. K. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? Nat. Med. 10(SupplS):18–25.

Andlauer, W., Stumpf, C., Hubert, M., Rings, A. and Furst, P. 2003. Influence of cooking process on phenolic marker compounds of vegetables. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 73(2):152–159.

Andrade, J. P., Assuncao, M. 2012. Protective effects of chronic green tea consumption on age-related neurodegeneration. Current Pharmaceutical Design. 18(1):4-14.

- Andre, C. M., Ghislain, M., Bertin, P., Oufir, M., Herrera Mdel, R., Hoffmann, L., Hausman, J. F., Larondelle, Y. and Evers, D. 2007. Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) as a source of antioxidant and mineral micronutrients. *J. Agric. Food Chem.* 55:366–378.
- Andre, C. M., Schafleitner, R., Guignard, Oufir, C.E. M., Alvarado, C.A.A. , Nomberto, G., Hoffmann, L., Hausman, J.F.O., Evers, D., And Larondelle. Y. 2009. Modification of the Health-Promoting Value of Potato Tubers Field Grown under Drought Stress: Emphasis on Dietary Antioxidant and Glycoalkaloid Contents in Five Native Andean Cultivars (*Solanum tuberosum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 57: 599–609.
- Anese, M., Nicoli, M. C. 2001. Comparison among different methodologies currently used for assessing the antioxidant activity of foods. In *Melanoidins in Food and Health*, Vol. 2; Ames, J. M., Ed.; European Communities: Bruxelles, Belgium, pp 53-63.
- Aranceta, J. 2001. Spanish food patterns. *From Public health Nutrition.* 4(6A):1399-402.
- Arnao, M. B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science and Technology.* 11:419-421.
- Arts, I.C.W. and Hollman, P.CH. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(suppl):317S–25S.
- Attya, M., Benabdelkamel, H., Perri, E., Russo, A. Sindona, G. 2010. Effects of Conventional Heating on the Stability of Major Olive Oil Phenolic Compounds by Tandem Mass Spectrometry and Isotope Dilution Assay. *Molecules.* 15:8734-8746
- Azlan, A., Prasad, K.N., Khoo, H.E., Abdul-Aziz, N., Mohamad, A., Ismail, A., Amom, Z. 2010. Comparison of fatty acids, vitamin E and physicochemical properties of *Canarium odontophyllum* Miq. (dabai), olive and palm oils. *Journal of Food Composition and Analysis.* 23:772–776.
- Azuma, K.; Ohyama, A.; Ippoushi, K.; Ichianagi, T.; Takeuchi, A.; Saito, T.; Fukuoka H. 2008. Structures and antioxidant activity of anthocyanins in many accessions of eggplant and its related species. *J. Agric. Food Chem.* 56: 10154–10159.
- Bakar, M. F. A., Mohamed, M., Rahmat, A., Fry, J. 2009. Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus doratissimus*). *Food Chemistry.* 113:479–483.
- Bakhouche, A., Lozano-Sánchez, J., Beltrán-Debón, R., Joven, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. 2013. Phenolic characterization and geographical classification of commercial Arbequina. *Food Research International.* 50:401–408.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry.* 99:191–203.
- Bavaresco, L. 2003. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs under Experimental and Clinical Research.* 29:181–187.
- Beecher, G. R. 2003. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrences and intake. *American Society for Nutrition and Sciences.* 3248, 3254.

Bibliografía

Bejaoui, K.B., Ammari, F.; Ben Attia, M. and Ghanem-Boughanmi, N. 2010. Oxidation stability of virgin olive oil during ripening. *Ernaehrung*. 34(5):197-205.

Belitz, H.D. and Grosch, W. 1987. *Food Chemistry*, Springer, Berlin.

Bellali, A.A., Omayma, E.S., Mohammed, M.Y., Ahmed, M., El Gamal, A. 2012. Effect of home-cooking methods on phenolic composition and antioxidant activity of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars grown in Egypt. *Food and Nutrition Sciences*. 3:490-499.

Bello, G. J. 1998. *Ciencia y tecnología culinaria*. Madrid: Díaz de Santos. España.

Benzie, I. F. F., and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": the frap assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70–76.

Benzie, I.F.F and Wachtel-Galor, S. 2011. Increasing the antioxidant content of food: a personal view on whether this is possible or desirable. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. Early Online: 1–9.

Benov, L., Szejnberg, L., Fridovich, I. 1998. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radical Biology & Medicine*. 25(7):826–831.

Bešter, E., Butinar, B., Bučar-Miklavčič, M., Golob, T. 2008. Chemical changes in extra virgin olive oils from Slovenian Istra after thermal treatment. *Food Chemistry*, 108(2): 446-454.

Binoy G., Kaur, Ch., Khurdiya, D.S., Kapoor H.C. 2004. Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. *Food Chem*. 84:45–51.

Blasa, M., Gennari, L., Angelino, D. and Ninfali, P. 2010. Fruit and vegetable antioxidants in health. En. Watson, R. R., Preedy, V.R. *Bioactive Foods in Promoting Health*.37-58.

Blessington, T., Nzaramba, M.N., Scheuring, D.C., Hale, A.L., Reddivari, L. and Miller, J.C. 2010. Cooking methods and storage treatments of potato: Effects on carotenoids, antioxidant activity, and phenolics. *American Journal of Potato Research*, 87, 479–491.

Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*.181:1199-1200.

Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., Fogliano, V. 2002. Chemical Characterization and Antioxidant Properties of Coffee Melanoidins. *J. Agric. Food Chem*. 50:6527-6533.

Bors, W., Michel, C., Saran, M. 1984. Inhibition of bleaching of the carotenoid crocin, a rapid test for quantifying antioxidant activity. *Biochemical and Biophysical Acta*. 196:312-19.

Boskow D. 2000. *Fring of Foods*. Oxidation, nutrients, and non-nutrient antioxidants, biologically active compounds and high temperatures. CRC Press. USA.

Boskou, D., 2009. Phenolic compounds in olives and olive oil. En: *Olive oil. Minor constituents and health*. Edit. D. Bokouy CRC.

Brand-Williams, W., Cuvellier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol*. 28:25-30.

- Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56:317-333.
- Brenes, M., García. A., Dobarganes, M.C., Velasco, J., Romero, C.N. 2002. Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5962-5967.
- Brown, C. R., Culley, D., Yang, C., Durst, R., & Wrolstad, R. 2005. Variation of anthocyanin and carotenoid contents and associated antioxidant values in potato breeding lines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*130:174–180.
- Brudzynski, K., Miotto, D. 2011. The recognition of high molecular weight melanoidins as the main components responsible for radical-scavenging capacity of unheated and heat-treated Canadian honeys. *Food Chemistry*. 125:570–575.
- Bunea, A., Andjelkovic, M., Socaciu, C., Bobis, O., Neacsu, M., Verhé, R. 2008. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea L.*). *Food Chemistry*. 108:649-656.
- Burlingame, B., Mouille, B., Charrondiere, R. 2009. Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22:494–502.
- Bursal, E., Köksal, E. 2011. Evaluation of reducing power and radical scavenging activities of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria L.*). *Food Research International* 44:2217–2221.
- Cao, G; Sofic, E; Prior, R.L. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 44:3426- 3431.
- Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL. 1998a. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruits and vegetables. *American Journal of Clinical Nutrition*. 68:1081-1087.
- Cao, G; Prior, R.L. 1998. Comparasion of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, 44(6), 1309- 1315.
- C. de Sá, M., Rodríguez-Amaya, D.B. 2004. Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables – comparison of analytical and calculated data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 37–51.
- Capita, E., and Alonso-Calleja, C. 2006. Evaluation of vitamin and mineral intakes and impact of snack foods on Spanish adults. *Nutrition Research*. 26:255– 265.
- Cardozo, M.L., Ordoñez, R.M., Alberto, M.R., Zampini, I.C., Isla, M.I. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activity characterization and genotoxicity evaluation of *Ziziphus mistol* ripe berries, exotic Argentinean fruit. *Food Research International*. 44:2063–2071.
- Caridi, D., Trenerry, V. C., Rochfort, S., Duong, S., Laughler, D. and Jones, R. 2007. Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa L.*) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 105:691–699.

Bibliografía

Carlsen, M.H., Halvorsen, B.L., Holte, K., Bohn, S.K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willett, W.C., Phillips, K.M., Jacobs, D.R., Blomhoff, R. 2010. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutritional Journal*. 9:3.

Carrasco- Pancorbo, A., Cruces-Blanco, C., Segura, A.S. Fernández, G.A. 2004. Sensitive determination of phenolic acids in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6687-6693.

Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T., Fernández-Gutiérrez, A. 2005. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci.* 28:837–858.

Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, M.C., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez. 2006. Rapid quantification of the phenolic fraction of Spanish Virgin olive oils by capillary electrophoresis with uv detection. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7984-7991.

Carrasco-Pancorbo A., Gómez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Cerretani L., Bendini A., Fernández-Gutiérrez A. 2009. Use of capillary electrophoresis with UV detection to compare the phenolic profiles of extra-virgin olive oils belonging to Spanish and Italian PDOs and their relation to sensorial properties. (www.interscience.wiley.com) DOI 10.1002/jsfa.3707.

Casal S., Malheiro, R., Sendas A., Oliveira B.P.P., Pereira J.A. 2010. Olive oil stability under deep-frying conditions. *Food and Chemical Toxicology* 48(10):2972-2979.

Catena, A., Ramos, M.M., Trujillo, H.M. 2003. *Análisis multivariado: un manual para investigadores*. Madrid. Biblioteca Nueva.

Cetinkaya, Y., Gocer, H., Menzek, A., Gulcin, I. 2012. Synthesis and antioxidant properties of (3,4-Dihydroxyphenyl)-(2,3,4-trihydroxyphenyl) methanone and its derivatives. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 345:323–334.

Cerretani L., Bendini, A., Rodríguez-Estrada M.T., Vittadini E., Chiavaro, E. 2009. Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part 1. Effect on chemical oxidative stability indices and phenolic compounds. *Food Chemistry*. 115:1381-1388.

Charoenprasert, S. and Mitchell, A. 2012. Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *J. Agric. Food Chem.* 60, 7081–7095.

Chen C.Y, Milbury PE, Lapsley K, Blumberg JB. 2005. Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J Nutr.* 135:1366-1373.

Chen, X.M. and Kitts, D. D. 2011. Correlating Changes That Occur in Chemical Properties with the Generation of Antioxidant Capacity in Different Sugar-Amino Acid Maillard Reaction Models. *Journal of Food Science*. 76(6):C831-837.

Chiou A. Kalogeropoulos N., Salta F. N., Efstathiou P., Andikopoulos N.K. 2009. Pan-Frying of french fries in three different edible oils enriched with olive leaf extract: Oxidative stability and fate of microconstituents. *Food Science and Technology*. 42:1090-1097.

- Chuah, A.M., Lee, Y.C., Yamaguchi, T., Takamura, H., Yin, L.J., Matoba, T., 2008. Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chem.*, 111:20-28.
- Chuang, C. C. and McIntosh, M. I. 2011. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annu. Rev. Nutr.*31:155-176.
- Chucair, A. J., Rotstein, N. P., Sangiovanni, J. P., During, A., Chew, E.Y., & Politi, L. E. 2007. Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.* 48:5168–5177.
- Cinquanta, L., Esti, M., La Notte, E. 1997. Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74:1259-1264.
- Coni, E., Di Benedetto, R., Di Pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Mattei, R., Carlini, E.A. 2000. Protective Effect of Oleuropein, an Olive Oil biophenol, on Low Density Lipoprotein Oxidizability in Rabbits. *Lipids*, Vol. 35:45-54.
- Consejo Oleícola Internacional 1996. Enciclopedia mundial del olivo. Ed. Plaza & Janés.
- Cook, N. C. and Samman, S. 1996. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry.* 7:66–76.
- Cordano, G., Pezoa, J., Muñoz, E., R., Medina, J., Núñez-Vergara, L.J. Pavani, M., Guerrero, A., Ferreira, J. 2002. Inhibitory effect of vanillin-like compounds on respiration and growth of adenocarcinoma TA3 and its multiresistant variant TA3-MTX-R. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 16:255–263.
- Corral-Aguayo, R. D., Yahia, E.M., Carrillo-López, A., and González-Aguilar, G. 2008. Correlation between Some Nutritional Components and the Total Antioxidant Capacity Measured with Six Different Assays in Eight Horticultural Crops. *J. Agric. Food Chem.*5: 10498–10504.
- Cruz-Rus, E., Amaya, I., and Valpuesta, V. 2012. The challenge of increasing vitamin C content in plant foods. *Biotechnol. J.* 2012, 7, 1110–1121.
- Curtis, J. M., Hahn, We. S., Long, E. K., Burrill, J. S. Arriaga, E. A., Bernlohr, D. A. 2012. Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 23(8):399-406.
- Dag A., Ben-David E., Kerem Z., Ben-Gal A., Erel R., Basheer L., Yermiyahu U. 2009. Olive oil composition as a function of nitrogen, phosphorus and potassium plant nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 89: 1871–1878.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità.* 43(4): 348–361.
- Danesi, F. and Bordoni, A. 2008. Effect of home freezing and Italian style of cooking on antioxidant activity of edible vegetables. *J. Food Sci.* 73: H109-H112.
- Dao, L., and Friedman, M. 1992. Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. *J. Agricultural and Food Chem.*, 40, 2152-2156.

Bibliografía

Das, S. Raychaudhuri, U., Falchi, M., Bertelli, A. Bragac, P. C. Das D. K. 2011. Cardioprotective properties of raw and cooked eggplant. (*Solanum melongena* L). *Food Funct.* 2:395-399.

De Assis, S.A., Rebuglio, J.C.V., Lourenc, O. I. B., Khalil, N.M., Da Silva, K.M.C.L., Martins, A.B.G. and De Faria O.M.M.O. 2009. Antioxidant activity, ascorbic acid and total phenol of exotic fruits occurring in Brazil. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 60(5): 439-448

De Beer, D., Jubert, E., Wentzel, C.A., Gelderblom, C.A., Manley, M. 2003. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 51:902-909.

Deep G, Dhiman M, Rao AR, Kale RK. 2005. Chemopreventive potential of Triphala (a composite Indian drug) on Benzo(a)pyrene induced forestomach tumorigenesis in murine tumor model system. *J Exp Clin Cancer Res.* 24:555-563.

De Grey, A. D. N. J. 2002. HO₂ : The forgotten radical. *DNA Cell Biol.* 21:251–257.

Delmas, D., Lancon, A., Colin, D., Jannin, B., & Latruffe, N. 2006. Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer. *Current Drug Targets.* 7: 423–442.

De Nino, A., Di Donna, L., Mazzotti, F., Muzzalupo, E., Perri, E., Sindona, G., Tagarelli, A. 2005. Absolute method for the assay of Oleuropein in olive oils by atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 77: 5961.

De Nino, A., Di Donna, L., Mazzotti, F., Sajjad, A., Sindona, G., Perri, E., Russo, A., De Napoli, L., Filice, L. 2008. Oleuropein expression in olive oils produced from drupes stoned in a spring pitting apparatus (SPIA). *Food Chem.*106:677-784.

Deusser, H., Guignard, C., Hoffmann, L., Evers, D. 2012. Polyphenol and glycoalkaloid contents in potato cultivars grown in Luxembourg. *Food Chem.* 135:2814-24.

Devanand L. L. 2012. A simplified UV spectral scan method for the estimation of phenolic acids and antioxidant capacity in eggplant pulp extracts. *Journal of Functional Foods.* 4:238–242.

Devaraj, S., Jialal, I. 2005. Failure of vitamin E in clinical trials: is gamma-tocopherol the answer? *Nutr. Rev.* 63:290–293.

Devi RS, Narayan S, Vani G, Shyamala Devi CS. 2007. Gastroprotective effect of Terminalia arjuna bark on diclofenac sodium induced gastric ulcer. *Chem Biol Interact.* 167:71-83.

Dhar, P., Chaudhury, A., Mallik, B., Ghosh, S. 2011. Polyphenol content and in vitro radical scavenging activity of some Indian vegetable extracts. *Food and Feed Chemistry (Section17-10)*

Díaz-Rubio, M.A. Pérez-Jiménez, J., and Saura-Calixto, F. 2009. Dietary fiber and antioxidant capacity in *Fucus vesiculosus* products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 60(S2): 23-34.

Dilis, V. and Trichopoulou, A. 2010. Antioxidant Intakes and Food Sources in Greek Adults. *The Journal of Nutrition.* 1274-1279.

- Dilis, V., and Trichopoulou, A. 2010a. Assessment of antioxidants in foods and biological samples: a short critique. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 61(5):441–448.
- Di Matteo, V., Pierucci, M., Di Giovanni, G., Dragani, L. K., Murzilli, S., Poggi, A., Esposito, E. 2009. Intake of tomato-enriched diet protects from 6-hydroxydopamine-induced degeneration of rat nigral dopaminergic neurons.
- Dini, I., Tenore, G.C., Dini, A. 2010. Antioxidant compound contents and antioxidant activity before and after cooking in sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds. *Food Science and Technology*. 43:447–451.
- Dini I., Tenore, G. C., Dini, A. 2013. Effect of industrial and domestic processing on antioxidant properties of pumpkin pulp. *LWT - Food Science and Technology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.005>
- Divya, P., Puthusseri, B., Neelwarne, B. 2012. Carotenoid content, its stability during drying and the antioxidant activity of commercial coriander (*Coriandrum sativum* L.) varieties. *Food Research International*. 45(1):342-350.
- Dorman, H.J.D., Shikovb, A.N. Pozharitskayab, O.N. and Hiltunen, R. 2011. Antioxidant and prooxidant evaluation of a *Potentilla alba* L. rhizome extract. *Chemistry & Biodiversity*. 8:1344-1356.
- Dudonné S., Vitrac X., Coutière P., Woillez M., Mérillon J.M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem*. 57:1768–1774.
- Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (ETSIA) Universidad Politécnica de Madrid: <http://www1.etsia.upm.es/departamentos/botanica/fichasplantas/tomprod.pdf>. Fecha de consulta 18/07/2012
- Faller, A.L.K., and Fialho, E. 2009. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. *Food Research International*, 42, 210-215.
- Faller, A.L.K., Fialho, E. 2010. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23:561–568.
- FAO. 2006. Fichas técnicas. Productos frescos y procesados. http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/TOMATE.HTM. Fecha de consulta 12/02/2012.
- FAO. 2011. FAOSTAT- Producción Agrícola: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es>
- FDM. 2010. Pirámide de la dieta Mediterránea. Fundación Dieta Mediterránea. Consultado 9 de marzo de 2013. <http://dietamediterranea.com/>
- Fellows, P. 2007. Tecnología del procesamiento de los alimentos. Principios y práctica. Acribia. Zaragoza. España.
- Fennema, O. R. 2000. Química de los Alimentos. Acribia. España.

Bibliografía

Fernández, J., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J. A. 1997. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*. 59:343-53.

Fillion, L., Henry, C.J.K. 1998. Nutrient losses and gains during frying: A review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 49: 157-168.

Finley, J.W., Kong, A., Hintze, K.J., Jeffery, E.H., Ji, L.L. and Lei, X.G. 2011. Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 6837–6846.

Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S.I., Chun O.K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:1043–1048.

Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., and Ritieni, A. 1999a. Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1035-1040.

Fogliano, V., Monti, S. M., Ritieni, A., Gallo, M., Della Medaglia, D., Ambrosino, M. L., Sacchi, R. 1999. Antioxidant activity of virgin olive oil phenolic compounds in a micellar system. *J. Sci. Food Agric.* 37:1458-1465.

Francisco, M., Velasco, P., Moreno, D.A., García-Viguera, C., Cartea, M.E. 2010. Cooking methods of *Brassica rapa* affect the preservation of glucosinolates, phenolics and vitamin C. *Food Research International*. 43:1455–1463.

Franconi, F., Coinu, R., Carta, S., Urgeghe, P.P., Ieri, F., Mulinacci, N., Romani, A. 2006. Antioxidant effect of two virgin olive oils depends on the concentration and composition of minor polar compounds. *J. Agric. Food Chem.* 54:3121-3125.

Fregapane, G., Gómez-Rico, A., Inarejos, A.M., Desamparados, S. M. 2013. Relevance of minor components stability in commercial olive oil quality during the market period. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 115(5):541–548.

Friedman, M. 1996. Food browning and its prevention: An overview. *J. Agric. Food Chem.* 44: 631–653.

Friedman, M. 2006. Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.* 54:8655–8681.

Frossard, E., Bucher, M., Machler, F., Mozafar, A., Hurrell, R., 2000. Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 861–879.

Gahler, A., Otto, K., Bohm, V. 2003, Alterations of Vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. *J. Agric. Food Chem.* 51:7962-7968.

Gambacorta, M. G., Faccia, M.A., Previtali, S., Pati, E. La Notte, and Baiano., A.2010. Effects of Olive Maturity and Stoning on Quality Indices and Antioxidant Content of Extra Virgin Oils (cv. *Coratina*) during Storage. *Journal of Food Science*. 75(3).

- García-Parrilla, M.C., 2008. Antioxidantes en la dieta Mediterránea. *Nutrición Clínica en Medicina*. 2(3):129-140.
- Gardner, P. T., White, T. A. C., McPhail, D. B., Duthie, G. G. 2000. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*. 68: 471–474.
- Gendron, M.E., Théorêt, J.F., Mamarbachi, A.M., Drouin, A., Nguyen, A., Bolduc, V., Thorin-Trescases, N., Merhi, Y., and Thorin, E. 2010. Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H2062–H2070.
- Gil, H. A., Fontecha, A. J., Juárez, I. M. 2010. Influencia de los procesos tecnológicos sobre el valor nutritivo de los alimentos. En: Gil A (editor). *Tratado de Nutrición. Tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España.
- Gill, C. I.R., Yumi, Z.H., Hashim Y., Servili M. and Rowland I.R. 2010. Olive Oil and its Phenolic Components and their Effects on Early- and Late-stage Events in Carcinogenesis. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*.
- Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., Pelliccia, G., Luzi, L., Minucci, S., Marcaccio, M., Pinton, P., Rizzuto, R., Bernardi, P., Paolucci, F., Pelicci, P. G. 2005. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122:221–233.
- Giriwono, P.E., Hashimoto, T., Ohsaki, Y., Shirakawa, H., Hokazono, H. and Komai, M. 2010. Extract of fermented barley attenuates chronic alcohol induced liver damage by increasing antioxidative activities. *Food Research International*. 43:118–124,
- Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*. 14:217–225.
- Gökmen, V., Serpen A., Fogliano V. 2009. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends in Food Science & Technology* 20:278-288.
- Gohil, K., Vihas, Vasu, T. and Cross, C.E. 2010. Dietary α -tocopherol and neuromuscular health: Search for optimal dose and molecular mechanisms continue. *Mol. Nutr. Food Res*. 54:693–709.
- Gómez-Alonso, S., Desamparados, S., M. and Fregapane, G. 2002. Phenolic Compounds Profile of Cornicabra Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem*. 50:6812-6817.
- Gómez-Alonso, S., Fregapane, G., M., Desamparados, S., Gordon, M.H. 2003. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying. *J. Agric. Food Chem*. 51:667-672.
- Gómez-Romero, M.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. 2007. Analytical determination of antioxidants in tomato: Typical components of the Mediterranean diet. *J. Sep. Sci*. 30, 452 – 461.
- Gonchar, O and Mankovska I. 2010. Antioxidant system in adaptation to intermittent hypoxia. *Journal of Biological Sciences*. 10(6):545-554.

Bibliografía

Gonçalves, E. M., Pinheiro, J., Abreu, M., Brandão, T. R. S., & Silva, C. L. M. 2007. Modelling the kinetics of peroxidase inactivation, colour and texture changes of pumpkin (*Cucurbita maxima* L.) during blanching. *Journal of Food Engineering*. 81:693-701.

Goñi, I., Díaz-Rubio, M.E., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. 2009. Towards an updated methodology for measurement of dietary fiber, including associated polyphenols, in food and beverages. *Food Research International*. 42:840–846.

Gorinstein S., Jastrzebski, Z., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Najman, K., Park, Y.S., Heo f, B.H. Cho, Y.H., Bae, J.H. 2009. Comparative control of the bioactivity of some frequently consumed vegetables subjected to different processing conditions. *Food Control*. 20: 407–413.

Grace C. 2005. Phenolics as antioxidants. En: antioxidants and reactive oxygen species in plants. Nicholas S. Blackwell Publishing. United Kingdom. 141-159.

Guinéa, R. P.F., Pinhob, S., Barroca, M.J. 2011. Study of the convective drying of pumpkin (*Cucurbita maxima*). *Food and bioproducts processing*. 89:422–428.

Gulcin, I. 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 23(6):871-876.

Gulcin, I. 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11:210–218.

Gulpinar, A.R., Orhan, I. E., Kan, A., Senol, F. S., Celik, S. A., Kartal, M. 2012. Estimation of in vitro neuroprotective properties and quantification of rutin and fatty acids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in Turkey. *Food Research International*. 46:536–543.

Gutiérrez, R. and González, A. 1991. Estadística multivariada. Facultad de Ciencias. Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía. Granada.

Gutiérrez-Rosales, F., Ríos, J. J. and Gómez-Rey, M. L. 2003. Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem*. 51:6021-6025.

Hagerman, A. E. 2002. Tannin Handbook, Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University, USA.

Haiyan Zhong, Danny T. Bedgood Jr., Andrea G. Bishop, Paul D. Prenzler, Kevin Robards. 2007. Endogenous biophenol, fatty acid and volatile profiles of selected oils. *Food Chemistry*.100:1544-1551.

Hall, C. A.; Hobby, T.; Cipollini, 2006. M. Efficacy and mechanisms of solasonine- and solamargine-induced cytotoxicity on two strains of *Trypanosoma cruzii*. *J. Chem. Ecol*. 32:2405–2416.

Hallmann, E., Lipowski, J., Marszałek, K., Rembiałkowska, E. 2013. The Seasonal Variation in Bioactive Compounds Content in Juice from Organic and Non-organic Tomatoes. *Plant Foods Hum Nutr*. 68:171–176.

Hanson, P.M., Yang, R.Y., Tsou, S.C.S., Ledesma, L., Engle, L. and Lee, T.C. 2006. Diversity in eggplant (*Solanum melongena*) for superoxide scavenging activity, total phenolics, and ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19:594–600.

Harborne, J. B., Baxter, H., & Moss, G. P. 1999. *Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants* (2nd ed.). London: Taylor and Francis.

Haque, R., Chun, E., Howell, J. C. Sengupta, T., Chen, D., Kim, H. 2012. MicroRNA-30b-mediated regulation of catalase expression in human ARPE-19 cells. *PLoS One*. 7(8):e 425-42.

Hartmann A, Patz CD, Andlauer W, Dietrich H, Ludwig M. 2008. Influence of processing on quality parameters of strawberries. *J Agric Food Chem*. 56:9484-9489.

Helmja, K., Vaher, M., Pussa, T., Raudsepp, P., Kaljurand, M. 2008. Evaluation of antioxidative capability of the tomato (*Solanum lycopersicum*) skin constituents by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis*, 29, 3980–3988.

Hernández-García, d., Wood, C.D., Castro-Obregón, S., Covarrubias, L. 2010. Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radical Biology & Medicine*. 49:130–143.

Hernández-Herrero, J. A. and Frutos, M.J. 2011. Degradation kinetics of pigment, colour and stability of the antioxidant capacity in juice model systems from six anthocyanin sources. *International Journal of Food Science and Technology*. 46:2550–2557.

Hongsprabhas, P., Kerdchouay, P., Sakulsom, P. 2011. Lowering the Maillard reaction products (MRPs) in heated whey protein products and their cytotoxicity in human cell models by whey protein hydrolysate. *Food Research International*. 44:748–754.

Houston, M.C. 2010. The role of cellular micronutrient analysis, nutraceuticals, vitamins, antioxidants and minerals in the prevention and treatment of hypertension and cardiovascular disease.

Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem*. 53:1841-1856.

Hung, P. V.; Duy, T. L. 2012. Effects of drying methods on bioactive compounds of vegetables and correlation between bioactive compounds and their antioxidants *International Food Research Journal*. 19(1):327-332.

Ignat, I., Volf, I. and Popa, V.I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126:1821–1835.

Inglett, G. E., Chen, D., Berhow, M., Lee, S. 2011. Antioxidant activity of commercial buckwheat flours and their free and bound phenolic compositions. *Food Chemistry*. 125:923–929.

International Journal of Food Science and Technology. 43(2): 316-321.

Issaoui, M., Flamini, G., Brahmi, F., Dabbou, S., Hassine, K.B., Taamali, A., Chehab, H., Ellouz, M., Zarrouk, M., Hammamia, M., 2010. Effect of the growing area conditions on differentiation between Chemlali and Chétoui olive oils. *Food Chemistry*. 119:220–225.

Bibliografía

Ismail A, Lee W. 2004. Influence of cooking practice on antioxidant properties and phenolic content of selected vegetables. *Asia Pac J Clin Nutr.* 13:S162.

Iwanzik, W., Tevini, M., Stute, R., & Hilbert, R. 1983. Carotinoidgehalt und -zusammensetzung verschiedener deutscher Kartoffelsorten und deren Bedeutung für die Fleischfarbe der Knolle. *Potato Research.* 26:149–162.

Jabs, J., Devine, C. M., Bisogni, C. A., Farrell, T.J., Jastran, M., Wethington, E. 2007. Trying to Find the Quickest Way: Employed Mothers' Constructions of Time for Food. *J Nutr Educ Behav.* 39:18–25.

Jacobsen, C., Let, M.B., Nielsen, N.S., Meyer, A. 2008. Antioxidant strategies for preventing oxidative flavour deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: a comparative evaluation. *Trends Food Sci Technol* 19:76–93.

Jacomellia, M., Pitozzia, V., Zaida, M., Larrosaa, M., Toninib, G., Martinic, A., Urbanid, S., Taticchid, S., Servilid, M., Dolaraa, P., Giovannellia, L. 2010. Dietary extra-virgin olive oil rich in phenolic antioxidants and the aging process: long-term effects in the rat. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 21:290–296.

Jadhav. S.J. y Kadam S.S. 2003. La patata. En *Tratado de ciencia y tecnología de las hortalizas.* Ed. D.K. Salunkhe y S.S. Kadam. Acribia.

Jaeger, L.M., Barros, P. G., Oliveira, R.L.G., Pacheco, S., Fernandes, P.H., Viana, J.L., Regini, M., Lima, A.C., Rodrigues, A. V., Ramalho, S.R. 2012. Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Research International.* 47:337–340.

Jagtapa, U.B., Waghmare S.R., Lokhande, V.H., Suprasanna, P., Bapata V.A. 2011. Preparation and evaluation of antioxidant capacity of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) wine and its protective role against radiation induced DNA damage. *Industrial Crops and Products.* 34:1595–1601.

Javaherashiti, M., Ghasemnezhad, M., Lahiji, H.S. and Shiri, M.A. 2012. Comparison Of Nutritional Value And Antioxidant Compounds Of Some Winter Pumpkin (*Cucurbita Sp*) Species Fruits In Iran. *Advances in Environmental Biology,* 6(10): 2611-2616.

Ji, L.; Wu, J.; Gao, W.; Wei, J.; Yang, J.; and Guo. Ch. 2011. Antioxidant capacity of different fractions of vegetables and correlation with the contents of ascorbic acid, phenolics, and flavonoids. *Journal of Food Science.* 76(9):1257-1261.

Jing, H. and Kitts, D.D. 2000. Comparison of the antioxidative and cytotoxic properties of glucose-lysine and fructose-lysine Maillard reaction products. *Food Research International.* 33:509-516.

Jin-Wei L., Shao-dong D., Xiao-Lin D. 2005. Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. *Process Biochemistry.* 40:3607–3613.

Jones, P. G.; Fenwick, G. R. 2006. The glycoalkaloid content of some edible solanaceous fruits and potato products. *J. Sci. Food Agric.* 32: 419–421.

- Joon-Kwan, M. and Shibamoto, T. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* 57:1655–1666.
- Joong-Keun, J., Seung-Un, L., Nobuyuki, K., Levin, C.E., Friedman, M. 2011. Distribution of phenolic compounds and antioxidative activities in parts of sweet potato (*Ipomoea batata* L.) plants and in home processed roots. *Journal of Food Composition and Analysis.* 24:29–37.
- Kaisoon, O., Siriamornpun, S., Weerapreeyakul, N., Meeso, N. 2011. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. *Journal Of Functional Foods.* 3:88–99.
- Kähkönen M.P., Hopia A. I., Vuorela H.J., Jussi-Pekka R., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47:3954-3962.
- Kalogeropoulos, N., Mylona, A., Chiou, A., Ioannou, M.S. Andrikopoulos, N.K. 2007. Retention and distribution of natural antioxidants (α -tocopherol, polyphenols and terpenic acids) after shallow frying of vegetables in virgin olive oil. *LWT.* 40:1008–1017.
- Kalt, W. 2005. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science.* 70(1):R11–19.
- Kaneyuki, T., Noda, Y., Traber, M.G., Mori, A., Packer, L. 1999. Superoxide anion and hydroxyl radical scavenging activities of vegetable extracts measured using electron spin resonance. *Biochemistry and Molecular Biology International.* 47, 979–989.
- Kang, J. H., Cook, N. R., Manson, J. E., Buring, J. E., Christine M. a., Grodstein, F. 2009. Vitamin E, Vitamin C, Beta Carotene, and Cognitive Function Among Women With or at Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation.* 119 (21):2772-2780.
- Kantar Worldpanel. 2012. La segmentación de estilos de cocina en España. “Un nuevo enfoque para el sector agroalimentario”. http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/Presentaci%C3%B3n_SegmentacionCocineras_Entregar_tcm7-223787.pdf
- Kerio, L.C., Wachira, F.N., Wanyoko, J.K., Rotich, M.K. 2013. Total polyphenols, catechin profiles and antioxidant activity of tea products from purple leaf coloured tea cultivars. *Food Chemistry* 136:1405–1413.
- Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M.T., Rupasinghe, H.P.V. 2008. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *J. Food Comp. Anal.* 21:396–401.
- Kim, Y.N.; Giraud, D.W.; Driskell, J.A. 2007. Tocopherol and carotenoid contents of selected Korean fruits and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis.* Volume 20, Issue 6: 458-465.
- Kim, M.Y., Seguin, P., Ahn, J.K. et al. 2008. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7265–7270.

Bibliografia

Kita A., Lisinska G., Gołubowska G. 2007. The effects of oils and frying temperatures on the texture and fat content of potato crisps. *Food Chemistry*. 102:1–5.

Klejdus, B., Vacek, J., Benešova, L., Kopecky, J., Lapcik, O., & Kuban, V. 2007. Rapid resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389:2277–2285.

Konczak, I. and Zhang, W. 2004. Anthocyanins—more than nature colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 5:239–240.

Koşar M., Dorman H.J.D., Hiltunen R. 2005. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry*. 91:525–533.

Kostálova, Z., Hromádková, Z., Ebringerová, A. 2012. Structural diversity of pectins isolated from the Styrian oil-pumpkin (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) fruit. *Carbohydrate Polymers*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.017>

Kostálova, Z., Hromádková, Z., Ebringerová, A., Polovka, M., Michaelsen, T.E. Paulsen, B.S. 2013. Polysaccharides from the Styrian oil-pumpkin with antioxidant and complement-fixing activity. *Industrial Crops and Products*. 41:127–133.

Kouris-Blazos A, Gnardellis C, Wahlqvist ML, et al. 1999 Are the advantages of the Mediterranean diet transferable to other populations? A cohort study in Melbourne, Australia. *Br. J. Nutr.* 82:57–61.

Krichene, D., Allalout, A., Mancebo-Campos, V., Salvador, M.D., Zarrouk, M., Fregapane, G. 2010. Stability of virgin olive oil and behaviour of its natural antioxidants under medium temperature accelerated storage conditions. *Food Chemistry*. 121:171–177.

Kubo, K., Arai, K., Yoshimura, Y. 2008. Spectrophotometric determination of free radicals and reactive oxygen species with N,N-dimethyl-p-phenylenediamine. *Bunsekikagaku*. 57: 8:667-671.

Kumar, S.A., Sudhakar, V., Varalakshmi, P., 2006. Protective role of eicosapentaenoate–lipoate (EPA–LA) derivative in combating oxidative hepatocellular injury in hypercholesterolemic atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 189:115–122.

Kunradi, F.G. V., Da Silva G. C. B., Copetti, C., Faria, P. D. P., Da Costa, E. N., Fett, R. 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of the apple flesh and peel of eleven cultivars grown in Brazil *Scientia Horticulturae*. 128:261–266.

Kurz, C., Carle, R., Schieber, A. 2008. HPLC-DAD-MSn characterisation of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chemistry*. 110: 522–530.

Lacroix, M. and Bishop, M. R. 2010. Polyphenols in cocoa: influence of processes on their composition and biological activities. *Chocolate, Fast Foods and Sweeteners*. 183-197.

Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*. 46:244–282.

- Lana, M.M., Tijssens, L.M.M. 2006. Effects of cutting and maturity on antioxidant activity of fresh-cut tomatoes. *Food Chemistry* 97:203–211.
- Landbo, A.K. and Meyer, A.S. 2001. Ascorbic acid improves the antioxidant activity of European grape juices by improving the juice's ability to inhibit lipid peroxidation of human LDL *in vitro*. *Int. J. Food Sci. Technol.* 36:727–36.
- Lapornik, B., Prosek, M. and Golc, Wondra. A. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering.* 71, 214–222.
- Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem.* 51:7292-7295.
- Leonard, S. S., Harris, G. K., and Shi, X. 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 37:1921–1942.
- Leonarduzzi, G., Sottero, B., Poli, G. 2010. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: The antioxidant concept revisited. *Pharmacology & Therapeutics* 128: 336–374.
- Leow, S.S., Sekaran, S.D., Sundram, K., Tan, Y.A., and Sambanthamurthi, R., 2011. Differential transcriptomic profiles affected by oil palm phenolics indicate novel health outcomes. *Genomics.* 12:432.
- Lerma-García, M.J., Simo-Alfonso, E.F., Chiavaro, E., Bendini, A., Lercker, G., Cerretani, L. 2009. Study of chemical changes produced in virgin olive oils with different phenolic contents during an accelerated storage treatment. *J. Agric. Food Chem.* 57:7834-7840.
- Lewis, C., Walker, J., Lancaster, J., Sutton, K. 1998. Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: Coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. *J. Sci. Food Agric.* 77:45-57.
- Li, H., Tsao, R., Liu, R., Loewen, S. 2011. Ultra-performance liquid chromatographic separation of geometric isomers of carotenoids, polyphenols and antioxidant activities of 20 tomato cultivars and breeding lines. Abstracts of Papers, 241st ACS National Meeting & Exposition, Anaheim, CA, United States, March 27-31, 2011, AGFD-202.
- Li, F., Bo-Tao, X., Xiang-Rong, X., Ren-You, G., Yuan, Z., En-Qin, X., Hua-Bin, L. 2011. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry.* 129:345–350.
- Li, H.; Deng, Z.; Zhu, H.; Hu, Ch.; Liu, R.; Young J. C.; Tsao, R. 2012. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. *Food Research International* 46:250–259.
- Liang, C. H., Shiu, L. Y., Chang, L. C., Sheu, H. M., Tsai, E. M., & Kuo, K. W. 2008. Solamargine enhances HER2 expression and increases the susceptibility of human lung cancer H661 and H69 cells to trastuzumab and epirubicin. *Chem. Res. Toxicol.* 21:393–399.
- Lindsay, D.G., Astley, S.B. 2002. European research on the functional effects of dietary antioxidants - EUROFEDA. *Mol Aspects Med.* 23:39-100.

Bibliografía

Lisiewska Z. Gebczynski P., Vernas E., Kmiecik W. 2009. Retention of mineral constituents in frozen leafy vegetables prepared for consumption. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22:218-223.

Liu, Q., Cai, W. and Shao, X. 2008. Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta*. 77:679–683.

Loizzo, M., Di Lecce, G., Boselli, E., Menichini, F., Frega, N. 2012. Radical scavenging, total antioxidant capacity, and antiproliferative activity of phenolic extracts from extra virgin olive oil by cultivar 'Frantoio. *International Journal of Food Properties*. 15:1345–1357.

López, M., et al. 2003, Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method. *Talanta*. 60:609-16.

López-Berenguer, C., Carvajal, M., Moreno, D. A., García-Viguera, C. 2007. Effects of microwave cooking conditions on bioactive compounds present in broccoli inflorescences. *J. Agric. Food Chem*. 55:10001–10007.

Lo Scalzo, R., Fibiani, M., Mennella, G., Rotino, G.L. Dal Sasso, M., Culici, M., Spallino, A., Braga, P.C. 2010. Thermal treatment of eggplant (*Solanum melongena* L.) Increases the antioxidant content and the inhibitory effect on human neutrophil burst. *J. Agric. Food Chem*. 58, 3371–3379.

Lozano-Sánchez, J., Cerretani, L., Bendini, A., Gallina-Toschi, T., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. 2012. New filtration systems for extra-virgin olive oil: effect on antioxidant compounds, oxidative stability, and physicochemical and sensory properties. *J. Agric. Food Chem*. 60:3754–3762.

Ludwig, I.A., Sanchez, L., Caemmerer, B., Kroh, L.W. Peña, M.P., Cid, C.. 2012. Extraction of coffee antioxidants: Impact of brewing time and method. *Food Research International*. 48:57–64.

Luthria, D. L. 2012. A simplified UV spectral scan method for the estimation of phenolic acids and antioxidant capacity in eggplant pulp extracts. *Journal of Functional Foods*. 4:238–242.

Lutz, M., Henríquez, C., Escobar M. 2011. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:49–54.

Ma, Ch., Dastmalchi, K., Whitaker, B.D. and Kennelly, E. J. 2011. Two New Antioxidant Malonated Caffeoylquinic Acid Isomers in Fruits of Wild Eggplant Relatives. *J. Agric. Food Chem*. 59:9645–9651.

Maatta-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Torronen AR. 2004. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *J Agric Food Chem*. 52:6178-6187.

Macua, J. I.; Lahoz, I.; Santos, A.; Calvillo, S. 2011. *Tomate de Industria 2010*. Navarra Agraria <http://www.navarraagraria.com/n184/artoma11.pdf> Fecha de consulta 03/08/2012.

Macheix, J.J., Fleuriet, A., and Billot, J., 1990. *Fruit Phenolics*, CRC Press, Boca Raton, FL.

- Maggio R.M., Kaufman T.S., Del Carlo M., Cerretani L., Bendini A., Cichelli A., Compagnone D. 2009. Monitoring of fatty acid composition in virgin olive oil by Fourier transformed infrared spectroscopy coupled with partial least squares. *Food Chemistry*. 114:1549–1554.
- Maisuthisakul, P., Pongsawatmanit, R., Gordon, M.H. 2007. Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from Teaw (*Cratoxylum formosum* Dyer). *Food Chemistry*. 100:1620–1629.
- Makni, M., Fetoui, H., Gargouri, N.K., Garoui, E. M., Jaber, H., Makni, J., Boudawara, T., Zeghal, N. 2008. Hypolipidemic and hepatoprotective effects of flax and pumpkin seed mixture rich in ω -3 and ω -6 fatty acids in hypercholesterolemic rats. *Food and Chemical Toxicology*. 46:3714–3720.
- Makris, D.P., Rossiter, J.T. 2000. Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-Orhamnosylglucoside) in aqueous model systems. *J. Agric. Food Chem.* 48:3830–3838.
- Manna P, Sinha M, Sil PC. 2007. Phytomedicinal activity of *Terminalia arjuna* against carbon tetrachloride induced cardiac oxidative stress. *Pathophysiology*. 14:71-78.
- Manach, C., Scalbert A., Morand C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 727–47.
- Mandl, J., Szarka, A., and Bánhegyi, G. 2009. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British Journal of Pharmacology*. 157:1097–1110.
- MAPA, 2011. El consumo alimentario en España. Año 2011. http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/EL_CONSUMO_ALIMENTARIO_EN_ESPA%C3%91A_2011_tcm7-197862.pdf.
- MAPA, 2011a. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2011. Anuario de estadística 2011 (Datos 2010 y 2011): http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2011/AE_2011_13.pdf
- Marcano, J., La Rosa, Y., Salinas, N. 2010. Influencia del proceso de fritura en profundidad sobre el perfil lipídico de la grasa contenida en patatas tipo “french”, empleando oleina de palma. *Grasas y Aceites*. 61(1):24-29.
- Martínez, A. J. R., Izquierdo, P. M. s/f. La capacidad antioxidante de la dieta española. Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación. Monografía.
- Martínez-González, M. A., Fernández-Jarne, E., Martínez-Losa, E. Prado-Santamaria, M., Brugarolas-Brufay, C., and Serrano-Martínez, M. 2002. Role of fibre and fruit in the Mediterranean diet to protect against myocardial infarction: a case-control study in Spain. *European Journal of Clinical and Nutrition*. 56:715–722.
- Martínez, S.L., Mauro, M., Alvarez. G., 2000. Análisis exploratorio multivariado: Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Sociales, Santiago (Chile). http://bencore.ugr.es/iii/encore/record/C_Rb2083416_Sanalis+multivariado_P0%2C13_Orightresult_X2?lang=spi&suite=pearl

Bibliografía

Martínez-Alvarez, J.R., Arpe-Muñoz, C., Iglesias-Rosado, C., Pinto-Fontanillo, J.A., Villarino-Marín, A., Castro-Alija, M.J., Cao-Torija, M.J., Urrialde-de Andrés, R., Gómez- Candela, C., López-Nomdedeu, C. 2010. La nueva rueda de los alimentos. Sociedad española de dietética y ciencias de la alimentación (SEDCA). Consultado el 18 de marzo de 2013. www@nutrición.org

Martínez-Hernández, G. Benito., Artés-Hernández, F., Gómez, P. A., Artés, F. 2013. Quality changes after vacuum-based and conventional industrial cooking of kailan-hybrid broccoli throughout retail cold storage. *LWT - Food Science and Technology*. 50:707-714.

Mataix V. J. y Barbancho C. F.J. 2008. El aceite de oliva, alma del Mediterráneo. Instituto de Estudios Giennenses-Universidad de Jaén. España. 437pp.

Matés, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J. Márquez, J. 2012. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Arch Toxicol*. DOI 10.1007/s00204-012-0906-3.

Matilda, P. and Hellstrom, J. 2007. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20:152–160.

McDougall G. J., Dobson, P., Jordan-Mahy, N. 2010. Effect of different cooking regimes on rhubarb polyphenols. *Food Chemistry*. 119:758–764.

Mc Gee, H. 2004. On food and Cooking. The Science and Lore of kitchen. Scribner. New York USA. 881p.

Medina, I., Sacchi, R., Biondi, L., Aubourg, S.P., Paolillo, L. 1998. Effect of packing media on the oxidation of canned tuna lipids. Antioxidant effectiveness of extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem*. 46: 1150-1157.

Mennella, G.; Rotino, G.L.; Fibiani, M.; D'alessandro, A.; Francese, G.; Toppino, L.; Cavallanti, F.; Acciarri, N. And Lo Scalzo, R. 2010. Characterization of Health-Related Compounds in Eggplant (*Solanum melongena* L.) Lines Derived from Introgression of Allied Species. *J. Agric. Food Chem*. 58:7597–7603.

Mennella, G., Lo Scalzo, E., Fibiani, M., D'Alessandro, A., Francese, G., Toppino, L., Acciarri, N., de Almeida, A.E. and Rotino, G. L. 2012. Chemical and Bioactive Quality Traits During Fruit Ripening in Eggplant (*S. melongena* L.) and Allied Species. *J. Agric. Food Chem*. 60: 11821–11831.

Mian, N. R., Muhammad, A. and Rashida, Ali. 2009. Stability of vitamins during extrusion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49:361–368.

Miglio, C., Chiavaro, E. Visconti, A., Fogliano, V., Pellegrini, N. 2008, effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *J. Agric. Food Chem*. 56:139–147.

Miller, J. N., Rice-Evans, C. A., Davies, M. J., Gopinathan, V. Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci*. 84:407-412.

Miller, J. N., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., Rice-Evans, C. A. 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett*. 384:240-242.

- Miller, J. N., Rice-Evans, C. A. 1997. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Res.* 26, 195-199.
- Miyazawa, T., Shibata, A., Sookwong, P., Kawakami, Y., Eitsuka, T., Asai, A., Oikawa, S. Nakagaw, K. 2009. Antiangiogenic and anticancer potential of unsaturated vitamin E (tocotrienol). *Journal of Nutritional Biochemistry.* 20: 79–86.
- Mohammed A.E., Smit, A.I. Pawelzik, E., Keutgenb A.J. and Horneburg, V. 2011. Organically grown tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): bioactive compounds in the fruit and infection with *Phytophthora infestans*. *J Sci Food Agric.* 92: 1424–1431.
- Molina-Montes, E., Sánchez-Cantalejo E., Martínez, C., Contreras, J.M., Molina E., and Sánchez, M.J. 2012. Compliance with dietary and nutrient recommendations in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Granada cohort at recruitment. *Nutr Hosp.* 27(2):572-582.
- Morelló, J., Motilva, M., Tovar, M., Romero, M., 2004. Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chem.* 85, 357–364.
- Morris, W.L., Ducreux L., Griffiths, D., Stewart, D., Davies, H.V., Taylor, M. 2004. Carotenogenesis during tuber development and storage in potato. *J. Exp. Bot.* 399:975-982.
- Mulinacci, N., Prucher, D., Peruzzi, M., Romani, A., Pinelli, P., Giaccherini, C., Vincieri, F.F. 2004. Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 34:349–357.
- Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H., and Matoba, T. 2004. Effects of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. *Journal of Food Science.* 69: FCT7-FCT10.
- Murcia, M.A., Jiménez-Monreal, A.M., García-Diz, L., Carmona, M., Maggi, L., Martínez-Tomé, M. 2009. Antioxidant activity of minimally processed (in modified atmospheres), dehydrated and ready-to-eat vegetables. *Food and Chemical Toxicology.* 47:2103–2110.
- Murphy, R.R., Renfro M.H., Brevard, P.B., Lee, R.E., and Gloeckner., J.W. 2009. Cooking does not decrease hydrophilic antioxidant capacity of wild blueberries. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 60(S2): 88-98.
- Muthuraman, A., Sood, S., Singla, S.K. 2011. The antiinflammatory potential of phenolic compounds from *Emblca officinalis* L. in rat. *Inflammopharmacol.* 19:327–334.
- Myhrvold, N., Young C., Bilet, M. *Modernisti cuisine. The art and science of cooking. Volume 2. Techniques and Equipment. The cooking lab.* Bellevue.
- Nacz, M., Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A,* 1054: 95–111.
- Nacz M., Shahidi F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 41:1523–1542.

Bibliografía

Nagai T., Inoue R., Inoue H., Suzuki N. 2002. Scavenging capacities of pollen extracts from *Cistus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and DPPH radicals. *Nutrition Research*. 22:519–526.

Namitha, K.K. and Negi, P.S. 2010. Chemistry and Biotechnology of Carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 50:728–760.

Nantitanon, W., Yotsawimonwat, S., Okonogi, S. 2010. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *Food Science and Technology*. 43:1095-1103.

Natella, F., Belevi, F., Ramberti A., Scaccini, C. 2010. Microwave and traditional cooking methods: effect of cooking on antioxidant capacity and phenolic compounds content of seven vegetables. *Journal of Food Biochemistry*. 34:796–810.

Navarre, D.A., Goyer, A., Shakya, R. 2009. Nutritional Value of Potatoes: Vitamin, Phytonutrient, and Mineral Content. *Advances in Potato Chemistry and Technology*. 395 -424.

Navarre, D. A., Shakya, R., Holden, J., Kumar, S. 2010. The effect of different cooking methods on phenolics and vitamin C in developmentally young potato tubers. *American Journal of Potato Research*. 87:350-359.

Navarre, D. A., Pillai, S. S., Shakya, R., & Holden, M. J. 2011. HPLC profiling of phenolics in diverse potato genotypes. *Food Chemistry*. 127:34–41.

Navarrete, L. P., Pérez, P., Morales, I., Maccioni, R., Novel, B. 2011. Drugs affecting tau behavior in the treatment of Alzheimer's disease and tauopathies. *Current Alzheimer Research*. 8 (6):678-685.

Navarro-González, I., García-Valverde, V., García-Alonso, J. and Periago, M.J. 2011. Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Research International*. 44:1528–1535.

Navindra, P.S., Susanne, M. H., Yantao, N., Rupo, L., David, H. 2006. Pistachio skin phenolics: Identification, antioxidant capacities and their use as markers of bleaching. Abstracts of Papers, 231st ACS National Meeting, Atlanta, GA, United States, March 26-30.

Nenadis, N., Tsikouras, I., Xenikakis, P., Tsimidou, M.Z. 2013. Fourier transform mid-infrared spectroscopy evaluation of early stages of virgin olive oil autoxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 115(5):526–534.

Netzel, M., Netzel, G., Tian, Q., Schwartz, S., and Konczak, I. 2007. Native Australian fruits—a novel source of antioxidants for food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 339–346.

Nguyen, T. H., Nagasaka, R., Ohshima, T. 2012. Effects of extraction solvents, cooking procedures and storage conditions on the contents of ergothioneine and phenolic compounds and antioxidative capacity of the cultivated mushroom *Flammulina velutipes*. *International Journal of Food Science and Technology*. 47:1193–1205.

Nicoli, M.C., Anese, M. y Parpinel, M. 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*. 10:94-100.

- Niseteo, T., Komes, D., Belščák-Cvitanovic, A., Horzic, D., Budec, M. 2012. Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chemistry*. 134:1870–1877.
- Nisha, P.; Abdul N. P.; Jayamurthy, P. 2009. A comparative study on antioxidant activities of different varieties of *Solanum melongena*. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 2640–2644.
- Oboh, G., Raddatz, H., Henle, T. 2008. Antioxidant properties of polar and non-polar extracts of some tropical green leafy vegetables. *J. Sci. Food Agric*. 88:2486–2492.
- Obulesu, M., Rao, D. M., Bramhachari, P. V. 2011. Carotenoids and Alzheimer's Disease: An insight into therapeutic role of retinoids in animal models. *Neurochemistry International*. 59 (5):535-541.
- Odriozola-Serrano, I., Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., Martin-Belloso, O. 2009a. Effect of high-oxygen atmospheres on the antioxidant potential of fresh-cut tomatoes. *J. Agric. Food Chem*. 57:6603–6610.
- Odriozola-Serrano, I.; Soliva-Fortuny, R.; Hern_andez-Jover, T.; Martin-Belloso, O. 2009b. Carotenoid. and phenolic profile of tomato juices processed by high intensity pulsed electric fields compared with conventional thermal treatments. *Food Chem*. 2009b. 112:258–266.
- Oliveira, A., Pintado, M., Almeida, D.P.F. 2012. Phytochemical composition and antioxidant activity of peach as affected by pasteurization and storage duration. *LWT - Food Science and Technology*. 49:202-207.
- Oloyede, F.M., Agbaje, G.O., Obuotor, E.M., Obisesan, I.O. 2012. Nutritional and antioxidant profiles of pumpkin (*Cucurbita pepo* Linn.) immature and mature fruits as influenced by NPK fertilizer. *Food Chemistry*. 135:460–463.
- Ordóñez, J.A., Cambero, M. I., Fernández, L., García, M. L., García, F. G., De la Hoz, L., Selgas, M. D. 1998. *Tecnología de los Alimentos*. En Vol. I. Componentes de los alimentos y procesos. Síntesis. Madrid. España.
- Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO). Fichas técnicas. Productos frescos y procesados, 2006. http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/TOMATE.HTM. Fecha de consulta 8/02/2013.
- Oviasogie, P.O., Okoro, D., Ndiokwere, C. L. 2009. Determination of total phenolic amount of some edible fruits and vegetables. *African Journal of Biotechnology*. 8:2819-2820.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:3122-3128.
- Ozgen, S., Sekerci, S., Korkut, R. and T. Karabiyyi. 2012. The Tomato Debate: Postharvest-ripened or Vine Ripe Has More Antioxidant? *Hort. Environ. Biotechnol*. 53(4):271-276.

Bibliografía

Padda, M. S. Picha, D. H. 2008. Phenolic composition and antioxidant capacity of different heat-processed forms of sweetpotato cv. 'Beauregard'. *International Journal of Food Science and Technology*. 43:1404–1409.

Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M.L., Vigna-Pérez, M., Hernández-Pérez, T. 2010. Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life—A Review. *Plant foods Hum Nutr*. 65:299–308.

Parveen, I., Threadgill, M.D., Moorby, J.M., Winters, A. 2010. Oxidative phenols in forage crops containing polyphenol oxidase enzymes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 1371-1382.

Pasini, F., Cerretani, L., Bendini, A., Rossi, A., Caboni, M. F. 2009. Evaluation of different storage temperature on the shelf-life of extra virgin olive oils. *Agro Food Ind. Hi-Tech*. 206, 9–11.

Pedreschi, R. I., Betalleluz-Pallardel, Chirinos, R., Curotto, C., Campos, D. 2011. Impact of cooking and drying on the phenolic, carotenoid contents and in vitro antioxidant capacity of andean Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.) root. *Food Science and Technology International*. 17:319–330.

Pellegrini, N., Serafini, M., Salvatore, S., Del Rio, D., Bianchi, M., Brighenti, F. 2006. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Molecular Nutrition and Food Research*. 50(11):1030-38.,

Pellegrini, N, Miglio C., Del Rio, D., Salvatore S., Serafini, M. Brighenti, F. 2009. Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 60: 12-22.

Pérez-Conesa, D., García-Alonso, J., García-Valverde, V., Iniesta, M.D., Jacob, K., Sánchez-Siles, L.M., Ros, G., Periago, M.J. 2009. Changes in bioactive compounds and antioxidant activity during homogenization and thermal processing of tomato puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10:179–188.

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz- Rubio, M.E., Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*. 41: 274–285.

Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., Scalbert, A. 2010. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the Phenol-Explorer database. *J Agric Food Chem*. 58:4959–69.

Pérez-Jiménez, J., Fezeu, L., Touvier, M., Arnault, N., Manach, C., Hercberg, S., Galan, P. and Scalbert, A. 2011. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am J Clin Nutr*. 93:1220–1228.

Perla, V., Holm, D.G. Jayanty, S.S. 2012. Effects of cooking methods on polyphenols, pigments and antioxidant activity in potato tubers. *Food Science and Technology*. 45:161-171.

- Peter M. Hansona, Ray-Yu Yanga, Samson C.S. Tsoua, Dolores Ledesmaa, Liwayway Englea, Tung-Ching Leeb. 2006. Diversity in eggplant (*Solanum melongena*) for superoxide scavenging activity, total phenolics, and ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:594–600.
- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., Castillo M.D., Ibáñez, E., Herrero, M. 2010. Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International*. 43:3341–2348.
- Podsedeck, A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT*. 40:1–11.
- Pohanka, M., Sochor, J., Ruttkay-Nedecký, B., Cernej, N., Adam, V., Hubálek, J., Stiborová, M., Eckschlager, T., Kizek, R. 2012. Automated assay of the potency of natural antioxidants using pipetting robot and spectrophotometry. *J. Appl. Biomed.* 10:155–167.
- Poljsak, B. 2011. Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2011:1-15.
- Popov, I., Lewin, G. 1999. Antioxidative homeostasis: Characterization by means of chemiluminescent technique. *Methods in Enzymology*. 300:437-456.
- Popov, I., Gudrun Lewin, G. 1994. Photochemiluminescent detection of antiradical activity; III: a simple assay of ascorbate in blood plasma. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 28(4):277-282.
- Porrini, M., Riso P. 2008. Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease*. 18: 647-650.
- Porter, L. J. 1989. Tannins. In J. B. Harborne (Ed.), *Methods in plant biochemistry* (Vol. 1). Plant phenolics. pp. 389–419. London: Academic Press.
- Prior, R.L., Cao, G. 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*. 27(11/12):1173-1181.
- Prior, R.L., Wu, X. And Schaich, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53:4290-4302.
- Provesi, J.G., Dias, C.O. and Amante, E.R. 2011. Changes in carotenoids during processing and storage of pumpkin puree. *Food Chemistry*, 128:195–202.
- Pulido R, Bravo L & Saura-Calixto F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48:3396-3402.
- Pulido, R., Hernández-García M. and Saura-Calixto F. 2003. Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet *European Journal of Clinical Nutrition*. 57:1275–1282.
- Raigón, M.D., Rodríguez-Burruezo, A. and Prohens. J. 2010. Effects of organic and conventional cultivation methods on composition of eggplant fruits. *J. Agric. Food Chem.* 58: 6833-6840.

Bibliografía

Rajarathnam, E., Singh, N., Sharma, S., Kaur, M., 2011. Beneficial phytochemicals in potato. A review. *Food Research International*. doi:10.1016/j.foodres.2011.04.025

Rajarathnam, E., Narpinder, S., Shagun, S., Amritpal, K. 2013. Beneficial phytochemicals in potato — A review. *Food Research International*. 50: 487–496.

Rakic, S., petrovic, S., kukic, J., jadrantin, M., tesevic, V., povrenovic, D. and Siler-Marinkovic, S. 2007. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chem.* 104, 830–834. En *Natella* 2010.

Ramírez-Anaya, J.P., Samaniego-Sánchez C., Rufián-Henares, J.A.; Villalón-Mir, M., López-García, S. H. 2010. Variación en el contenido de compuestos fitoquímicos presentes en alimentos típicos de la Dieta Mediterránea según la técnica culinaria empleada. *Ars Pharmaceutica*. 51(3):437-446.

Ramos-Belmán K., Camarena-Barrera E.A., Miranda-López R., Sánchez-Pérez T., Villagómez-Torres, A.F. 2010. Perfil sensorial de tomate (*Lycopersicon Esculentum*) variedades saladette, uva, bola y cherry. XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, México.

Rasool M and Sabina EP. 2007. Antiinflammatory effect of the Indian Ayurvedic herbal formulation Triphala on adjuvant-induced arthritis in mice. *Phytother Res*. 21:889-894.

Rautenbach, F., Faber, M., Laurie, S., Laurie, R. 2010. Antioxidant capacity and antioxidant content in roots of 4 sweetpotato varieties. *Journal of Food Science*. Vol. 75.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. 1999 Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med*. 26: 1231–1237.

Reziga, L., Chouaibia, M., Msaadab, K., Hamdia, S. 2012. Chemical composition and profile characterisation of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. *Industrial Crops and Products*. 37: 82–87.

Rivero-Pérez. M. D., Muñiz, P. And González-Sanjosé, M.L. 2007. Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *J. Agric. Food Chem*. 55:5476-5483.

Rivero-Pérez, M. D., González-Sanjosé, M.L., Ortega-Herás, M., Muñiz, P., 2008. Antioxidant potential of single-variety red wines aged in the barrel and in the bottle. *Food Chemistry*.111:957–964.

Robbins, R. J. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:2866–2887.

Rodriguez-Amaya, D.V. 2010. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23:726–740.

- Rodríguez-Nogales, J.M., Vila-Crespo, J., Gómez, M. 2011. Development of a rapid method for the determination of the antioxidant capacity in cereal and legume milling products using the radical cation DMPD⁺. *Food Chemistry*. 129:1800–1805.
- Roginsky V., Lissi E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92: 235–254.
- Rojas-Garbanzo, C., Pérez, A.M., Bustos-Carmona, J., Vaillant, F. 2011. Identification and quantification of carotenoids by HPLC-DAD during the process of peach palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) flour. *Food Research International*. 44:2377–2384.
- Rovellini, P., Cortesi, N. 2002. Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycons in virgin olive oil: aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*. 79:1-14.
- Rovellini, P., Fusari, P., Venturini, S. 2012. Nutritional health quality index of novel extra virgin olive oil. Control of lipid oxidized status and micronutrients content with high antioxidant activity in the global definition of quality and stability prevision. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*. 89(4):221-239.
- Rosales, M. A., Cervilla, L. M., Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M. M., Blasco, B., Ríos, J. J., Soriano, T., Castilla, N., Romero, L., Ruiz, J. M. 2011. The effect of environmental conditions on nutritional quality of cherry tomato fruits: evaluation of two experimental Mediterranean greenhouses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91(1):152-162.
- Roy M. K., Takenaka, M., Isobe, S., Tsushida, T. 2007. Antioxidant potential, anti-proliferative activities and phenolic content in water-soluble fractions of some commonly consumed vegetables: Effects of thermal treatment. *Food Chemistry*. 103:106–114.
- Ruiz-Rodríguez, A., Marín, F.R., Ocaña, A., Soler-Rivas, C. 2008. Effect of domestic processing on bioactive compounds. *Phytochem. Rev.* 7: 345–384.
- S/A. 2003. Revisión de la norma comercial del consejo para los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. *OLIVAE*. 97-7.
- Sablina, A. A., Budanov, A. V., Ilyinskaya, G. V., Agapova, L. S., Kravchenko, J. E., Chumakov, P. M. 2005. The antioxidant functions of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* 11:1306–1313.
- Sacchi, R., Paduano, A., Fiore, F. Della Medaglia, F. Ambrosino, M. L. Medina. 2002. Partition behaviour of virgin olive oil phenolic compounds in Oil brine mixtures during thermal processing for fish canning. *J. Agric. Food Chem.* 50:2830-2835.
- Saffi, B., Rosa, J., Moreira, R., Joao A. P. H., Mirian S., Govil, J. N., Singh, V. K. Arunachalam, C. 2006. Biological effects of *Croton lechleri*-a folk medicinal plant from South America. *Recent Progress in Medicinal Plants*. 13:375-391.
- Saguy, I. S., Dana, D., 2003. Integrated approach to deep fat frying: engineering, Nutrition, health and consumer aspects. *Journal of Food Engineering*. 56:143–152.

Bibliografía

Saleem, M., Kim, H. J., Ali, M. S., & Lee, Y. S. 2005. An update on bioactive plant lignans. *Natural Product Reports*. 22:696–716.

Salvini, S., Sera, F., Caruso, D., Giovannelli, L., Visioli, F., Saieva, C., Masala, G., Ceroti, Giovacchini, V., Pitozzi, V., Galli, C., Romani, A., Mulinacci, N., Bortolomeazzi, R., Dolara, P., Palli, D. 2006. Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition*. 95:742–751.

Samaniego, S.C. 2006. Universidad de Granada. Tesis Doctoral. 286 pp.

Samaniego-Sánchez, C., Troncoso González, A.M., García-Parrilla, M.C., Quesada, G. J. J., López, G.S. H., López Martínez, M.C. 2007. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*. 593:103–107.

Samaniego-Sánchez, C., Inurreta-Salinas, Y., Quesada-Granados, J.J., Blanca-Herrera, R., Villalón-Mir, M., Loópez-García S. H., López M. M.C. 2011. The influence of domestic culinary processes on the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of green tea infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:79–86.

Samaniego-Sánchez, C., Oliveras-López, M.J., Quesada-Granados, J.J., Villalón-Mir, M., López-García, S. H. 2012. Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 114:194–204.

Samec, D., Piljac-Zegarac, J., Bogovic, M., Habjanic, K., Gruz, J. 2011. Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis* (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. *Scientia Horticulturae*. 128:78–83.

Sánchez-Muñiz, F.J., Cuesta, C., Garrido, M.C., Arroyo, R., 1994. Fritura de patatas en aceite de girasol. Estudio comparativo del grado de alteracion del aceite de la freidora y del extraído de las patatas. *Grasas y Aceites*. 45:300–305.

Sánchez-Moreno, C., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F. 2000. Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research*. 20:941-53.

Sandoval M, Okuhama NN, Clark M, Angeles FM, Lao J, Bustamante S, Miller MJ. 2002. Sangre de drago *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. *J. Ethnopharmacol*. 80:121-129.

Santos, V. A. and Pérez, V. L. A. 1996. Métodos multivariantes en bioestadística. Centro de Estudios Ramón Areces. Madrid.

Saura-Calixto, F., Goñi I. 2006. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*. 94:442–447.

Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goñi, I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*. 101:492–501.

Scalzo J, Politi A, Pellegrini N, Mezzetti B, Battino M. 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*. 21:207-213.

Schultz, K., Kammerer, D., Carle, R., Schieber, A., 2004. Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:4090–4096.

Schlueter, A.K. and Johnston, C.S. 2011. Vitamin C: Overview and Update. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 16(1):49-57.

Scurrah, M., Amoros, W., Burgos, G., Schafleitner, R., & Bonierbale, M. 2007. Back to the future: Millennium traits in native varieties. In: VI International Solanaceae Conference: Genomics Meet Biodiversity.

Secretaría de agricultura, ganadería y desarrollo rural. 1998. La papa en México, un cultivo con potencialidad. *Claridades agropecuarias*. 57(18):3-15

Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA) México. Fecha de consulta 12/07/2012:<http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/Jitomate.pdf>

Secretaría de agricultura y ganadería (SAG) Honduras. Fecha de consulta 12/07/2012:<http://www.sag.gob.hn/files/Infoagro/Cadenas%20Agro/Hortofruticola/OtraInfo/GuiaHortalizas/Tomate.pdf>

SEDCA. 2013. La nueva rueda de los alimentos. Consultado 18 de marzo de 2013. http://www.nutricion.org/recursos_y_utilidades/rueda_alimentos.htm

Selvaggini, R., Servili, M., Urbani, S., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G. 2006. Evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil by direct injection in high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *J. Agric. Food Chem.* 54:2832-2838.

Serafini, M., Laranjinha, J. A.N., Almeida, L. M., Maiani, G. 2000. Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 11:585-9.

Serpen, A. Gökmen, V. 2009. Evaluation of the Maillard reaction in potato crisps by acrylamide, antioxidant capacity and color. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22: 589–595.

Serpen, A., Pelvan, E., Alasalvar, C., Mogol, B.A., Yavuz, H.T., Gökmen, V., Ozcan, N., Özçelik, B., 2012. Nutritional and Functional Characteristics of Seven Grades of Black Tea Produced in Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 60:7682–7689.

Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto S., Montedoro G. 2003. Volatile compounds and phenolic composition of virgin olive oil: optimization of temperature and time of exposure of olive pastes to air contact during the mechanical extraction process. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7980-7988.

Shahina, N., Siddiqi, R., Sheikh, H., Sayeed, S.A. 2005. Deterioration of olive, corn and soybean oils due to air, light, heat and deep-frying. *Food Research International*. 38(2): 127-134.

Sharma, A.K., Bharti, S., Bhatia, J., Nepal, S., Malik, S., Ray, R., Kumari, S. and Arya, D.S. 2010. Sesamol alleviates diet-induced cardiometabolic syndrome in rats via up-regulating PPAR γ , PPAR α and e-NOS. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 23:1482–1489.

Bibliografía

Shi, X., Wu, H., Shi, J., Xue, S.J., Wang, D., Wang, W., Cheng, A., Gong, Z., Chen, X., Wang, Ch. 2013. Effect of modifier on the composition and antioxidant activity of carotenoid extracts from pumpkin (*Cucurbita maxima*) by supercritical CO₂. *Food Science and Technology*. 51: 433-440.

Shiu, L. Y.; Chang, L. C.; Liang, C. H.; Huang, Y. S.; Sheu, H. M.; Kuo, K. W. 2007. Solamargine induces apoptosis and sensitizes breast cancer cells to cisplatin. *Food Chem. Toxicol.* 45: 2155–2164.

Sikora, E., Cieslik, E., Leszczynska, T., Filipiak-Florkiewicz, A., Pisulewski, P. 2008. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, 107, 55–59.

Silva, L., Pinto, J., Carrola, J., Paiva-Martins, F. 2010. Oxidative stability of olive oil after food processing and comparison with other vegetable oils. *Food Chemistry*. 121:1177–1187.

Simirgiotis, M.J., Schmeda-Hirschmann, G. 2010. Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *Chiloensis* form *chiloensis*) using HPLC-DAD–ESI-MS and free radical quenching techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23:545–553.

Singh, A. P.; Luthria, D.; Wilson, T.; Vorsa, N.; Singh, V.; Banuelos S. G.; Pasakdee, S. 2009. Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp. *Food Chemistry*. 114: 955–961.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenols with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144-158.

Sochor, J., Rývolová, M., Krystofova, O., Salas, P., Hubalek, J., Adam, V., Trnkova, L., Havel, L., Beklova, M., Zehnalek, J., Provaznik, I., Kizek, R. 2010. Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: Advantages and disadvantages. *Molecules*. 15:8618-8640.

Stangeland, T., Remberg, S.F. Lye, K.A. 2010. Total antioxidant activity in 35 Ugandan fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 113:85–91.

Stewart, A.J., Bozonnet, S., Mullen, W., Jenkins, G.I., Lean, M.E.J., Crozier, A. 2000. Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *J. Agric. Food Chem.* 48(7):2663-2669.

Sulaiman, S.F., Yusoff, N.A., Eldeen, I.M., Seow, E.M. 2011. Azliana Abu Bakar Sajak, Supriatno, Kheng Leong Ooi. Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa* sp.). *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:1–10.

Sun, J., Yi-Fang, C., Wu, X., Liu, L.H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* 50:7449-7454.

Sun-Waterhouse, D., Smith, B. G., O'Connor, Ch. J., Melton, L. D. 2008. Effect of raw and cooked onion dietary fibre on the antioxidant activity of ascorbic acid and quercetin. *Food Chemistry*. 111:580–585.

Sun-Waterhouse D., J. Zhou a, G.M. Miskelly b, R. Wibisono a, S.S. Wadhwa. 2011. Stability of encapsulated olive oil in the presence of caffeic acid. *Food Chemistry* 126:1049–1056.

- Svilaas, A., Sakhi, A. K., Andersen, L. F., Svilaas, T., Strom, E. C., Jacobs, D. R., et al. 2004. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *Journal of Nutrition*, 134, 562–567.
- Tabart, J., Kevers, C., Evers, D., Dommès. 2011. Ascorbic Acid, Phenolic Acid, Flavonoid, and Carotenoid Profiles of Selected Extracts from *Ribes nigrum*. *J. Agric. Food Chem.* 59:4763–4770.
- Takenaka, M., Nanayama, K., Isobe, S., & Murata, M. 2006. Changes in caffeic acid derivatives in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) during cooking and processing. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 70:172–177.
- Takebayashi, J., Oki, T., Chen, J., Sato, M., Matsumoto, T., Taku, K., Tsubota-Utsugi, M., Watanabe, J., and Ishimi, Y. 2010. Estimated average daily intake of antioxidants from typical vegetables consumed in Japan: A preliminary study. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74(10):2137–2140.
- Takebayashi, J., Oki, T., Watanabe, J., Yamasaki, K., Chen, J., Sato-Furukawa, M., Tsubota-Utsugi, M., Taku, M., Goto, K., Matsumoto, T., Ishimi, Y. 2013. Hydrophilic antioxidant capacities of vegetables and fruits commonly consumed in Japan and estimated average daily intake of hydrophilic antioxidants from these foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 29:25–31.
- Tan, J. S., Wang, J. J., Flood, V., Rochtchina, E., Smith, W., & Mitchell, P. 2008. Dietary antioxidants and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 115:334–341.
- Tarascou, I., Souquet, J.M., Mazauric, J.P., et al. 2010. The hidden face of food phenolic composition. *Arch Biochem Biophys*. 501:16–22.
- Teow C.C., Truong V., McFeeters R.F., Thompson R.L., Pecota K.V., G. Yencho C. 2007. Antioxidant activities, phenolic and b-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry*. 103:829–838.
- Thakkar, S. K., Maziya-Dixon, B., Dixon, A. G. O., & Failla, M. 2007. β -Carotene micellarization during in vitro digestion and uptake by caco-2 cells is directly proportional to b-carotene content in different genotypes of Cassava^{1,2}. *The Journal of Nutrition*, 137, 2229–2233.
- Tedeschi, P., Coisson, J.D., Maietti a, A., Cereti, E., Stagno, C., Travaglia, F., Arlorio M., Brandolini, V. 2011. Chemotype and genotype combined analysis applied to tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) analytical traceability. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:131–139.
- Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease. 4(3):165-183.
- Tian, F., Li, B., Ji, B., Yang, J., Zhang, G., Chen, Y., Luo, Y. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*. 113:173–179.
- Tiong, N.W., Nagendra, K.P., Yang, B., Amin I. 2010. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of raw and blanched vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11:464–469.

Bibliografía

Tiwari, U. and Cummins, E. 2009. Nutritional importance and effect of processing on tocopherols in cereals. *Trends in Food Science & Technology*. 20:511-520.

Todaro, A.; Cimino F.; Rapisarda P.; Catalano A. E.; Barbagallo R. N.; Spagna G. 2009 Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry*. 114:434–439.

Tomas-Barberan F.A., Ferreres F., Gil L. 2000. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. *Studies in Natural Products Chemistry*. 23:739-795.

Tomás-Barberán, F.A. and Clifford, M. N. 2000. Review Dietary hydroxybenzoic acid derivatives, nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric*. 80:1024-1032.

Tomo, P., Canali, R., Ciavardelli, D., Di Silvestre, S., De Marco, A., Giardinelli, A., Pipino, C., Di Pietro, N., Virgili, F., Pandolfi, A. 2012. β -Carotene and lycopene affect endothelial response to TNF- α reducing nitro-oxidative stress and interaction with monocytes. *Molecular Nutrition & Food Research*. 56(2):217-227.

Toor, R. K.; Lister, C. E.; Savage, G. P. 2005. Antioxidant activities of New Zealand-grown tomatoes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 56 (8): 597-605.

Tosun, B.N., Yucecan, S. 2008. Influence of commercial freezing and storage on vitamin C content of some vegetables.

Tous M. J., Romero A.A. 1993. Variedades del olivo. Fundación “la Caixa”. España 172pp.

Tremblay, G.C. and Qureshi, I.A. 1993. The biochemistry and toxicology of benzoic acid metabolism and its relationship to the elimination of waste nitrogen. *Pharmacol Therapeut* 60:63-90.

Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, Ch., & Trichopoulos, D. 2003. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *New England Journal of Medicine*. 348:2599–2608.

Trichopoulou, A., Vasilopoulou, E., Georga, K., Soukara, S., Dilis, V. 2006. Traditional foods: why and how to sustain them. *Trends Food Sci Technol*. 17:498–504.

Tripathi, R., Mohan, H., Kamat, J.P. 2007. Modulation of oxidative damage by natural products. *Food Chemistry*. 100:81–90.

Tsao, R. and Yang, R. 2003. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1018:29–40.

Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E., Khanizadeh, S. 2005. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple?. *J. Agric. Food Chem*. 53, 4989–4995.

Tscheuschner, H. D. 2001. Fundamentos de tecnología de los alimentos. Acribia. Zaragoza. España.

Tubaro, F. 2009. Antioxidant Activity of Beer's Maillard Reaction Products: Features and Health Aspects. in Health and Disease Prevention. Academic Press. 449-457

Tudela, J.A., Cantos, E., Espin, J.C., Tomas-Barberan, F.A. Gil, M.I. 2002. Induction of antioxidant flavonol biosynthesis in freshcut potatoes. Effect of domestic cooking. J. Agric. Food Chem. 50:5925–5931.

Tyrovolas S, Panagiotakos DB. 2009. The role of Mediterranean type of diet on the development of cancer and cardiovascular disease, in the elderly: A systematic review. Maturitas. doi:10.1016/j.maturitas.2009.07.003

UE 2011. Reglamento (UE) No. 61/2011 de la Comisión que modifica el Reglamento (CEE) no. 2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

UNCTAD, Conferencia de las Naciones Unidas para el comercio y Desarrollo. 2005. Información de Mercado sobre productos básicos. <http://www.unctad.org/infocomm/espanol/olivo/mercado.htm> Consultado el 24 de Noviembre de 2009.

Unlu NZ, Bohn T, Francis DM, Nagaraja HN, Clinton SK, Schwartz SJ. 2007. Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects. Br J Nutr. 98:140-146.

U.S. Department of Agriculture (USDA). 2007. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods. Agricultural Research Service.

Valko, M., Morris, H., and Cronin, M. T. D. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. Curr. Med. Chem. 12: 1161–1208.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D. Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 39: 44–84.

Valls, V. 2005. Presencia y actividad funcional de los polifenoles en alimentos y bebidas. Capítulo en Actualización en nutrición 2005. Evidencias en nutrición. Editores: Iglesias Rosado, C. & Román Martínez, J. Sanitaria 200, Madrid.

Valls-Bellés, V., Codoñer-Franch, P., González San-José, M.L., Muñiz-Rodríguez, P. 2005. Biodisponibilidad de los flavonoides de la cerveza. Efecto antioxidante "in vivo". Centro de Información Cerveza y Salud, Madrid.

Vallverdu-Queralt, A., Jáuregui, O., Medina-Remón, A., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventos, R.M. 2010. Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom., 24, 2986–2992.

Vallverdú-Queralt, A., Medina-Remón, A., Martínez-Huélamo, M., Jáuregui, O., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventos, R.M. 2011a. Phenolic profile and hydrophilic antioxidant capacity as chemotaxonomic markers of tomato varieties. J. Agric. Food Chem. 59:3994–4001.

Bibliografía

Vallverdú-Queralt, A., Arranz, S., Medina-Remón, A., Casals-Ribes, I., Lamuela-Raventós, R. M. 2011b. Changes in phenolic content of tomato products during storage. *J. Agric. Food Chem.* 59: 9358–9365.

Vallverdú-Queralt, A., Jáuregui, O., Di Lecce, G., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M. 2011. Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI-QTOF). *Food Chemistry.* 129:877–883.

Vallverdú-Queralt, A., Arranz, S., Casals-Ribes, I., Lamuela-Raventós, R.M., 2012. Stability of the phenolic and carotenoid profile of gazpachos during storage. *J. Agric. Food Chem.* 60, 1981–1988.

Variyar, P.S. and Bandyopadhyay, C. 1995. Estimation of phenolic acids in cinnamon, clove, cardamon, nutmeg and mace by high performance liquid chromatography. *J Spices Arom Crops.* 4:129-134.

Vekiari, S.A. and Koutsaftakis, A. 2002. The effect of different processing stages of olive fruit on the extracted olive oil polyphenol content. *Grasas y Aceites.* 53(3):304-308.

Vekiari, S. A., Papadopoulo, P., Kiritsakis, A. 2007. Effects of processing methods and commercial storage conditions on the extra virgin olive oil quality indexes. *Grasas y Aceites.* 58: 237-242.

Velioglu, Y.S; Mazza, G; Gao, L; Oomah, B.D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem,* 46, 4113- 4117.

Venditti, E., Bacchetti, T., Tiano, L., Carloni, P., Greci, L., Damiani, E. 2010. Hot vs. cold water steeping of different teas: Do they affect antioxidant activity? *Food Chemistry.* 119:1597–1604.

Venereo G.J.R. 2002. Oxidative damage, free radicals and antioxidants. *Rev. Cub. Med. Mil.* 31(2)126-133.

Vieira, T.M.F.S. y Regitano-D'Arce, M.A.B. 1998. Stability of oils heated by microwave:UV-spectrophotometric evaluation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 18:433-437.

Vieira, F.G.K., Borges, G.S.C., Copetti, C., Gonzaga, L.V., Nunes, E.C., Fett, R., 2009. Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars. *Arch. Latinoam. Nutr.* 59:101–106.

Villalón, M., Cutillas, L., Martínez-Martínez, F., López-García S. H., Oliveras-López, M.J., Samaniego-Sánchez, C. 2012. La Oficina de Farmacia: una herramienta para conocer el grado de adherencia a la dieta mediterránea de la población. *Ars Pharm.* 53(3):19-25.

Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L. and Bose, P. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *Journal of Agriculture Food and Chemistry.* 49:5315–5321.

Vitaglione, P., Fogliano, V., Pellegrini, N. 2012. Coffee, colon function and colorectal cancer. *Food Funct.* 3:916.922.

Volden J., Borge G.I.A., Bengtsson G.B., Hansen M., Thygesen I.E., Wicklund T. 2008. Effect of thermal treatment on glucosinolates and antioxidant-related parameters in red cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata* f. *rubra*). *Food Chemistry.* 109:595–605.

- Volden, J., Borge, G. I. A., Hansen, M., Wicklund, T., Bengtsson, G. B. 2009. Processing (blanching, boiling, steaming) effects on the content of glucosinolates and antioxidant-related parameters in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *botrytis*). *LWT - Food Science and Technology*. 42:63–73.
- Wang, M. Y., Dhingra, K., Hittelman, W. N., Liehr, J. G., deAndrade, M., & Li, D. H. 1996. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde–DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol. Biomark Prev.* 5: 705–710.
- Wetwitayaklung, P; Phaechamud, T. 2011. Antioxidant activities and phenolic content of *Solamun* and *Capsicum* sp. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2 (2):146-154.
- WHO/FAO, 2003. Expert report on diet and chronic disease. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr20/en>.
- Wilailuk Ch., Elias, R.J., Mc Clements, D.J., Decker, E.A. 2007. Role of Physical Structures in Bulk Oils on Lipid Oxidation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 47:299–317.
- Williamson G., Plumb G.W., García-Conesa M.T. 1999. Glycosylation, esterification, and polymerization of flavonoids and hydroxycinnamates: Effects on antioxidant properties. En: *Plant polyphenols 2: Chemistry, biology, pharmacology, ecology*. Gross et al. Editores. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. 926pp.
- Winston, G. W., Regoli, F., Dugas, A.J., Fong, J. H., Blanchard, K.A. 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 24:480-93.
- Wright, J. S., Johnson, E. R., DiLabio, G. A. 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 123:1173-1183.
- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. 2007. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington DC: AICR, 2007.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Prior, R. L. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 52:4026–4037.
- Xianquan S, Shi J, Kakuda Y, Yueming J. 2005. Stability of lycopene during food processing and storage. *J Med Food*. 8:413-422.
- Xiaoyun, X., Wende, L., Zhanhui, L., Trust, B., Hydamaka, B.W. 2009. Phenolic Content, Composition, Antioxidant Activity, and Their Changes During Domestic Cooking Of Potatoes. *J. Agric. Food Chem.* 57:10231–10238.
- Yamaguchi, T., Katsuda, M., Oda, Y., Terao, J., Kanazawa, K., Oshima, S., Inakuma, T., Ishiguro, Y., Takamura, H., Matoba, T., 2003. Influence of polyphenol and ascorbate oxidases during cooking process on the radical scavenging activity of vegetables. *Food Sci. Technol. Res.*, 9:79-83.

Bibliografía

Yao, Y. and Ren, G. 2011. Effect of thermal treatment on phenolic composition and antioxidant activities of two celery cultivars. *Food Science and Technology*. 44:181-185.

Yen, G.C., Duh, P.D., Tsai, H.L. 2002. "Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and galic acid". *Food Chemistry*: 79:307-13.

Yen, W. J., Wang, B. S., Chang, L. W. and Duh, P.D. 2005. Antioxidant Properties of Roasted Coffee Residues. *J. Agric. Food Chem.* 53:2658–2663 .

Yilmaz, Y., Toledo, R. 2005. Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. *Food Chemistry*. 93: 273–278.

Ying, Z., Yue-Xin, Y., Ai-Guo, M. 2012. Research advances in relationship between xanthophyll intake and chronic diseases. *Weisheng Yanjiu*. 41(1):144-148.

Yorulmaz, A., Tekin, A., and Turan, S. 2011. Improving olive oil quality with double protection: Destoning and malaxation in nitrogen atmosphere. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113:637–643.

Zadernowski, R., Czaplicki, S. and Naczek, M. 2009. Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry*. 112:685–689.

Zamora-Ros, R., Rabassa, M., Llorach, R., González, C.A., and Andres-Lacueva, C. 2012. Application of dietary phenolic biomarkers in epidemiology: past, present, and future. [dx.doi.org/10.1021/jf204742e](https://doi.org/10.1021/jf204742e) | *J. Agric. Food Chem.* 60:6648–6657

Zanfini, A., Corbini, G., La Rosa, C., Dreassi, E. 2010. Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and α -tocopherol in synthetic mixtures. *LWT - Food Science and Technology*. 43:67–72.

Zazpe, I., Sánchez-Tainta, A., Estruch, R., Lamuela-Raventos, R.M., Schröder, H., Salas-Salvado, S., Corella, D., Fiol, M., Gómez-Gracia, E., Aros, F., E., Ruíz-Gutiérrez, V., Iglesias, P., Conde-Herrera, M. Martínez-González, M.A. 2008. A Large Randomized Individual and Group Intervention Conducted by Registered Dietitians Increased Adherence to Mediterranean-Type Diets: The PREDIMED Study. *J Am Diet Assoc.*108:1134-1144.

Zhang, Q., Pi, J., Woods, C.G. and Andersen, M.E. 2010. A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 244:84–97.

Zhang, J., Ji, R., Hu, J., Chen, J., Ye, X. 2011. Effect of three cooking methods on nutrient components and antioxidant capacities of bamboo shoot (*Phyllostachys praecox* C.D. Chu et C.S. Chao). *Biomed & Biotechnol.* 12:752-759.

Zheng, X., Yin, F., Liu, Ch., and Xu, X. 2011. Effect of process parameters of microwave assisted extraction (MAE) on polysaccharides yield from pumpkin. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*. 18(2):79-86.

VII. PUBLICACIONES Y CONGRESOS



ARTÍCULO ORIGINAL

Variación en el contenido de compuestos fotoquímicos presentes en alimentos típicos de la Dieta Mediterránea según la técnica culinaria empleada.

Variation on the content of phytochemicals compounds in typical Mediterranean foods depending on the culinary technique used

Ramírez-Anaya JP; Samaniego-Sánchez C*; Rufián-Henares JA; Villalón-Mir M; López-García de la Serrana H.

Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. Granada, España.
csama@ugr.es

RESUMEN

El aceite de oliva virgen extra (AOVE) y la patata son alimentos característicos en la Dieta Mediterránea, a su consumo se asocian beneficios para la salud relacionados con fitoquímicos bioactivos como los antioxidantes polifenólicos. Las técnicas culinarias a las que son sometidos los alimentos previos a su consumo causan variaciones en la retención y distribución de la capacidad antioxidante (CA) y en el contenido de fenoles totales (CFT). El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el contenido en polifenoles y la CA mediante los métodos ABTS y DPPH, antes y después del cocinado que sufre una hortaliza como la patata mediante cuatro técnicas culinarias diferentes (fritura, rehogado, cocción en agua y cocción en agua-aceite) donde los medios de transferencia de calor utilizados son el aceite o el agua. Siempre que se utiliza AOVE, ya sea como medio de transferencia de calor (fritura y rehogado) ya sea como ingrediente culinario (cocción en agua-aceite), se incrementa la CA de la patata. Por el contrario, e independientemente de la técnica culinaria seguida, el CFT disminuye en la patata. Ahora bien si se utiliza una mezcla de agua-aceite (A/A), como medio de transferencia de calor, el agua de cocción se incrementa en compuestos fenólicos. Posiblemente se tratan de fenoles hidrosolubles procedentes del aceite y que son extraídos del mismo por el propio agua de cocción. Por ello sería recomendable hervir las patatas en agua adicionada de un poco de aceite y consumir junto con estas hortalizas el propio agua de cocción para evitar pérdidas en fenoles que se producirían si se deshechan las aguas de hervido. En general, la patata gana y el aceite pierde en CA (tanto por el método ABTS como por el método DPPH); las mayores pérdidas en la CA se producen en el aceite procedente del rehogado. Por el contrario, el mayor incremento en la CA se produce en la patata cocinada por esta técnica y cuando se aplica el método DPPH. Son también notables los incrementos obtenidos en la CA de la patata hervida con una mezcla de A/A. El aceite procedente de una primera fritura pierde contenido fenólico posiblemente debido a la oxidación térmica, polimerización e hidrólisis que dan lugar a productos de oxidación, pero su CA se aumenta cuando se analiza por el método ABTS.

El método de cuantificación originó variaciones en la magnitud de la CA; sin embargo, la interpretación conjunta de la CA medida por ambos métodos facilita la comprensión del mecanismo antioxidante involucrado. La adecuada elección de los métodos y condiciones de elaboración culinaria maximizarán la CA y el aporte de polifenoles del AOVE y la patata a la dieta.

PALABRAS CLAVE: Cocción; fritura; rehogado; fenoles totales; capacidad antioxidante, patata.

ABSTRACT

Extra virgin olive oil (AOVE) and potatoes are Mediterranean diet typical food, health benefits linked with bioactive phytochemicals as polyphenolic antioxidants are associated to consumption. Before consumption, this food is processed by culinary techniques changing antioxidant capacity (AC) retention and distribution as total phenol content (TFC). The aim of this study has been to analyze the

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 437-446.

total polyphenol content and the AC by ABTS and DPPH methods, before and after cooking vegetables such as potato by four different culinary techniques (frying, fry lightly, cooked in water and cooking oil-water) using as heat transfers way oil or water. After using AOVE as heat transfer medium (fried and fry lightly) either as a culinary ingredient (water-oil cooking), increases the AC of the potato. Instead of and regarding less the culinary technique used the TFC decreases in potato. However if an oil-water mix (O / A) is used as a heat transfer way, the phenolic compounds increases in cooking water. Probably are water-soluble phenols from oil, which are extracted from the same cooking water. Would be suitable to boil the potatoes in oily added water and eat these vegetables with their own cooking water to avoid phenols losses, which would occur if boiling water is drop. Generally, potatoes wins and oil loses in AC (by ABTS and DPPH method), the majority AC losses occur in the oil from fry lightly. Instead of, the largest increase in AC happens in the potato cooked by this technique and when DPPH method is applied. When oil- water mix is used, there are important increments in the AC of the potato, The oil from first frying, loses phenolic content possibly due to thermal oxidation, polymerization and hydrolysis process, but the AC increase when is analyzed by ABTS method. Quantification method used originates AC variations, however AC interpretation by both methods facilitates the understanding of antioxidant mechanism involved. The suitable choice of one methods and culinary conditions applied in the cooking process will increase the AC total and total phenol contribution to the diet.

KEYWORDS: cooking, fried, fry lightly, total phenol content, antioxidant capacity, potato.

INTRODUCCIÓN

Los fitoquímicos son un grupo de sustancias que se encuentran de forma natural solamente en las frutas, hortalizas, verduras y en general en los alimentos de origen vegetal. Dentro del grupo de fitoquímicos están los glucosilatos, isocianatos y los fenoles. A los glucosilatos se les atribuyen efectos anticancerígenos e incluso antibióticos. Los isocianatos previenen de distintos tipos de cáncer de forma bastante efectiva, siempre y cuando estén presentes en el momento de la exposición al carcinógeno. En cuanto a los fenoles, son un grupo tan amplio como sus propiedades. Entre ellos, se encuentran subgrupos relativamente conocidos como los polifenoles, flavonoides, taninos, etc. Los fitoquímicos, en general y los polifenoles en particular, son poderosos antioxidantes con un papel protagonista en la nutrición actual ya que al neutralizar a los radicales libres, combaten el estrés oxidativo. Por estas y otras razones se aconseja consumir diariamente de 4 a 6 raciones de frutas y verduras.

La mayoría de los alimentos han de ser sometidos antes de su consumo a un proceso de cocción con el objetivo de transformar mediante la acción del calor de modo físico y/o químico el aspecto, la textura, la composición y el valor nutritivo del alimento a fin de satisfacer los sentidos de la vista, el gusto y el olfato. En esencia, la cocción permite mediante la aplicación del calor convertir el alimento en algo más digerible, apetecible e higiénicamente seguro. Pero este calor va a provocar la pérdida de parte de nutrientes fácilmente termolábiles y extraíbles por los medios de cocción utilizados como son las vitaminas, minerales y compuestos fenólicos, entre otros. En general se considera que los métodos de cocinado pueden ejercer un efecto negativo sobre los compuestos antioxidantes al destruirlos en mayor o menor medida.¹

La gravedad del daño por tratamientos como la fritura, el rehogado y el hervido es diferente según se evalúen compuestos lipofílicos o hidrofílicos. La utilización de medios de transferencia de calor apolares, como el aceite, durante la fritura y rehogado favorece en

menor medida la difusión de los polifenoles desde los alimentos hasta el medio de cocción. Al contrario sucede durante el hervido, incrementándose la difusión de compuestos fenólicos hidrosolubles por la extracción que de los mismos realiza el agua de cocción. La gravedad de las pérdidas durante los tratamientos hidrotérmicos están relacionadas con la proporción alimento/agua, con el tiempo de cocción y con el área superficial dañada expuesta a la lixiviación.²

La fritura y el rehogado suponen importantes ventajas respecto al hervido como son la rápida transferencia de calor, que reduce el tiempo de cocinado sin superar los 100°C en el interior del alimento y se consigue una mínima lixiviación de compuestos solubles en agua; por ello se considera que el proceso de fritura tiene un efecto mínimo en las pérdidas de nutrientes³; sin embargo, los alimentos fritos o rehogados contienen cantidades significativas del aceite que es absorbido conforme sustituye el agua evaporada incrementando considerablemente el valor energético del alimento. Algunos factores que aumentan la absorción de aceite por parte del alimento son la calidad del aceite utilizado, la fritura repetida, la porosidad y densidad del alimento, la proporción del volumen aceite/alimento y por último las temperaturas de fritura.

El AOVE es un alimento básico de la dieta española y un aporte importante de fitoquímicos funcionales cuya acción es esencial en los beneficios a la salud que proporciona la Dieta Mediterránea. A pesar de la baja proporción que representan en la composición total del AOVE, la presencia de polifenoles en la fracción insaponificable contribuye a su estabilidad frente a la autooxidación⁴ y convierte a este alimento en una fuente importante de antioxidantes naturales dentro de esta dieta. En cuanto a la patata, es otro alimento básico de la dieta española como fuente de carbohidratos complejos, ya sea como plato principal ya sea como acompañamiento de otros platos. Se caracteriza porque al ser una hortaliza que no puede consumirse cruda, aunque sea una buena fuente de vitamina C (otro fotoquímico esencial de la dieta) y de vitaminas de grupo B así como de sales minerales, todos estos nutrientes se pierden en parte durante los tratamientos culinarios por el propio calor aplicado en su cocinado así como por la extracción que de ellos realizan las aguas de cocción empleadas en la técnica culinaria correspondiente. Se sabe que el calentamiento del AOVE puede inducir alteraciones oxidativas en la fracción del insaponificable y se ha encontrado que la concentración de polifenoles disminuye durante el cocinado pudiendo llegar hasta niveles no detectables cuando el contenido de fenoles en el aceite fresco es bajo. En términos generales, 'la fritura provoca la pérdida parcial de polifenoles originalmente presentes en el AOVE y un enriquecimiento de los alimentos fritos en él.⁵

Es evidente que según el tratamiento culinario, el medio de transferencia de calor utilizado y el alimento en cuestión, la CFT y la CA del alimento y del aceite utilizado se van a modificar. Por ello el objetivo de este trabajo ha sido estudiar el contenido CFT y la CA antes y después del cocinado que sufre una hortaliza como la patata mediante cuatro técnicas culinarias diferentes (fritura, rehogado, cocción en agua y cocción en agua-aceite) donde los medios de transferencia de calor utilizados son el aceite o el agua. También se ha estudiado la influencia que tienen estos medios de transferencia de calor, especialmente el AOVE, sobre la

difusión o sobre la pérdida de compuestos polifenólicos y CA y el enriquecimiento en compuestos fenólicos que pueda sufrir una hortaliza tan básica dentro de la dieta española como es la patata, según la técnica de cocinado seguida y el medio de transferencia de calor utilizado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras analizadas

Se han analizado patatas aptas para cocción y fritura de la variedad "Ambra", adquiridas en una tienda de autoservicio local. Esta variedad de patata temprana se caracteriza por ser un tubérculo de carne amarilla, forma oval, textura lisa y piel suave. Para poder someter estas muestras de patata a los análisis posteriores se pesaron previamente y de forma aleatoria 400 g de patatas las cuales se lavaron, secaron, pelaron y cortaron en forma de cubos de 1 cm según la técnica descrita por Mc Gee H.⁶ Las muestras se iban pesando y procesando según el ritmo de trabajo de la analítica correspondiente para evitar reacciones de pardeamiento químico y oxidación de vitaminas, entre otras alteraciones, que tienen lugar cuando se les desprenden de la piel y se cortan. El AOVE fue adquirido directamente en una almazara y almacenado en botellas de vidrio color ámbar con nitrógeno gaseoso en el espacio de cabeza. Estas muestras se mantuvieron en refrigeración a 4° C hasta el momento de su analítica. Antes de comenzar los ensayos, las muestras se llevaron a temperatura ambiente y se agitaron para homogeneizarlas.

Técnicas culinarias aplicadas.

Se han seguido cuatro técnicas culinarias de amplia difusión dentro de la cocina española y mediterránea: la gran fritura, el rehogado, la cocción en agua y la cocción en una mezcla de agua- aceite. Las dos primeras se tratan de cocciones en medio graso y en nuestro caso hemos utilizado como medio calorífico AOVE. En las dos últimas el medio calorífico es el agua.

Grañ fritura: las patatas se sumergen totalmente durante 10 minutos en aceite previamente calentado a 170-180° C a fin de dar lugar a la formación de una costra o corteza dorada, en la proporción de 1:5 respectivamente para las patatas y el aceite. Con esta técnica la fritura se produce de modo uniforme por toda la superficie del producto y se consiguen patatas doradas y crujientes.

Rehogado: En esta técnica las patatas quedan en parte sumergidas en el aceite. El aceite previamente se ha calentado entre 80-100° C. Las patatas y el aceite se han puesto en una proporción de 1:0,5 respectivamente durante 10 minutos. La poca cantidad de aceite utilizado como medio calorífico hace que la parte del alimento sumergida en él sea la que

realmente se fríe, mientras que la porción emergida se cuece por el vapor de agua que se forma en su interior. Con esta técnica culinaria, se favorece la palatabilidad al entrar el aceite en contacto íntimo con el alimento al mismo tiempo que se consiguen ablandar las hortalizas y desarrollar, concentrar y combinar los sabores.

Cocción en agua: Se parte de agua en ebullición a 100° C a la que se le añaden las patatas en una proporción respectiva de 5:1. Las patatas se cuecen por inmersión completa en el agua durante 10 minutos. Mediante esta técnica, al echar las patatas en un medio cuya temperatura ha sobrepasado los 70° C, se produce una coagulación de las proteínas superficiales en las patatas dificultándose el intercambio de sustancias hidrosolubles entre las mismas y el medio que lo rodea.

Cocción en A/A. Se procede como en la técnica anterior con la diferencia de que al agua de cocción se le añade AOVE en una proporción de 4,5:0,5 respectivamente. Se añade aceite al agua de cocción a fin de desarrollar una cocción con expansión de sustancias, donde los fenómenos de ósmosis resultan extraordinariamente importantes.

Preparación de las muestras.

Las patatas, una vez cocinadas por las correspondientes técnicas, se sacan de los recipientes donde se han cocido, se dejan sobre papel absorbente para retirar el exceso de grasa o de agua y a continuación se procede a la preparación de los extractos metanólicos según la técnica descrita por Saura-Calixto F.⁷

Por su parte, con el aceite procedente de la fritura, rehogado y del agua de cocción se preparan los extractos metanólicos correspondientes siguiendo el método propuesto por Monteodoro G.F. y col⁸.

Estos extractos metanólicos se utilizan para determinar el CFT y la CA. También se prepararon extractos metanólicos tanto de las patatas crudas como del aceite en crudo para conocer el CFT y la CA de la que partíamos, antes de someter esta hortaliza a las distintas técnicas de cocinado ensayadas.

El agua utilizada en las dos variantes de cocción en medio acuoso no se somete a extracción, según la técnica descrita por Tabart J. y col.⁹ La determinación de CFT y CA se realizó directamente sobre estas muestras de agua, previamente centrifugadas para eliminar cualquier residuo presente.

Técnicas analíticas

A las muestras analizadas se les ha practicado el CFT y la Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC).

Para la determinación del CFT se ha seguido una modificación del método Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton V. L. y col.¹⁰ El CFT se expresó como μg equivalentes de ácido gálico/g masa seca.

La TEAC se ha analizado según dos técnicas diferentes: el método DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) (tomando como referencia la técnica descrita por Brand-Williams y col.¹¹) y el método ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (técnica descrita por Pellegrini N. y col.¹²). En ambos casos los resultados se han expresado en μmol de equivalentes trolox/g masa húmeda.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados usando el programa estadístico SPSS[®], versión 15.0. Los datos se expresaron como el promedio y desviación estándar de tres repeticiones. Se aplicó el ANOVA y la prueba de comparación para detectar las diferencias entre las medias con un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Contenido fenólico total

En la **Tabla 1** aparece recogido el CFT para la patata, el AOVE y el agua, antes y después de las técnicas culinarias practicadas. En general, las patatas van a perder CFT sea cual sea la técnica culinaria seguida. Lo mismo sucede con el aceite procedente de la fritura y del rehogado. Estas pérdidas en fenoles pueden explicarse por la oxidación térmica, polimerización e hidrólisis que da lugar a productos de oxidación y por la formación de enlaces covalentes entre fenoles oxidados y proteínas o aminoácidos, así como a la polimerización de fenoles oxidados¹³. Las mayores pérdidas en fenoles totales se producen en el aceite procedente del rehogado (pierde un $62,82 \pm 2,3\%$) y en las patatas procedentes de la fritura (con una pérdida media de un $25,10 \pm 9,9\%$). Esta reducción obedece a que en técnicas de fritura superficial como el rehogado se acentúa la oxidación del aceite como resultado de una mayor exposición al oxígeno atmosférico que es favorecida por la agitación y la formación de una película que cubre al alimento¹⁴. Por el contrario, cuando se utiliza agua como medio de transferencia de calor, el agua de cocción se enriquece en fenoles totales, siendo este enriquecimiento mayor ($34,5 \pm 1,8 \mu\text{g}$ equivalentes de ácido gálico/g masa seca) cuando al agua de cocción se le añade AOVE como ingrediente culinario. En este último caso al agua de hervido migran no solo los compuestos fenólicos solubles de la patata, sino que también se produce una disolución de los mismos compuestos presentes en el aceite por parte del agua de cocción.

Tabla 1. CFT en muestras de patata, AOVE y agua crudos y procesados por cuatro técnicas culinarias.

	Fritura	Inicial	42,3 ± 3,7	144,5 ± 14,8	*****
		Final	31,5 ± 1,5	124,4 ± 13,7	*****
		Δ (%)	-25,1 ± 9,9	-12,9 ± 18,4	*****
	Rehogado	Inicial	42,2 ± 3,5	14,5 ± 1,4	*****
		Final	35,2 ± 1,3	5,4 ± 0,2	*****
		Δ (%)	-16,5 ± 3,9	-62,8 ± 2,3	*****
	Cocción	Inicial	42,1 ± 3,4	*****	31,9 ± 4,1
		Final	0,0 ± 0,0	*****	17,8 ± 3,5
		Δ (%)	-23,5 ± 15,9	*****	I. N. C.
Cocción A/A	Inicial	42,2 ± 3,6	14,6 ± 1,5	0,0 ± 0,0	
	Final	25,0 ± 1,0	0,8 ± 0,1	34,5 ± 1,8	
	Δ (%)	-40,5 ± 7,4	-94,6 ± 1,2	I. N. C.	

I.N.C.=Incremento no cuantificable (∞)

Capacidad antioxidante

En la **Tabla 2** aparece recogida la CA medida por los métodos ABTS y DPPH en la patata, el aceite y el agua, antes y después de las técnicas culinarias practicadas.

En todos los casos, la patata gana en CA (tanto por el método ABTS como por el método DPPH) y el AOVE pierde. La evaluación con el método ABTS dio lugar a valores de CA más altos y a incrementos en los contenidos globales más evidentes que los cuantificados por el método DPPH. En la técnica ABTS, el radical tiene mayor afinidad por compuestos solubles en agua y generalmente, en alimentos, se obtienen cuantificaciones superiores a las del método DPPH. Por lo tanto las lecturas superiores serían el resultado tanto de la mayor aplicación alimentaria del método, como del incremento de la concentración de sustancias polares diferentes a los fenóles en las fracciones estudiadas (aceite, agua y patata).

Las mayores pérdidas en la CA se producen en el AOVE procedente del rehogado, siguiendo la misma tendencia que lo expuesto para el CFT. Por el contrario, el mayor incremento en la CA se produce precisamente en la patata cocinada por esta técnica y cuando se aplica el método DPPH. Son también notables, los incrementos producidos en la CA de la patata hervida con una mezcla de A/A (41,8 ± 30 % método ABTS y 92,2 ± 7,8 % método DPPH). Parte de las sustancias antioxidantes del aceite migran a la patata (las fracciones liposolubles) mientras que la fracción fenólica hidrosoluble es extraída por la propia agua de

cocción.

La única técnica culinaria donde se produce un incremento de la CA tanto de la patata ($38,0 \pm 23\%$ método ABTS y $218,9 \pm 56,3\%$ método DPPH), como del AOVE ($354 \pm 55,9\%$, método ABTS), es la fritura. Esto puede deberse a la mayor capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos parcialmente oxidados generados durante la primera fritura del aceite, esta tendencia puede no repetirse a medida que se incremente el número de frituras con el mismo aceite, ya que el estado de oxidación también aumenta con la consecuente reducción de la capacidad antioxidante.

Tabla 2. Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante medida por los métodos ABTS y DPPH en muestras de patata, AOVE y agua crudos y procesados por cuatro técnicas culinarias.

Muestra	Técnica	Método	Contenido de fenoles totales (mg/g)		Significación
			ABTS	DPPH	
Patata	Fritura	Inicial	423,8 ± 45,3	703,6 ± 41,4	*****
		Final	579,6 ± 38,0	3182,7 ± 205,3	*****
		Δ (%)	38,0 ± 23,7	354,0 ± 55,9	*****
	Rehogado	Inicial	423,5 ± 47,0	70,8 ± 3,8	*****
		Final	556,4 ± 59,6	50,6 ± 0,3	*****
		Δ (%)	33,0 ± 28,9	-28,4 ± 3,4	*****
	Cocción	Inicial	421,9 ± 47,2	*****	0,0 ± 0,0
		Final	330,2 ± 10,4	*****	285,0 ± 35,3
		Δ (%)	-21,4 ± 6,3	*****	I. N. C.
Cocción A/A	Inicial	423,5 ± 46,5	71,0 ± 4,2	0,0 ± 0,0	
	Final	607,3 ± 193,0	28,9 ± 5,7	724,0 ± 66,7	
	Δ (%)	41,8 ± 30,0	-59,4 ± 5,6	I. N. C.	
AOVE	Fritura	Inicial	60,5 ± 7,0	794,3 ± 33,8	*****
		Final	191,0 ± 11,8	767,3 ± 25,4	*****
		Δ (%)	218,9 ± 56,3	-3,2 ± 7,3	*****
	Rehogado	Inicial	60,4 ± 6,7	79,9 ± 3,9	*****
		Final	257,9 ± 24,3	29,4 ± 1,8	*****
		Δ (%)	331,5 ± 88,0	-63,1 ± 4,0	*****
	Cocción	Inicial	60,2 ± 6,6	*****	0,0 ± 0,0
		Final	153,4 ± 13,5	*****	46,3 ± 8,8
		Δ (%)	157,4 ± 50,8	*****	I. N. C.
Cocción A/A	Inicial	60,5 ± 6,8	80,2 ± 3,4	0,0 ± 0,0	
	Final	115,9 ± 8,3	4,5 ± 0,4	91,5 ± 13,6	
	Δ (%)	92,2 ± 7,8	-94,3 ± 0,7	I. N. C.	

I.N.C.=Incremento no cuantificable (∞)

En todas las técnicas culinarias ensayadas la patata gana en CA, siendo el rehogado la técnica más efectiva. Este incremento de la CA puede deberse a un incremento de las propiedades antioxidantes de ciertos polifenoles parcialmente oxidados como efecto de la mayor habilidad de donar un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo aromático a un radical libre y/o a la capacidad de su estructura aromática de soportar el electrón desapareado a través de la deslocalización alrededor del sistema electrónico π . Otra posible causa puede ser la CA de otros compuestos antioxidantes que pudieran estar presentes en los extractos evaluados (tocoferol, carotenos, vitamina C en el caso de hortalizas), o bien al efecto de sustancias antioxidantes formadas durante la elaboración del alimento como son los productos de la reacción de Maillard, o a sustancias no antioxidantes con capacidad de reaccionar con los radicales sintéticos¹⁵.

CONCLUSIONES

Siempre que se utiliza AOVE, ya sea como medio de transferencia de calor (fritura y rehogado), ya sea como ingrediente culinario (cocción en A/A) se incrementa la CA de la patata.

La fritura incrementó la CA de la patata y el AOVE; el rehogado incrementó la CA de la patata pero redujo la del aceite. Sin embargo, la mayor CA de la patata frita puede ser el resultado de la absorción de aceite durante la elaboración y/o de la formación de sustancias que reaccionan con los radicales sintéticos pero con actividad biológica nula o cuestionable. Por lo anterior, es más recomendable el consumo de las patatas procesadas a temperaturas menores (rehogado) y una vez escurrido el exceso de aceite.

En las dos técnicas de cocción estudiadas, la solubilización de los polifenoles de la patata y/o AOVE, y el incremento de la CA del agua, hacen recomendable consumir el alimento junto con el agua de cocción. La adición de pequeñas cantidades de AOVE durante la cocción tiene el efecto de incrementar el CFT y la CA de la preparación, incluso en el caso de retirar el exceso de aceite a fin de reducir la carga calórica del alimento.

BIBLIOGRAFIA

1. Wu X, Gu L, Holden J, Haytowitz D. B, Gebhardt S. E, Beecher G, Prior R.L. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2004; 17:407–422.
2. Volden J, Borge G.I.A, Hansen M, Wicklund T, Bengtsson G.B. Processing (blanching, boiling, steaming) effects on the content of glucosinolates and antioxidant-related parameters in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *Botrytis*). *LWT - Food Science and Technology*. 2009; 42:63–73.
3. Kalogeropoulos N, Mylona A, Chiou A, Ioannou M.S, Andrikopoulos N.K. Retention and distribution of natural antioxidants (α -tocopherol, polyphenols and terpenic acids) after shallow frying of vegetables in virgin olive oil. *LWT*. 2007; 40:1008–1017.
4. Kita A, Lisinska G, Gołubowska G. The effects of oils and frying temperatures on the texture and fat content of potato crisps. *Food Chemistry*. 2007; 102:1–5.
5. Cerretani L, Bendini, A, Rodriguez-Estrada M.T, Vittadini E, Chiavaro, E. Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part 1. Effect on chemical oxidative stability indices and phenolic compounds. *Food Chemistry*. 2009; 115:1381-1388.
6. Mc Gee H. *On food and cooking. The science and lore of the kitchen*. Revised Edition. Scribner. New York. 884 pp. (2004).
7. Saura-Calixto F. Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *J. Agric. Food Chem*. 1998; 46:4303-4306
8. Montedoro G.F, Scrvili M, Baldioni M, Miniati E. Simple and Hydrolyzable phenolic compounds in virgen olive oil. 1. their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem*. 1992; 40:1571-1576.
9. Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J.O, Dommessa J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*. 2009; 113:1226–1233.
10. Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299, 152–178.
11. Brand-Williams W, Cuvelier M. E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.- Wiss. Technol*. 1995; 28: 25-30.
12. Pellegrini N, Re R, Yang M, Rice-Evans C. Screening of Dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2-2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods in enzymology*. 1999; 299:379-389.
13. Friedman, M. Food browning and its prevention: An overview. *J. Agric. Food Chem*. 1996, 44, 631–653.
14. Pokorny J. (1999). Changes of nutrients at frying temperatures. En Boskou D., Elmadfa I. (1999). *Frying of food. Oxidation, nutrient, and non-nutrient antioxidants, biologically active compounds and high temperaturas*. CRC Press. EUA. 276 pp.
15. Nicoli M.C, Anese M, Parpinel M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *From Trends in Food Science & Technology* 1999; 10: 94-100.

XXVII CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN PARENTERAL Y ENTERAL SENPE. MADRID 2012.

Nutr Hosp Vol. 27. Suplemento 1. Mayo 2012

heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna, frente a *Salmonella typhi*.

Metodología: Para obtener el sobrenadante, *B. breve* se cultivó en medio Man Rogosa Sharpe (MRS) adicionado de cisteína al 0,05%, durante 17 h o 24 h, a 37 °C. El sobrenadante se recogió por centrifugación, se liofilizó y se concentró diez veces. Una parte se neutralizó a pH 6.0. Se esterilizó mediante filtración por 0,22 µm. En una placa multipocillos se añadieron por separado el sobrenadante en porcentajes (v/v) crecientes (1 y 4%), a pH neutro (6,5) y ácido (4,0), a medio triptonsoja inoculado al 5% de *Salmonella typhi* CECT 725. Se midió la densidad óptica a 620 nm en intervalos de una hora durante 17 h, a 37°C y agitación continua. Estadística. Los valores se expresan como media de cuatro experimentos independientes. Para evaluar las diferencias entre tratamientos se realizaron modelos lineales generales para medidas repetidas.

Resultados (ver doc adjunto en EVENTS) * p < 0,05.

Conclusiones: El sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 ejerció una inhibición del crecimiento sobre *Salmonella typhi* CECT 725, debida a la presencia de compuestos antimicrobianos, posiblemente bacteriocinas, presentes en el medio.

C4 Variación del perfil de Ácidos Grasos y Capacidad Antioxidante en Calabaza y Aceite de Oliva Virgen Extra con tratamientos culinarios

López García de la Serrana H¹, Ramirez Anaya J-P¹, Samaniego Sánchez C¹, Villalón Mir M

¹Facultad de Farmacia. Departamento de Nutrición y Bromatología. Universidad de Granada. Granada.

Las hortalizas y el aceite de oliva virgen extra (AOVE) son componentes característicos de la Dieta Mediterránea a cuyo consumo se asocian beneficios para la salud relacionados con microconstituyentes bioactivos con actividad antioxidante. El AOVE posee un perfil lipídico que además de contribuir al bienestar, también proporciona una alta estabilidad durante el procesamiento culinario. El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad antioxidante (CA) por el método FRAP (poder antioxidante del hierro reductor) y el perfil de ácidos grasos (PAG) (cromatografía de gases) en muestras de AOVE y de una matriz alimentaria (calabaza), tras la aplicación de fritura, rehogado, cocción y cocción en una mezcla de agua y aceite (AA). Se ha utilizado para el estudio de los resultados el análisis de varianza y la comparación de medias con un nivel de significancia del 5%. La CA en la calabaza frita superó a la obtenida por cualquier otro tratamiento culinario. El AOVE presentó el mayor valor de capacidad antioxidante en los diferentes

tratamientos, excepto en el rehogado con alimento. A los valores de la calabaza frita le siguieron en orden decreciente: la rehogada, cruda, cocida y cocida AA. La retención de la CA de la calabaza cocinada usando aceite como medio de transferencia de calor incrementó respecto a la de la verdura cruda o cocida en agua. Entre el 95,89% a 97,33% de la grasa extraída de las muestras está constituida por los ácidos palmítico (9,56%), esteárico (3,27%), oléico (77,15%), y linoléico (6,81%) sin diferencias significativas con el aceite fresco ni con las muestras obtenidas en los experimentos de fritura, rehogado y cocción AA con calabaza o procedentes de las simulaciones sin alimento. Los resultados indican que los tratamientos culinarios con AOVE (solo o en mezcla con agua) incrementan la CA, y el PAG de la calabaza cambia hasta igualarse con el del aceite absorbido. Por lo tanto, el uso rutinario del AOVE durante la elaboración doméstica de alimentos no solo garantiza la estabilidad frente al deterioro relacionado con la exposición de aceites a altas temperaturas; también mejora el perfil nutricional y funcional de los alimentos que lo incluyen, independientemente de la técnica elegida.

C5 Lactobacillus paracasei CNCM I-4034 disminuye la respuesta inflamatoria inducida por Salmonella typhi en células Caco-2

Muñoz Quezada S¹, Bernúdez-Brito M², Gómez Llorente C², Matencio E¹, Bernal M¹, Romero F², Gil A¹

¹Universidad de Granada. ²Instituto de Nutrición Infantil Hero. España.

Introducción: Las células epiteliales intestinales son un componente importante en la respuesta inmunitaria y responden a una variedad de estímulos incluyendo a bacterias comensales y patógenas. La interleuquina 8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral- (TNF- son producidos por macrófagos y otros tipos de células como los enterocitos, involucrados en la respuesta inmunitaria de la mucosa. Los probióticos podrían proteger frente al daño intestinal producido por patógenos, aunque los mecanismos involucrados son aún desconocidos.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue determinar si *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 protege a las células intestinales Caco-2 de la respuesta inflamatoria producida por una bacteria enteropatógena, a través de la modulación de la secreción de citoquinas por parte de las células Caco-2.

Metodología: Las células Caco-2 fueron incubadas durante 4 horas con *Salmonella typhi* CECT 725 (1-2 × 10⁷ UFC/ml) y/o *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 (1-2 × 10⁸ UFC/ml). La secreción de IL-8 y TNF-α de las células Caco-2 fue medida mediante el inmunoensayo MILLIplex™ kit utilizando el sistema Luminescence 200 basado en la tecnología xMap.

XIV CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN. ZARAGOZA 2012.

Nutr Hosp. 2012;27(5):3-66

oxidativo, el envejecimiento celular y algunas enfermedades. El estilo de vida actual está favoreciendo la acumulación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno en nuestro organismo y como consecuencia de ello un aumento del nivel oxidativo a nivel fisiológico. Por esto es recomendable el aporte de antioxidantes de carácter exógeno. Los productos naturales que predominan en la terapéutica natural contienen una serie de principios activos que, a parte de ser los constituyentes químicos responsables de los efectos terapéuticos de las plantas vegetales, también pueden ser responsables de su actividad antioxidante.

Objetivo: Estudiar la actividad antioxidante de diferentes plantas medicinales a partir de infusiones vegetales empleadas en la medicina tradicional española y comercializadas en el área geográfica de Granada.

Método: Se analizaron 37 plantas medicinales a partir de la infusión de 2 g de planta en 150 ml de agua a 98^º C durante 7 minutos. Posteriormente se evaluó la actividad antioxidante de la infusión mediante 4 métodos distintos (ABTS, DPPH, FRAP y Folin-Ciocalteu). Así mismo se evaluó la ingesta de compuestos antioxidantes a partir de la actividad antioxidante obtenida y el consumo promedio en España de los alimentos estudiados (MAPA, 2010).

Resultados: Se observó que las infusiones con mayor actividad antioxidante fueron el grupo de los tés (verde, blanco, rojo, negro) seguidos del orégano y la melisa. Si se tiene en cuenta el consumo de infusiones, se observó que los tés son una gran fuente de antioxidantes, pero que las infusiones en general, incluso la manzanilla, contribuyen en gran medida a la ingesta de compuestos antioxidantes.

Discusión/conclusión: Los datos obtenidos demuestran que las plantas medicinales, a parte de su actividad terapéutica, son una fuente muy importante de compuestos con actividad antioxidante en la dieta española.

P067 Evaluación del contenido de melanoidinas y su actividad antioxidante en alimentos de la dieta española procesados térmicamente

Samaniego Sánchez C, Pastoriza de la Cueva S, Rufian JA
Dpto. Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

El tratamiento térmico es muy común durante el procesamiento y/o cocinado, así como durante la conservación de los alimentos. Así, el procesamiento térmico permite mejorar atributos de valor y de salud de los alimentos. Los tratamientos de esterilización, fritura, tostado, horneado, etc.

llevan intrínsecos una serie de transformaciones en el alimento que conducen a la formación de nuevos compuestos que inciden, de manera general, en la aceptabilidad del producto por el consumidor. La reacción de Maillard es la responsable de muchos de los colores y sabores existentes en todos los alimentos procesados térmicamente. En las últimas etapas de dicha reacción se producen unos compuestos de color pardo y alto peso molecular conocidos como melanoidinas. Estos compuestos presentan una actividad antioxidante potente, de forma que podrían ser usadas para elaborar alimentos con propiedades funcionales.

Objetivo: Determinar el contenido de melanoidinas de diversos alimentos procesados térmicamente, evaluar su actividad antioxidante y determinar el aporte de compuestos antioxidantes que hacen en la dieta española.

Método: Se extrajeron las melanoidinas de 16 alimentos que sufren un procesamiento térmico intenso durante su elaboración y se evaluó su actividad antioxidante mediante 5 métodos (ABTS, DPPH, FRAP, HOSC y Folin-Ciocalteu). Así mismo se evaluó la ingesta de compuestos antioxidantes a partir de la actividad antioxidante obtenida y el consumo promedio en España de los alimentos estudiados (MAPA, 2010).

Resultados: Se observó que los alimentos con mayor actividad antioxidante son el café, seguido del vinagre balsámico y el vino dulce. Sin embargo, cuando se tiene en cuenta su consumo diario, los alimentos que aportan al día más compuestos antioxidantes (derivados de la reacción de Maillard) son el café, las galletas y la cerveza rubia.

Discusión/conclusión: Los datos obtenidos demuestran que los alimentos procesados térmicamente son una fuente a tener en cuenta de poder antioxidante en la dieta española.

P068 Perfil de ácidos grasos y contenido fenólico total en aceite de oliva virgen extra tratado térmicamente

Samaniego Sánchez C, Cordero Flores OJ, Ramirez Anaya JP, Villalon Mir M, López García de la Serrana H
Dpto. Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

El aceite de oliva virgen extra (AOVE) es uno de los componentes que caracterizan la Dieta Mediterránea, a cuyo consumo se asocian beneficios para la salud relacionados con el perfil de ácidos grasos (PAG) y microconstituyentes bioactivos como los antioxidantes polifenólicos. La manipulación previa al consumo de los alimentos causa variaciones en su composición relacionadas prin-

cialmente con los incrementos de temperatura a los que también es susceptible el AOVE dada su participación en la alimentación como ingrediente y medio de transferencia de calor. El objetivo fue cuantificar el CFT (método de Folin Ciocalteu) y el PAG (cromatografía de gases) en AOVE fresco y tratado a las temperaturas de 3 tratamientos culinarios de uso frecuente a nivel doméstico (fritura, rehogado y cocción). Los tratamientos térmicos cambiaron significativamente el CFT. El aceite rehogado presentó la mayor concentración siguiendo en orden decreciente: frito, crudo y cocido; en este último, se observó la difusión de los fenoles hacia el agua de ebullición. En cuanto al PAG, entre el 95 al 97% de la grasa extraída de las muestras está constituida por los ácidos palmítico (9%), esteárico (3%), oleico (77%), y linoléico (6%); en el caso de la fritura, hubo un incremento leve del porcentaje de ácidos grasos insaturados acompañado de un descenso en los mono y poliinsaturados; sin embargo, las diferencias no fueron significativas respecto al aceite crudo o el experimentado en cualquiera de los tres procesos investigados. Los resultados indican que los tratamientos culinarios (AOVE solo en mezcla con agua) cambian la CFT, sin embargo el PAG permanece constante. Por lo que, dada la estabilidad del PAG, una adecuada elección de los métodos a nivel doméstico garantizará un aporte óptimo de antioxidantes polifenólicos.

P069 Efectos de la manipulación sobre la calidad higiénica de aceite de oliva

Samaniego Sánchez C¹, Nassira El haouhay¹, Asehraou A², Villalon Mir M³, López García de la Serrana H⁴

¹Dpto. Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. ²Department of Biology. Faculty of Sciences. University Mohamed Premier. Oujda. Marruecos.

Introducción: El aceite de oliva es un alimento fundamental de la dieta mediterránea. Su consumo es beneficioso gracias a su contenido en ácidos grasos insaturados y en componentes antioxidantes. Diferentes factores influyen en la calidad del mismo entre ellos la manipulación durante las etapas de su producción. La manipulación inadecuada junto al mal almacenamiento de la aceituna, afectan negativamente a la calidad higiénica del mismo.

Material/métodos: Se han analizado 46 tipos de aceites procedentes de almazaras tradicionales marroquíes, que escapan a cualquier tipo de sistema de control de calidad. Se han realizando análisis microbiológicos y pruebas de calidad según los métodos actuales recogidos en la reglamentación española. Las muestras están clasificadas en 3 grupos según el tiempo de almacenamiento de las aceitunas antes de su trituración: Grupo A: 1 a 7 días. Grupo B: 15 a 20 días y Grupo C: 20 a 40 días. **Resultados/conclusiones:** Los resultados indican presen-

cia de grados de acidez de 0,56-1,97% en el grupo A, de 2,74-8,14% en el grupo B y de 0,57-17,79% en el grupo C. Los análisis microbiológicos muestran la presencia de Mesófilos, Psicrotróficos, Levaduras y Mohos, en todos los grupos, y ausencia de Enterobacterias. Estos microorganismos producen lipasas que provocan la hidrólisis de los triglicéridos, aumentando la producción de los ácidos grasos libres que se traduce por un grado de acidez alto. La mayoría de las muestras de aceite de grupos B y C presentan grado de acidez elevado, así clasificados como lampantes según el Reglamento de la Unión Europea (CE 2002). La manipulación inadecuada de las aceitunas, las incorrectas condiciones de su almacenamiento, la falta de control higiénico y la conservación del aceite en envases no adecuados, favorecen el crecimiento de microorganismos, mermando la calidad microbiológica higiénica y nutritiva del aceite.

P070 Efecto del envasado en vidrio en la composición de dos variedades de judías del ITACYL, "almonga" y "curruquilla"

Asensio-Vegas C¹, Pedrosa MM², Olmedilla-Alonso B³, Asensio M⁴C, Manzanera S⁵, Ibeas-García A⁶

¹Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ETL). Palencia. ²Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (Dpto. Tecnología de los Alimentos). Madrid. ³Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (Dpto. Metabolismo y Nutrición). Madrid. ⁴Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Área de Agricultura). Valladolid.

La judía común (*P. vulgaris* L.) es la leguminosa de consumo humano más importante a nivel mundial por su gran valor nutricional. Sólo con aumentar su consumo podrían llegar a reducirse algunas enfermedades crónicas y situaciones de malnutrición. Para su consumo es necesario el tratamiento térmico, que elimine sus factores antinutricionales.

Material y métodos: Se ha estudiado el efecto del envasado en vidrio (remojo, escaldado a 70° C durante 9' y cocción a 116 °C durante 42') en dos variedades de judías, 'Almonga' (grano blanco) y 'Curruquilla' (grano crema), en los compuestos bioactivos (azúcares solubles, inositol fosfatos totales (IP), inhibidores de tripsina (IT), lectinas (PHA) y fenoles totales), en la actividad antioxidante, en el contenido mineral y en componentes nutricionales (proteína, grasa, fibra alimentaria, almidón, amilosa y amilopectina).

Resultados: El proceso reduce en ambas variedades el contenido en sacarosa y oligosacáridos de la familia de la rafinosa. Hay una reducción del 50% en el contenido total de IP y del 98% en IT. En crudo difieren significativamente en lectina, eliminándose ésta en las dos tras el tratamiento térmico. El proceso reduce el contenido fenólico en ambas

VII CONGRESO INTERNACIONAL. NUTRICIÓN, ALIMENTACION Y DIETÉTICA. XV JORNADAS NACIONALES DE NUTRICIÓN PRÁCTICA. MADRID 2011.

respectively). Total n-3 PUFA were around 2.5 g/100 g (of which approximately 500 mg/100 g were long chain n-3 PUFA) in reformulated frankfurters as opposed to around 0.11 g/100 g in all-pork-fat product. PUFA/SFA and n-6/n-3 PUFA ratios in control sample were 0.3 and 9.3; in reformulated frankfurters the PUFA/SFA ratio was higher (1.7) and the n-6/n-3 PUFA ratio was lower (0.5). This type of meat product with a low level of SFA and a high level of PUFA (including LC n-3 PUFA) approximates more to dietary recommendations for optimal intake of total, saturated and unsaturated fatty acids without compromising their technological, microbiological and sensorial properties.

NUEVO MÉTODO DE MEDIDA CROMATOGRÁFICA PARA DETERMINAR COMPONENTES BIOACTIVOS EN EL LYCOPERSICON ESCULENTUM MILL

Samaniego Sanchez C, Stagno C, Quesada Granados JJ, Blanca Herrera R, Brandolini V, López García de la Serrana H

Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, España. Laboratorio Chimica degli Alimenti, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Ferrara, Italia. csama@ugr.es

INTRODUCCIÓN: El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) constituye un alimento básico en la dieta y es una fuente importante de múltiples sustancias bioactivas con función antioxidantes. Un consumo elevado de estos compuestos presenta efectos beneficiosos para la salud humana y está asociado directamente con una disminución en las enfermedades relacionadas con el stress oxidativo. Rico en vitaminas, minerales, compuestos fenólicos y carotenoides, destaca el licopeno y β - caroteno responsables mayoritariamente del color característico del tomate, con una importante función biológica y elevada función antioxidante. El contenido de ambos componentes varía en función a la variedad del tomate, grado de maduración y condiciones agronómicas-ambientales durante el crecimiento. **OBJETIVO:** Caracterización de diferentes variedades de tomate, cuantificando el contenido en licopeno y β - caroteno aplicando un nuevo método rápido de medida por cromatografía líquida. **MATERIAL Y METODOS:** El estudio se ha realizado en diversas variedades locales de tomate, cultivados en la zona costera de Granada (España). Se ha desarrollado un método de HPLC para identificar y cuantificar de manera simultánea los componentes antioxidantes presentes en el tomate, licopeno y β - caroteno. **RESULTADOS:** El método puesto a punto ha demostrado ser simple, rápido, requiere poca cantidad de muestra, y con los parámetros analíticos se puede concluir que el método es preciso (RSD < 3%), exacto (Recuperación de 96-100%), específico, con excelente sensibilidad y linealidad ($r^2=0,999$). Todas las variedades de tomate presentaban un alto contenido en licopeno y β - caroteno, con valores comprendidos entre $(1,76 \pm 0,34- 21,83 \pm 4,82 \text{ mg}/100\text{g}$ y $14,07 \pm 4,12 - 52,92 \pm 6,13 \text{ mg}/100\text{g}$) respectivamente, dependiendo mucho su contenido del grado de maduración y variedad del tomate. **CONCLUSIÓN:** La eficacia del método desarrollado permite una rápida cuantificación de ambos componentes antioxidantes presentes en el tomate, y que podría ser aplicado para su cuantificación a otros productos industriales derivados de dicho vegetal. Es importante la determinación de estos componentes ya que en cierta medida son los responsables de las características organolépticas y nutri-

cionales del alimento y que presentan una importante acción beneficiosa para el organismo.

PREVALENCIA DE SÍNDROME METABÓLICO EN LA COSTA GRANADINA Y SU RELACION CON EL IMC

Millán-Rodríguez S, Samaniego-Sánchez C, Quesada-Granados JJ, López-García de la Serrana H

Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, csama@ugr.es

Introducción: Es importante para la salud pública conocer la incidencia de síndrome metabólico (SM) en la población. Se sabe que la prevalencia de SM depende de muchos factores como el sexo, la raza, la distribución geográfica. El índice de masa corporal (IMC) constituye uno de los métodos, entre los antropométricos para evaluar el estado nutricional, más utilizados por su simplicidad de obtención y análisis. **Objetivos:** Calcular la prevalencia de SM en la Costa Granadina. Estudiar en dicha población el IMC y su relación con el SM. **Método:** Se estudiaron 119 individuos de la Costa Granadina. Todos los sujetos, previo consentimiento por escrito, fueron sometidos a un estudio individualizado que incluía medidas antropométricas para la obtención del IMC, así como controles de Colesterol -HDL, triglicéridos, glucosa basal, presión arterial y circunferencia abdominal. Usando los criterios de diagnóstico de la ATP III 2001 (Adult Treatment Panel III) se clasificó a la población en dos grupos: Individuos con SM e Individuos sin SM o control. Los datos obtenidos fueron convenientemente tratados con el paquete estadístico SAS. **Resultados:** Se obtuvo una prevalencia con SM del 20,2% de la población, de los cuales el 58,3% eran mujeres. Los resultados obtenidos reflejan diferencias estadísticas significativas para el IMC entre individuos clasificados con SM, frente al grupo de individuos control. **Discusión/Conclusión:** Estudios de intervención similares coinciden con el nuestro, que la prevalencia de SM es significativamente mayor en poblaciones del Sur de España respecto a poblaciones del Norte peninsular. El índice de masa corporal (IMC) en individuos con SM es mayor que en aquellos otros clasificados como grupo control, siendo el valor en todos los casos superior a 30 (obesidad según la OMS).

MODIFICACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE CALABAZA SEGÚN EL TRATAMIENTO CULINARIO PRACTICADO

Ramírez-Anaya JP, Samaniego-Sánchez C, Villalón-Mir M, López-García de la Serrana H

Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. csama@ugr.es

INTRODUCCIÓN: La calabaza es un alimento no muy habitual en nuestra ya reconocida Dieta Mediterránea, sin embargo su destacado aporte en betacarotenos (provitamina A), pigmentos que le confieren su característico color anaranjado, hacen que el consumo habitual de calabaza contribuya a prevenir el daño originado por los radicales libres, gracias al carácter antioxidante. Actualmente las prácticas culinarias y gastronómicas han cambiado considerablemente, lo cual resulta de interés a la hora de deter-

minar la influencia que estas técnicas pueden tener sobre componentes básicos y vitales para el buen funcionamiento de nuestro organismo. **OBJETIVO:** Determinar la influencia que diversas técnicas culinarias propias de la cocina mediterránea tienen sobre el contenido en componentes bioactivos presentes en esta hortaliza y su relación directa con la pérdida de capacidad antioxidante (CA) y el contenido fenólico total (CFT). **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se han seguido tres técnicas culinarias (fritura, rehogado y cocción) que utilizan como medio de transferencia de calor, aceite o agua. Se calculó la retención y distribución de los polifenoles totales (método de Folin Ciocalteu) y de la capacidad antioxidante determinada por el método basado en el poder antioxidante del hierro reductor (FRAP) en el aceite y la calabaza fresca, y en los recuperados tras la aplicación de los tres tratamientos culinarios. Se ha utilizado para el estudio de los resultados el análisis de varianza y la comparación de medias con un nivel de significancia del 5%. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN:** La CA en la calabaza, tras la primera fritura, es superior a la obtenida por cualquier otro tratamiento culinario. No obstante, el contenido en Fenoles Totales (CFT) disminuyó con la fritura y rehogado, mientras que aumentó en la calabaza cocida. El AOVE presentó el mayor valor de capacidad antioxidante en los diferentes tratamientos, excepto en el rehogado con alimento. En la calabaza frita se midieron los valores más altos de todas las fracciones recuperadas durante el estudio y le siguieron en orden decreciente la rehogada, cruda y cocida. En contraposición a la tendencia del CFT, la retención de la CA de la calabaza cocinada usando aceite como medio de transferencia de calor incrementó respecto a la de la verdura cruda o cocida en agua ya que parte de la fracción fenólica del aceite pasa a la verdura. La adecuada elección de los métodos culinarios maximizarán la CA y el aporte de polifenoles del AOVE y la calabaza a la dieta.

ANÁLISIS DE FITOESTRÓGENOS EN CERVEZAS ESPAÑOLAS Y ESTIMACIÓN DE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Palacín-Arce A, Hernández-Elizondo J, Mariscal-Arcas M, Monteagudo C, Hamdan May, Rivas-Velasco A, López-Martínez MC, Olea-Serrano F

Dpto. Nutrición y Bromatología. Universidad de Granada. alba979@hotmail.com

Introducción: La cerveza es una bebida milenaria originaria de la cultura mediterránea clásica, vinculada desde la antigüedad a fines terapéuticos. Además de formar parte de la alimentación mediterránea, su consumo moderado puede mejorar la calidad nutricional de la dieta. **Objetivo:** Analizar la concentración de distintos fitoestrógenos presentes en diferentes tipos de cerveza española y estimar su capacidad antioxidante. **Material y métodos:** Muestras. Se analizaron catorce marcas de cervezas españolas, facilitadas por el Centro de Cerveza y Salud. **Método analítico.** La extracción de los fitoestrógenos de las muestras de cerveza, se realizó mediante extracción líquido-líquido y mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se determinó la presencia de daizdeína, xanthohumol, genisteína, enterodiol, coumestrol, enterolactona, formononetin, equol y 8-prenylaringenina. **Estimación de la capacidad antioxidante.** Tomando como punto de corte la mediana de la concentración de cada uno de los fitoestrógenos analizados, se ha desarrollado un índice de calidad

antioxidante. La escala de este índice va de 0 (capacidad antioxidante mínima) a 7 (capacidad antioxidante máxima). El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), utilizando diferentes técnicas descriptivas (medias, desviaciones estándar, y test de distribución de normalidad). **Resultados** Todas las marcas españolas de cerveza analizadas contienen fitoestrógenos. La daizdeína es el fitoestrógeno que se presenta en mayor cantidad en las muestras analizadas. Los valores se sitúan entre los 5.573(1.72) µg/100 mL de la muestra 12 y los 3.463(1.25) µg/100 mL de la muestra 13. También se detectaron genisteína, formononetin y equol, en cantidades menores con respecto a la daizdeína. Estos compuestos presentan valores medios de 0.528(0.404), 0.133(0.118) y 0.001(0.001) µg/100mL, respectivamente. La daizdeína, genisteína, formononetin y Biochanin A son los que contribuyen en mayor medida, al aporte de fitoestrógenos de la cerveza. La capacidad antioxidante media de las cervezas analizadas es 2.14, adoptando un valor mínimo de 0 y máximo de 4. Las muestras 3 y 10 son las que presentan un mayor potencial antioxidante, mientras que las muestras 6 y 11 presentan valores más bajos. **Conclusión** Se han analizado 14 muestras de cervezas españolas, identificándose y cuantificándose la presencia de 7 fitoestrógenos. Esto ha permitido evaluar la capacidad antioxidante total de las cervezas.

PROPUESTA DE UN ÍNDICE DE CALIDAD DE LA GRASA DE LA DIETA (ICGD)

Monteagudo C, Caballero ML, Pardo-Vásquez MI, Segovia L, Mariscal-Arcas M, De la Torre-Robles A, Murcia-Tomas MA, Lorenzo-Tovar ML

Dpto. Nutrición y Bromatología. Universidad de Granada. celiams@ugr.es

Introducción: Los cambios sociales acontecidos en los últimos 40 años en nuestra sociedad, han alterado el patrón de consumo tradicional y promueven estilos de vida más sedentarios. Estos hallazgos explican la aparición temprana de enfermedades relacionadas con la dieta. **Objetivos:** Valorar el perfil lipídico de la dieta de una población mediante la propuesta de un Índice de Calidad de la Grasa de la Dieta (ICGD). **Material y Métodos:** Población. La muestra estudiada está formada por 847 niños y niñas de Granada, de edades comprendidas entre 8 y 10 años. **Recogida de datos.** Se han empleado tres recordatorios de 24h para analizar la ingesta dietética de dos días laborables y un día festivo. Los menús se han valorado con el programa informático Dietsource. ICGD. Teniendo en cuenta las recomendaciones para la población española dadas por Olga Moreiras y col (2007), se ha puntuado positivamente cuando dichas recomendaciones quedan cubiertas. La escala del índice va de 0 a 11 (<4, calidad baja; 4-7 calidad media; >7, calidad alta). El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), utilizando diferentes técnicas descriptivas (medias, desviaciones estándar, medianas y test de distribución de la normalidad). **Resultados:** La ingesta energética procedente de los lípidos de la dieta de los sujetos analizados, supone un 41,60% (15,52%) de la ingesta energética total del día; sólo el 16% de los sujetos analizados están dentro de la recomendación (<35% de la energía total). La energía media aportada a partir de AGS, AGM y AGP, respecto a la energía total, es de 14,08% (5,75%), 17,01 (7,42%) y 4,21% (2,25%), respectivamente. El valor medio

II CONGRESO FESNAD. HACIA UNA ALIMENTACIÓN RESPONSABLE. BARCELONA 2010

Nutr Hosp Vol. 25. Suplemento 1. Marzo 2010

que el producto cumplió con las especificaciones de las Normas Oficiales Mexicanas. El análisis sensorial se realizó con 84 paneístas no entrenados con edades comprendidas entre 8-16 años. La bebida fue aceptada reportando un promedio general de los parámetros evaluados de 3.78, lo que correspondió a una calificación de "me gusta mucho".

Conclusión: Se concluye que se logró la elaboración de la bebida planteada gracias a la fermentación con *Lactobacillus acidophilus* cepa *Boucardii*, que además fueron recuperados en el producto terminado. El contenido proteico de la bebida fue similar al de la leche (4%), con una buena aceptación en el análisis sensorial y cumplió con las especificaciones sanitarias de la Norma Oficial mexicana (NOM-185-SSA1-2002).

P146 Influencia de las técnicas culinarias sobre la actividad antioxidante y contenido fenólico total en aceite de oliva virgen extra

Ramírez Anaya JP, Samaniego Sánchez C, López García de la Serrana H, Villalón Mir M
Dpto. Nutrición y Bromatología Facultad de Farmacia Universidad de Granada.

Introducción: El aceite de oliva virgen extra (AOVE) es uno de los componentes que caracterizan la Dieta Mediterránea, a cuyo consumo se asocian beneficios para la salud relacionados con micro constituyentes bioactivos como los antioxidantes polifenólicos. La manipulación previa al consumo de los alimentos causa variaciones en la capacidad antioxidante (CA) y en el contenido de fenoles totales (CFT) a las que también es susceptible el AOVE.

Objetivo: Estudiar el efecto que tienen ciertos tratamientos culinarios de uso frecuente a nivel doméstico (fritura, rehogado y cocción) sobre el AOVE, ya sea utilizado como ingrediente o como medio de transferencia de calor.

Métodos: Para ello se ha analizado el CFT (método de Folin Ciocalteu) y la CA a través de 4 métodos DPPH, ABTS, FRAP y DPMD en los extractos metanólicos y en el agua de cocción de muestras comerciales de aceite. A los resultados obtenidos se aplicó el análisis de varianza y la comparación de medias con un nivel de significancia del 5%.

Resultados: Los tratamientos térmicos afectaron significativamente el CFT y la CA. La fritura ocasionó un descenso de la CFT, más acentuado durante la inmersión que en el rehogado; mientras que en la cocción se verificó la difusión de los fenoles desde el AOVE hacia el agua de ebullición. La CA presentó patrones de reduc-

ción semejantes a la CFT y mantuvo una correlación positiva y significativa con este parámetro. El método de cuantificación originó variaciones en la medida de la CA; sin embargo, la interpretación conjunta de la CA obtenida con los cuatro métodos facilita la comprensión del mecanismo antioxidante involucrado.

Conclusión: La adecuada elección de los métodos y condiciones de elaboración culinaria optimizarán la CA y el aporte de polifenoles del AOVE a la dieta.

P147 Efecto de la irradiación en embutidos madurados Ready-To-Eat (RTE) elaborados con piel de tomate como fuente de licopeno

Selgas Cortecero M^ªD¹, Gámez Losada C¹, Calvo Rodríguez MM², García Sanz M^ªL¹
¹Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense Madrid.
²Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI), Instituto de Ciencia Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN). CSIC.

Introducción: La piel de tomate seca (PTS) ha sido utilizada con éxito como fuente de licopeno para la elaboración de productos cárnicos madurados potencialmente funcionales.

Objetivo: Conocer si el tratamiento con radiaciones ionizantes es adecuado para la obtención de productos cárnicos madurados RTE enriquecidos con licopeno, estudiando los cambios que se producen en las características físico-químicas y sensoriales.

Materiales y métodos: Se elaboraron salchichones con 0 y 2% de PTS, se lonchearon, envasaron a vacío y sometieron a radiaciones (0, 2 y 4 kGy) (IONMED, S.A., Tarancón, Cuenca). Se estudió el efecto en la microbiota (total, láctica y micrococacea), concentración de licopeno (HPLC), color (sistema CIE L*a*b*), textura (análisis de perfil de textura) y aceptabilidad sensorial (análisis preferencial). Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA de una vía.

Resultados: Los tratamientos con 2 kGy redujeron la microbiota entre 2 y 3 ciclos logarítmicos; la aplicación de 4 kGy produjo una reducción adicional de 3-4 ciclos logarítmicos. La concentración de licopeno aumentó de $1,20 \pm 0,75$ en los salchichones control a $1,59 \pm 0,8$ mg/100g en los irradiadas a 4 kGy lo que podría deberse a que esta dosis induce cambios en la estructura de la PTS que favorezcan la extracción del caroteno. La irradiación modificó el color de las muestras con PTS, fundamentalmente el parámetro b* donde los valores fueron de $11,11 \pm 1,20$ y $13,27 \pm 0,95$ en los lotes irradiados a 0 y 4 kGy, respectivamente ($p < 0,05$). La irradiación no tuvo una influencia significativa en la textura; así, la

XXIX CONGRESO INTERNACIONAL SFML. GRANADA 2010

138

COMUNICACIONES POSTERS

SFML – GRANADA 2010



INFLUENCIA DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CULINARIOS SOBRE EL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE LA PATATA

J.P. Ramírez-Anaya; C. Samaniego-Sánchez; M. Villalón-Mir; H. López-García de la Serrana

Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
Granada, España. csama@ugr.es

PALABRAS CLAVE: Cocción, fritura, rehogado, fenoles totales, capacidad antioxidante, patata.

INTRODUCCIÓN:

El aceite de oliva virgen extra (AOVE) y la patata son alimentos característicos en la Dieta Mediterránea, a su consumo se asocian beneficios para la salud relacionados con microconstituyentes bioactivos como los antioxidantes polifenólicos. La transformación previa al consumo de los alimentos causa variaciones en la retención y distribución de la capacidad antioxidante (CA) y en el contenido de fenoles totales (CFT)

OBJETIVO:

Cuantificar la variación de la retención y distribución de CFT y la CA en AOVE, agua, y patatas tras la elaboración con 4 técnicas culinarias.

METODOLOGÍA:

Se calculó la retención y distribución del CFT (método de Folin Ciocalteu) y de la CA determinada por 4 métodos [Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS); 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH); N,N-dimetil-p-fenilendiamina dihidrocloruro (DMPD) y, el basado en el poder antioxidante del hierro reductor (FRAP)] en AOVE, agua y patatas frescas, y en los recuperados tras la aplicación de 3 tratamientos culinarios (fritura, rehogado y cocción) de uso frecuente a nivel doméstico. Se ha utilizado para el estudio de los resultados el análisis de varianza y la comparación de medias con un nivel de significancia del 5%.

CONCLUSIÓN /DISCUSIÓN:

El AOVE en los diferentes tratamientos tenía la mayor CFT del estudio, sobresaliendo el crudo. En el caso de la patata, tras la fritura se midieron valores superiores al resto de tratamientos. La retención de FT (suma del contenido de todos los ingredientes) disminuyó con la fritura y rehogado, la tendencia contraria solo se confirmó en el agua y la patata durante la cocción. El AOVE presentó el mayor contenido en CA en los diferentes tratamientos, excepto en el rehogado con alimento; mientras que la más baja correspondió al agua (cruda, cocción testigo y con patata). En la patata frita se midieron los valores más altos de todas las fracciones recuperadas durante el estudio, y le siguieron en orden decreciente la rehogada, cruda y cocida. En contraposición a la tendencia del CFT; la retención de la CA (métodos ABTS, DPPH, DMPD y FRAP) de los ingredientes elaborados mostró tendencia a incrementar respecto a la de los ingredientes crudos. El método de cuantificación originó variaciones en la magnitud de la CA; sin embargo, la interpretación conjunta de la CA medida con los cuatro métodos facilita la comprensión del mecanismo antioxidante involucrado. La adecuada elección de los métodos y condiciones de elaboración culinaria maximizarán la CA y el aporte de polifenoles del AOVE y la patata a la dieta.

BIBLIOGRAFÍA:

- Kafoğropoulos N., Mylona A., Chiou A., Ioannou M.S., Andrikopoulos N.K. (2007). Retention and distribution of natural antioxidants (α -tocopherol, polyphenols and terpenic acids) after shallow frying of vegetables in virgin olive oil. *LWT*. 40:1008-1017.
- Samaniego C., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C., Quesada J.J., López H., López M.C. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal. Chim. Acta*. 593: 103-107.
- Chuah A. M., Ya-Chi L., Yamaguchi T., Takamura H., Li-Jun Y., Matoba T. (2008). Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chemistry*. 111: 20-28.