



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA.

NUTRICION Y BROMATOLOGIA

CARACTERIZACION DE FRACCIONES
POLIFENOLICAS DE LA FRESA
Y SUS IMPLICACIONES TECNOLOGICAS

TESIS DOCTORAL

MARIA DE FATIMA ALVES PINTO LOPES DA SILVA

2004



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología

CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES POLIFENÓLICAS DE LA FRESA Y SUS IMPLICACIONES TECNOLÓGICAS

Trabajo presentado para la obtención del
grado de Doctor

Maria de Fátima Alves Pinto Lopes da Silva

2004



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA,
NUTRICION Y BROMATOLOGIA

Celestino Santos Buelga, Catedrático del Área de Nutrición y Bromatología, y María Teresa Escribano Bailón, Profesora Titular de Escuela Universitaria del Área de Tecnología de Alimentos, y directores del trabajo *Caracterización de Fracciones Polifenólicas de la Fresa y sus Implicaciones Tecnológicas*, realizado por **María de Fátima Alves Pinto Lopes da Silva** para optar al título de Doctora por la Universidad de Salamanca, autorizan la presentación del mismo, al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

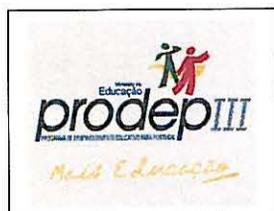
Salamanca, 22 de julio de 2004

Celestino Santos Buelga

María Teresa Escribano Bailón

Para la realización de este trabajo, se ha contado con los siguientes apoyos institucionales:

- Financiación concedida por el Fondo Social Europeo en el ámbito de la Medida n.º 5/Ação n.º 5.3: *Formação Avançada no Ensino Superior – Formação de Formadores*, del *Programa de Desenvolvimento Educativo para Portugal - PRODEP (III)* (referencia **5.3/N/199.006/00-Doutoramento**);



- financiación de la Junta de Castilla y León (España) aportada a través del proyecto "Caracterización de la fracción polifenólica de la fresa y sus implicaciones tecnológicas" (referencia **SA086/01**);



- apoyo logístico de la fábrica *Dulces y Conservas Helios* (Valladolid, España).

*Esta Tesis está dedicada a mis padres
y a mi tesoro, mi hija Clara*

Agradecimientos

Para la realización de este trabajo tuve el privilegio de contar con la dirección del Dr. Celestino Santos Buelga y de la Dra. María Teresa Escribano Bailón. Al Profesor Santos Buelga le agradezco la confianza depositada en mí al haberme aceptado como doctoranda suya, haberme integrado en su equipo y haberme proporcionado las condiciones para llevar a cabo este trabajo, además de la amistad que me dispensó. A ambos, les estoy agradecida por lo que me enseñaron, por el superior asesoramiento científico y por su ayuda en la fase de redacción de esta memoria.

Al Dr. Julián Rivas Gonzalo y a la Dra. Concepción García Moreno les agradezco las sugerencias, la disponibilidad permanente para ayudarme y su amabilidad.

La Dra. Sonia de Pascual Teresa fue la persona con la que más aprendí en aspectos de orden práctico en los primeros años de trabajo experimental, por lo que le expreso también mi gratitud. A ella y a la Dra. Ana González Paramás, también agradezco el apoyo en la realización de los ensayos de espectrometría de masas.

A la Dra. Emilia Labrador Encinas, del Departamento de Fisiología Vegetal, le agradezco la colaboración en la cromatografía de gases.

A los restantes profesores del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología reconozco su simpatía, y al Dr. Alfonso Gómez Báñez agradezco además haber amablemente compartido su despacho conmigo.

A María José Sierra Cuadrado agradezco su ayuda, siempre que la he solicitado.

A todas las compañeras del laboratorio les agradezco su incentivo y buen humor, y a Pilar Martín haber compartido sus conocimientos prácticos, tal como Susana González

Manzano y Nuria Solozábal Dueñas quienes, además de prestar apoyo en los ensayos con DMACA, me regalaron su amistad.

Al Dr. José Joaquín Pérez Alonso recurrí en numerosas ocasiones para aclarar dudas, especialmente las relacionadas con aspectos de Química, y correspondiendo siempre de forma inmediata a mis solicitudes, me ha prestado ayudas preciosas. La amistad y el trato amable y educado que siempre me dispensó, no los olvidaré.

Glenda Macz ha sido la compañera de Tesis que todos quisieron haber tenido. Disponible en todo momento para enseñarme y ayudarme, para oírme y hacerme reír, fue una amiga dentro y fuera del laboratorio.

En Portugal, al Instituto Politécnico de Bragança y a la Escola Superior Agrária les manifiesto mi gratitud por haberme concedido facilidades para conjugar el trabajo de docencia con la realización del Curso de Doctorado y el haberme estimulado a la realización de esta Tesis.

Finalmente, a mi familia más cercana, agradezco TODO el apoyo emocional y logístico que me concedieron, y la confianza que siempre depositaron en mí. A la hermana más perfecta, Ana, no tengo palabras para expresar lo que le debo. Su presencia diaria junto a mí en los últimos tres años, y la ayuda hasta el último momento de salida de esta memoria han sido de oro, como ella.

... Y el mejor estímulo, la sonrisa de Clara.

A todos expreso mi gratitud y reconocimiento

Bem Hajam

Salamanca, Julio de 2004.

Resumen

Se ha estudiado la composición de las fracciones antociánica y flavanólica de la fresa, así como las reacciones que los componentes más representativos de las mismas pueden sufrir en disoluciones modelo y en mermeladas y su influencia sobre la estabilidad del color de estos medios. Asimismo, se han realizado ensayos preliminares de intervención tecnológica encaminados a mejorar la estabilidad del color en mermeladas de fresa. El estudio de las fracciones fenólicas se realizó en cinco variedades de fresa (*cv. Camarosa, Eris, Carisma, Oso Grande y Tudnew*) utilizando métodos de análisis optimizados por HPLC con detección por espectrofotometría de diodos (DAS) y espectrometría de masas (MS). Se pudo así detectar la presencia en la fresa de treinta y un antocianos diferentes y establecer con cierta seguridad la identidad de la mayoría de ellos, algunos descritos por primera vez en este trabajo. Particularmente interesante fue la detección de cuatro pigmentos con una estructura correspondiente a dímeros de condensación flavanol-antociano. Igualmente, se determinó la composición en flavanoles mayoritarios de la fresa.

Los ensayos modelo realizados con pelargonidina 3-glucósido, antociano ampliamente mayoritario en la fresa, permitieron comprobar que la disponibilidad de oxígeno era el factor con más influencia sobre la estabilidad del antociano en disolución acuosa, mientras que la presencia de azúcares sólo mostraba un pequeño efecto protector frente las reacciones que conducían a su desaparición, y los flavanoles constituían un factor desestabilizante, en las condiciones de ensayo utilizadas. La cinética de desaparición del antociano se ajustaba inicialmente a un proceso de primer orden, cuya pendiente se encontraba influida por la composición del medio. Los análisis por HPLC-DAS-MS permitieron establecer la identidad de algunos de los principales

productos formados en la degradación del antociano y de su reacción con flavanoles.

Se comprobó que la incorporación de ácido pirúvico o de acetaldehído durante la elaboración de mermeladas conduce a una desaparición acelerada de antocianos y formación de nuevos pigmentos. En particular, el ácido pirúvico induce la formación de piranoantocianos, con un color más anaranjado y mayor estabilidad que los antocianos originales, haciendo que el color del producto permanezca más estable durante el almacenamiento que el de una mermelada convencional. Por su parte, el acetaldehído favorece la condensación con flavanoles, con formación de pigmentos con tonalidad más azulada que los antocianos, que progresan rápidamente hacia estructuras complejas, dando lugar a un producto con un color inadecuado e inestable.

PALABRAS CLAVE: fresa, antocianos, flavanoles, pelargonidina 3-glucósido, mermelada, color.

Resumo

Caracterização de Fracções Polifenólicas do Morango e Implicações Tecnológicas Associadas

Neste trabalho estudou-se a composição antociânica e flavanólica do morango, assim como as reacções que os componentes mais representativos destas fracções podem sofrer em soluções modelo e em compotas, e a sua influência sobre a estabilidade da cor destes meios. Realizaram-se também ensaios preliminares de intervenção tecnológica, com o fim de melhorar a estabilidade da cor de compotas de morango. O estudo das fracções fenólicas realizou-se em cinco variedades de morango (*cv. Camarosa, Eris, Carisma, Oso Grande e Tudnew*) utilizando métodos de análise optimizados por HPLC com detecção por espectrofotometria de diodos (DAS) e espectrometria de massas (MS). Pôde-se assim detectar no morango a presença de trinta e uma antocianinas diferentes e estabelecer com certa segurança a identidade da maioria delas, algumas das quais foram descritas pela primeira vez neste trabalho. Possui especial interesse a detecção de quatro pigmentos cujas estruturas correspondem a dímeros resultantes de condensação directa flavanol-antocianina. Determinou-se igualmente a composição do morango em flavanóis maioritários.

Os ensaios modelo realizados com pelargonidina 3-glucósido, antocianina amplamente maioritária no morango, permitiram comprovar que a disponibilidade de oxigénio era o factor com mais influência sobre a estabilidade da antocianina em solução aquosa, enquanto que a presença de açúcares só mostrava um pequeno efeito protector face às reacções que conduziam ao seu desaparecimento, e os flavanóis

constituíam um factor desestabilizante nas condições de ensaio utilizadas. A cinética de desaparecimento da antocianina ajustava-se inicialmente a um processo de primeira ordem, cujo declive se encontrava influenciado pela composição do meio. As análises por HPLC-DAS-MS permitiram estabelecer a identidade de alguns dos principais produtos formados na degradação da antocianina e da sua reacção com flavanóis.

Comprovou-se que a incorporação de ácido pirúvico ou de acetaldeído durante a elaboração de compotas conduz ao desaparecimento acelerado de antocianinas e à formação de novos pigmentos. Em concreto, o ácido pirúvico induz a formação de piranoantocianinas, com cor mais alaranjada e maior estabilidade que as antocianinas originais, fazendo com que a cor do produto permaneça mais estável durante o armazenamento que a de uma compota convencional. Por sua vez, o acetaldeído favorece a condensação com flavanóis, dando lugar a pigmentos com tonalidade mais azulada que as antocianinas, os quais progridem rapidamente até estruturas mais complexas, tendo como consequência o aparecimento de uma cor inadequada e instável.

PALAVRAS-CHAVE: morango, antocianinas, flavanóis, pelargonidina 3-glucósido, compota, cor.

Abstract

Characterization of Polyphenolic Fractions in Strawberry and their Technological Implications

The anthocyanin and flavanol composition of the strawberry were studied, as well as the reactions that the main components of those fractions may suffer, both in model solutions and in strawberry jams, and their influence on colour stability. Preliminary assays of technological intervention were also carried out in order to improve the colour stability in strawberry jams.

HPLC coupled to diode array spectrophotometry (DAS) and mass spectrometry (MS) detectors was used to analyse anthocyanins and flavanols in samples of five strawberry cultivars (*cv. Camarosa, Carisma, Eris, Oso Grande and Tudnew*). Thirty-one anthocyanin pigments were detected and identified according to their retention characteristics and absorption and mass spectra, some of which are described here for the first time. It was particularly noticeable the detection of four pigments whose structures correspond to flavanol-anthocyanin condensed dimers. Major flavanols in strawberry were also characterised.

Model assays performed with pelargonidin 3-glucoside (the major anthocyanin in strawberry) showed that oxygen availability was the most important factor on anthocyanin and colour stability, whereas the presence of sugar only provides small protection and flavanols showed a destabilizing effect in the conditions of assay. The kinetic of the anthocyanin disappearance fitted to a first order process whose slope depended on the composition of the medium. Major products from the anthocyanin degradation and their reaction with flavanols were also tentatively identified.

The addition of pyruvic acid or acetaldehyde during elaboration of strawberry jams led to a faster anthocyanin disappearance, which was accompanied by the formation of new pigments. Pyruvic acid gave rise to the formation of pyranoanthocyanin pigments showing a more orange hue and higher stability than the original anthocyanins, which provided a more stable colour during storage of the jam. Acetaldehyde induced condensation between anthocyanins and flavanols giving place to unstable bluish pigments, which resulted in an inappropriate changing colour in the strawberry jam.

KEY WORDS: strawberry, anthocyanins, flavanols, pelargonidin 3-glucoside, jams, colour.

ÍNDICE

PÁGINA

xí	Resumen
xiii	Resumo
xv	Abstract
xxi	Índice de Figuras
xxvii	Índice de Tablas
xxxí	Lista de Abreviaturas
1	INTRODUCCIÓN GENERAL
5	I – MARCO TEÓRICO
7	1 – Breves consideraciones sobre los compuestos fenólicos
11	2 – Compuestos fenólicos de la fresa
13	3 – Antocianos
13	3.1 - Estructura
15	3.2 – Equilibrios
17	3.3 – Estabilidad y reacciones
28	3.4 – Interés tecnológico
31	3.5 – Extracción, purificación y caracterización
33	3.6 – Análisis por HPLC
39	4 – Flavan-3-oles
39	4.1 – Descripción, estructura y nomenclatura

44	4.2 – Reactividad y propiedades
44	4.2.1 - Hidrólisis
45	4.2.2 – Reacciones con aldehídos
46	4.2.3 – Interacción con proteínas
48	4.2.4 – Actividad antioxidante y captadora de radicales libres
49	4.2.5 – Complejación de iones metálicos
49	4.3 – Análisis
49	4.3.1 – Extracción
50	4.3.2 - Determinación
51	4.3.3 – Cromatografía líquida de alta eficacia
53	5 – El color de la fresa y de sus derivados
53	5.1 – El color de la fresa
54	5.2 – El color en los productos procesados de la fresa
54	5.2.1 – Influencia de la materia prima y de los procesos de recolección y <i>post</i> recolección
57	5.2.2 – Influencia del procesado y almacenamiento
63	II – OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL
67	III – INSTRUMENTAL Y PRODUCTOS
69	1 – Aparatos y material
73	2 – Disolventes, reactivos y sustancias patrón
75	3 – Fases estacionarias para cromatografía
77	IV – ESTUDIO DE ANTOCIANOS EN FRESA
79	1 – Introducción
81	2 – Metodología
81	2.1 – Material vegetal
81	2.2 – Extracción y purificación
82	2.3 – Fraccionamiento de antocianos por cromatografía en columna (CC)
83	2.4 – Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)
83	2.4.1 – Método de separación
85	2.4.2 – Detección por espectrometría de masas (HPLC-MS)
86	2.4.3 – Análisis cuantitativo de antocianos
86	2.5 – Hidrólisis ácida
87	2.6 – Identificación de azúcares por cromatografía de gases (GLC)
89	3 – Resultados y Discusión
89	3.1 – Análisis cualitativo de antocianos en fresa
105	3.2 – Análisis cuantitativo de antocianos en fresa
109	4 - Conclusiones

111	V – ESTUDIO DE FLAVAN-3-OLES EN FRESA
113	1 – Introducción
115	2 - Metodología
115	2.1 – Material vegetal
115	2.2 – Extracción
116	2.3 – Análisis
121	3 – Resultados y Discusión
121	3.1 – Identificación de flavanoles en fresa
126	3.2 – Determinación de flavanoles en fresa
131	4 – Conclusiones
133	VI – ESTABILIDAD DE PELARGONIDINA 3-GLUCÓSIDO EN DISOLUCIONES MODELO
135	1 – Introducción
137	2 – Metodología
137	2.1 – Aislamiento de pelargonidina 3-glucósido
138	2.2 – Preparación y almacenamiento de las disoluciones modelo
139	2.3 - Análisis
139	2.3.1 – Cromatografía líquida de alta eficacia con detección por espectrofotometría de diodos (HPLC-DAS)
140	2.3.2 – Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-MS)
141	2.3.3 – Medidas espectrales
143	3 – Resultados y Discusión
143	3.1 – Evolución de pelargonidina 3-glucósido en disoluciones modelo
149	3.2 - Ensayos realizados en presencia de oxígeno (GOx)
149	3.2.1 – Formación de nuevos compuestos
163	3.2.2 – Cambios en el color
170	3.3 – Ensayos realizados en ausencia de oxígeno (GsinOx)
175	3.4 – Ensayos realizados en presencia de azúcar y oxígeno (GZ)
183	4 – Conclusiones
185	VII – INTERACCIONES ENTRE PELARGONIDINA 3-GLUCÓSIDO Y FLAVAN-3-OLES
187	1 – Introducción
189	2 – Metodología
189	2.1 – Obtención de procianidina B3
189	2.1.1 – Hemisíntesis
191	2.1.2 – Aislamiento y purificación
194	2.2 – Preparación de las disoluciones modelo
194	2.3 - Análisis
195	2.3.1 – Cromatografía líquida de alta eficacia con detección por espectrofotometría de diodos

195	2.3.2 – Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas
196	2.3.3 – Medidas espectrales
197	3 – Resultados y Discusión
197	3.1 – Disoluciones modelo de pelargonidina 3-glucósido, catequina y procianidina B3
197	3.1.1 – Evolución de antociano y flavanoles
203	3.1.2 – Formación de nuevos compuestos
230	3.1.3 – Cambios en el color
237	4 – Conclusiones
239	VIII – ENSAYOS DE INTERVENCIÓN EN MERMELADA DE FRESA
241	1 - Introducción
243	2 - Metodología
243	2.1 – Material vegetal
243	2.2 – Ensayo modelo con pelargonidina 3-rutinósido
244	2.3 – Elaboración de las mermeladas
244	2.3.1 – Mermelada de referencia (MA)
245	2.3.2 – Mermeladas con incorporación de ácido pirúvico (MB) o de acetaldehído (MC)
245	2.4 – Análisis de pigmentos
245	2.4.1 – Extracción de las mermeladas
246	2.4.2 – Análisis por HPLC-DAD y HPLC-MS
246	2.5 – Análisis del color en las mermeladas
247	3 – Resultados y Discusión
247	3.1 – Evolución de antocianos y formación de nuevos pigmentos
247	3.1.1 – Mermelada de referencia (MA)
254	3.1.2 – Mermelada con incorporación de ácido pirúvico (MB)
262	3.1.3 – Mermelada con incorporación de acetaldehído (MC)
268	3.2 – Evolución del color de las mermeladas
275	4 - Conclusiones
279	IX – CONCLUSIONES GENERALES
285	REFERENCIAS
307	APÉNDICES

Índice de Figuras

Capítulo I

Página		
9	figura I.1	Principales clases de flavonoides y respectiva estructura básica del anillo C.
13	figura I.2	Equilibrio para las estructuras de resonancia oxonio-carbonio del 2-fenilbenzopirilio o ion flavilio.
16	figura I.3	Transformaciones estructurales del antociano mayoritario de la fresa: pelargonidina 3-glucósido.
19	figura I.4	Distribución de formas estructurales de cianidina 3,5-diglucósido (a 25°C) en función del pH: catión flavilio (AH ⁺); bases carbinol (B); calconas (C), base(s) quinonoidal(es) (A).
21	figura I.5	Representación esquemática de los mecanismos de estabilización antociánica vía copigmentación.
28	figura I.6	Estructura del aducto incoloro entre malvidina 3-glucósido y bisulfito.
39	figura I.7	Estructura general de un flavan-3-ol.
40	figura I.8	Estructuras de los tres tipos principales de flavan-3-ol monómeros.
41	figura I.9	Estructura correspondiente a (-)-epicatequina-3-O-galato.
42	figura I.10	Estructura básica de las proantocianidinas condensadas.
43	figura I.11	Estructuras y nomenclatura de procianidinas dímeras de tipo B.
44	figura I.12	Estructuras de algunas procianidinas trímeras de tipo C.
44	figura I.13	Estructuras de proantocianidinas dímeras de tipo A.
45	figura I.14	Hidrólisis ácida de una proantocianidina.
46	figura I.15	Condensación entre antocianos y flavanoles mediada por acetaldehído.
48	figura I.16	Esquema de la interacción tanino-proteína para concentraciones de proteína relativamente bajas (a) y altas (b).

Capítulo IV

Página		
90	figura IV.1	Cromatogramas de HPLC registrados a 520 nm, relativos al perfil de antocianos de extractos de fresa de las variedades: a) <i>Camarosa</i> ; b) <i>Carisma</i> ;
-		c) <i>Eris</i> ; d) <i>Oso Grande</i> y e) <i>Tudnew</i> . La figura presenta una ampliación del
92		cromatograma para poder apreciar mejor los picos minoritarios; en la ventana

pequeña de la parte superior derecha se muestra el cromatograma completo. La numeración de los picos es la misma en las cinco variedades y su identificación figura en la tabla IV.1.

95	figura IV.2	Espectros de masas (MS) y MS-MS obtenidos en modo positivo para: a) el pico 6, asignado a pelargonidina 3,5-diglucósido, y b) pico 7, asignado a cianidina 3-rutinósido.
96	figura IV.3	Espectros UV-visible de: a) pico 10, asignado a pelargonidina 3-glucósido, y b) pico 6, asignado a pelargonidina 3,5- diglucósido.
96	figura IV.4	Espectro UV-visible del pico 14, asignado a pelargonidina 3-malilglucósido.
98	figura IV.5	Espectro UV-visible del pico 9, asociado a Cy 3-malonilglucósido-5-glucosa.
98	figura IV.6	Espectros de masas (<i>full scan</i> y MS-MS) obtenidos en modo positivo para el pico 9.
100	figura IV.7	Espectros de masas (MS-MS y MS ³) obtenidos en modo positivo para el pico 1, tentativamente identificado como un dímero catequina-Pg 3-glucósido (estructura en figura IV.9).
100	figura IV.8	Espectros UV-Vis de los picos 1 (a), 3 (b) y 4 (c), atribuidos a dímeros de condensación flavanol-antociano.
101	figura IV.9	Propuestas para las estructuras de los picos 1 a 4 y respectivos mecanismos de fragmentación en MS.
102	figura IV.10	Espectros de masas (MS-MS y MS ³) obtenidos en modo positivo para el pico 4, tentativamente identificado como un dímero afzelequina-Pg 3-rutinósido.
106	figura IV.11	Porcentajes de los tres antocianos mayoritarios en las cinco variedades de fresa analizadas en las cosechas de 2001 (barra izquierda) y 2002 (barra derecha).
107	figura IV.12	Concentraciones medias de antocianos totales y desviación estándar de las cinco variedades de fresas analizadas en los dos años de cosecha.

Capítulo V

Página		
117	figura V.1	Esquema del método de HPLC con detección tras derivatización <i>post column</i> empleado para el análisis de flavanoles.
118	figura V.2	Reacción entre flavanoles y DMACA en medio ácido; R1 = H en procianidinas; R1 = OH en delphinidinas.
122	figura V.3	Cromatogramas de HPLC registrados a 640 nm tras reacción con DMACA, correspondientes a los perfiles flavanólicos de los extractos de fresa de las variedades: (a) <i>Camarosa</i> ; (b) <i>Carisma</i> ; (c) <i>Eris</i> ; (d) <i>Oso Grande</i> y (e) <i>Tudnew</i> . Para identificación de los picos consultar la tabla V.1.
-		
124		
127	figura V.4	Contenidos medios de flavanoles totales (mg catequina.kg ⁻¹ fresa) y desviaciones estándar (n=3) correspondientes a las cinco variedades de fresa objeto de estudio, en las cosechas de 2001 y 2002.

Capítulo VI

Página		
138	figura VI.1	Cromatograma HPLC (520 nm) del Pg 3-glucósido aislado y purificado, obtenido a partir de fresas.
143	figura VI.2	Evolución de la concentración de pelargonidina 3-glucósido en los tres sistemas modelo ensayados.
147	figura VI.3	Representación gráfica del logaritmo neperiano de la concentración remanente de Pg 3-glucósido vs tiempo de almacenamiento.
151	figura VI.4	Cromatogramas registrados a 280 nm para el ensayo GOx en los días 0, 42, 65, 155 y 226.
152	figura VI.5	Esquema hipotético de la degradación térmica de Pg 3-glucósido basado en el mecanismo propuesto por Piffaut et al. (1994). Las relaciones m/z indicadas

		corresponden al ion molecular del compuesto obtenido en modo positivo.
154	figura VI.6	Hipotéticas estructuras intermediarias en la degradación de Pg 3-glucósido: (a) aducto hidroxilado en la posición C4 de la antocianidina (b) aducto hidroxilado de la calcona intermediario.
154	figura VI.7	Características espectroscópicas del compuesto a : (a) espectro de masas, <i>full scan</i> ; (b) espectro UV-Vis.
155	figura VI.8	Espectro UV-Vis del compuesto c , el ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico.
156	figura VI.9	Cromatograma HPLC (a 520 nm) del ensayo GOx el día 35. La ventana enseña el espectro UV-Vis del pico correspondiente al aglucón pelargonidina.
157	figura VI.10	Características espectroscópicas del compuesto b : (a) espectro de masas, <i>full scan</i> ; (b) espectro UV-Vis.
158	figura VI.11	Mecanismo hipotético de formación de un derivado de tipo furánico a partir de Pg 3-glucósido, en el proceso degradativo del antociano.
158	figura VI.12	Estructura de un compuesto tipo flaveno, hipotéticamente obtenido a partir de Pg 3-glucósido.
160	figura VI.13	Estructuras propuestas para el compuesto correspondiente al pico e , con m/z 865 en modo positivo: (a) dímero flaveno-flaveno; (b) dímero flavano-flaveno con enlace tipo A.
161	figura VI.14	Mecanismo hipotético para la formación, a partir de Pg 3-glucósido, de los dímeros flaveno-flaveno y flavano-flaveno con enlace tipo A.
162	figura VI.15	Características espectroscópicas del compuesto g : (a) espectro de masas, <i>full scan</i> ; (b) espectro UV-Vis.
162	figura VI.16	Evolución relativa de algunos de los nuevos compuestos constituidos en GOx a lo largo del almacenamiento.
165	figura VI.17	Cromatogramas HPLC, registrados a 440 nm, para el ensayo GOx en los días 0, 42, 65, 155 y 226.
166	figura VI.18	Espectros UV-Vis de algunos de los picos señalados en los cromatogramas a 440 nm.
167	figura VI.19	Representación del Índice de Pardeamiento vs. tiempo de almacenamiento en el ensayo GOx.
169	figura VI.20	Modificaciones en el espectro de absorción de la disolución GOx.
171	figura VI.21	Cromatogramas registrados a 280 nm en la disolución GsinOx en los días 0, 78, 155, 201 y 236.
173	figura VI.22	Representación del Índice de Pardeamiento vs. tiempo de almacenamiento en el ensayo GsinOx.
174	figura VI.23	Espectros de absorción registrados en la disolución GsinOx los días 0, 78, 155 y 201.
176	figura VI.24	Cromatogramas registrados a 280 nm para el ensayo GZ en los días 0, 48, 78, 170 y 215.
177	figura VI.25	Representación del Índice de Pardeamiento vs. tiempo de almacenamiento en el ensayo GZ.
179	figura VI.26	Espectros de absorción de la disolución GZ los días 0, 48, 78 y 226.
180	figura VI.27	Evolución de las áreas del pico b a lo largo del almacenamiento en las tres disoluciones estudiadas.
180	figura VI.28	Evolución de las áreas del pico a (THB) a lo largo del almacenamiento en las tres disoluciones estudiadas.

Capítulo VII

Página		
190	figura VII.1	Hemisíntesis de procianidinas a partir de (\pm)-taxifolina.
193	figura VII.2	Cromatograma de HPLC (280 nm) correspondiente a la procianidina B3

- después de su síntesis, aislamiento y purificación.
- 198 **figura VII.3** Evolución de los contenidos de Pg 3-gluc en los sistemas modelo 0,2BC, 0,1BCSinOx, 0,1BCOx y 1,5B, a lo largo del almacenamiento a 25°C.
- 199 **figura VII.4** Evolución de la concentración de Pg 3-gluc (escala logarítmica) a lo largo del tiempo (t) en disoluciones modelo, en ausencia (GOx y GsinOx) y en presencia de flavanoles (0,2BC, 1,0BCSinOx, 1,0BCOx y 1,5B).
- 201 **figura VII.5** Representación del logaritmo de la concentración vs. tiempo de almacenamiento para catequina (a) y B3 (b), individualmente, en los sistemas 0,2BC, 0,1BCSinOx, 0,1BCOx y 1,5B.
- 204 **figura VII.6** Cromatogramas de HPLC, registrados a 280 nm, obtenidos en el día 0 de ensayo para las diferentes disoluciones de antociano y flavanoles estudiadas. La escala cromatográfica es la misma en todos los casos.
- 205 **figura VII.7** Cromatogramas de HPLC, registrados a 280 nm, obtenidos en el día 78 de ensayo para las diferentes disoluciones de antociano y flavanoles estudiadas. La escala cromatográfica es la misma en los cuatro cromatogramas.
- 206 **figura VII.8** Espectros UV-visible de los nuevos compuestos incoloros formados en las disoluciones 0,2BC, 1,0BCSinOx, 1,0BCOx y 1,5B.
- 207 **figura VII.9** Evolución de las áreas cromatográficas (280 nm) del pico P1 en los distintos sistemas modelo.
- 208 **figura VII.10** Estructuras propuestas para los productos P5 y P7 con enlace de tipo A.
- 209 **figura VII.11** Estructuras alternativas para P5 y P7 formadas por condensación directa entre el carbocatión C_4^+ resultante de la hidrólisis de B3 sobre las posiciones C6 y C8 de pelargonidina en forma hidratada.
- 210 **figura VII.12** Esquema de fragmentación de la estructura alternativa F-AOH propuesta para el compuesto P5.
- 212 **figura VII.13** Estructuras propuestas por Guyot *et al.* (1996) para productos resultantes de la oxidación enzimática de catequinas, con iones moleculares de m/z 577 (modo positivo).
- 213 **figura VII.14** Espectros de masas (ion molecular) y de fragmentación (MS^2) del compuesto P6.
- 213 **figura VII.15** Estructura propuesta para el compuesto P6 y esquema de fragmentación RDA en ESI-MS que da lugar al fragmento principal detectado en MS^2 .
- 214 **figura VII.16** Mecanismo propuesto para la formación del compuesto P6, de acuerdo con lo sugerido por Jurd y Waiss (1965).
- 216 **figura VII.17** Espectros UV-visible de los principales nuevos compuestos coloreados formados en los sistemas modelo 0,2BC, 1,0BCSinOx, 1,0BCOx y 1,5B.
- 217 **figura VII.18** Cromatogramas de HPLC, registrados a 440 nm, de las disoluciones 0,2BC, 1,0BCSinOx, 1,0BCOx y 1,5B al cabo de 78 días de almacenamiento. Las escalas son las mismas en todos los cromatogramas.
- 218 **figura VII.19** Espectros de masas (ion molecular, MS^2 y MS^3) del producto P3 obtenidos en modo positivo.
- 220 **figura VII.20** Mecanismo propuesto para la formación del pigmento P3.
- 221 **figura VII.21** Formación de pigmentos xantilio similares a P3 resultantes de la condensación entre unidades catequina a través de ácido glioxílico, basado en lo propuesto por Es-Safi *et al.* (2003).
- 223 **figura VII.22** Espectros de masas (ion molecular, MS^2 y MS^3) del producto P8, obtenidos en modo positivo.
- 225 **figura VII.23** Estructuras propuestas para el compuesto P2.
- 226 **figura VII.24** Vías hipotéticas para la formación de las estructuras A y B sugeridas para el pigmento P2, que implican la participación de ácido glioxílico.
- 227 **figura VII.25** Espectro de masas del compuesto P2 y patrón de fragmentación MS^2 .
- 231 **figura VII.26** Cambios en el espectro de absorción y en la longitud de onda de máxima de absorción ($\lambda_{m\acute{a}x}$, nm) en las disoluciones 0,2BC, 1,0BCSinOx, 1,0BCOx y 1,5B

a lo largo del almacenamiento.

- 232 **figura VII.27** Evolución del Índice de Pardeamiento vs. tiempo en las disoluciones [Pg 3-gluc + C y/o B3].
- 233 **figura VII.28** Evolución de las áreas cromatográficas (HPLC) de los picos de los principales compuestos coloreados - P2, P3 y P4 - formados en las disoluciones.
- 234 **figura VII.29** Evolución del Índice de Pardeamiento vs. tiempo en las disoluciones de Pg 3-gluc y [Pg 3-gluc+ C y/o B3]. en presencia de oxígeno (a) y en ausencia de oxígeno (b).

Capítulo VIII

Página

- 247 **figura VIII.1** Cromatograma de HPLC registrado a 520 nm correspondiente a la mermelada *MA* obtenido dos días después de su elaboración.
- 248 **figura VIII.2** Porcentajes medios de los tres antocianos mayoritarios en fresas (cv *Camarosa*) y la mermelada obtenida a partir de las mismas.
- 248 **figura VIII.3** Evolución en el contenido de antocianos totales a lo largo del tiempo de almacenamiento en la mermelada de referencia (*MA*).
- 249 **figura VIII.4** Cromatograma de HPLC, registrado a 520 nm, correspondiente a la mermelada *MA* después de tres meses de almacenamiento. La tentativa de identificación de los picos 1, 2 y 3 se encuentra en el Capítulo IV.
- 251 **figura VIII.5** Cromatograma de HPLC, registrado a 440 nm, correspondiente a la mermelada *MA* después de tres meses de almacenamiento.
- 255 **figura VIII.6** Cromatograma de HPLC, registrado a 520 nm, correspondiente a la mermelada *MB* obtenido tras 15 días de almacenamiento a 25°C. Los picos señalados como V1 y V2, corresponden a pigmentos de nueva formación. Un tercer pigmento (V3) eluye solapado con el pico del Pg 3-gluc.
- 256 **figura VIII.7** Espectros de masas (*full mass* y MS^2) del pico V1.
- 256 **figura VIII.8** Estructura propuesta para el pigmento V1.
- 257 **figura VIII.9** Espectro UV-Vis correspondiente al pigmento V1.
- 257 **figura VIII.10** Evolución del pigmento V1 a lo largo del tiempo de almacenamiento en la mermelada *MB*. La concentración se expresa como mg de Pg 3-gluc por 100 g de mermelada.
- 258 **figura VIII.11** Cromatograma HPLC, registrado a 520 nm, correspondiente a un extracto antociánico de la mermelada *MB* obtenido tras 100 días de almacenamiento a 25°C. Los picos V1, V2 y V3 corresponden a pigmentos de nueva formación.
- 258 **figura VIII.12** Espectro UV-Vis correspondiente al pico V3.
- 259 **figura VIII.13** Espectros de masas y respectivos patrones de fragmentación (*full mass* y MS^2) de los picos V2 (a) y V3 (b).
- 260 **figura VIII.14** Estructuras propuestas para los pigmentos V2 y V3, formados en la mermelada *MB*.
- 261 **figura VIII.15** Cromatogramas de HPLC, registrados a 520 nm, de una disolución modelo de pelargonidina 3-rutinósido y ácido pirúvico de pH 3,5, al cabo de 0 y 31 días de almacenamiento a 25°C.
- 263 **figura VIII.16** Evolución del contenido de antocianos totales en las mermeladas *MA* y *ME*.
- 264 **figura VIII.17** Evolución de las concentraciones de Pg 3-gluc y Pg 3-rut en la mermelada *ME*.
- 264 **figura VIII.18** Cromatograma de HPLC, registrado a 520 nm, correspondiente a la mermelada *ME* obtenido tras 30 días de almacenamiento a 25°C.
- 265 **figura VIII.19** Estructura propuesta para los pigmentos T1 y T2 formados en la mermelada C. La existencia de un carbono asimétrico, C*, da lugar a la formación de los dos isómeros.

266	figura VIII.20	Evolución de las áreas cromatográficas de los picos T1 y T2 en la mermelada <i>ME</i> a lo largo del tiempo de estudio.
267	figura VIII.21	Cromatograma HPLC registrado a 520 nm correspondiente a la mermelada <i>ME</i> el día 60 de estudio.
267	figura VIII.22	Espectros de masas (<i>full mass</i> y MS^2) del pico T3.
267	figura VIII.23	Estructura propuesta para el compuesto T3 formado en la mermelada <i>ME</i> .
268	figura VIII.24	Coordenadas cartesianas y cilíndricas del espacio de color CIE 1976 L*a*b* (CIELAB).
269	figura VIII.25	Posición de las mermeladas <i>MA</i> , <i>MB</i> y <i>ME</i> en el diagrama CIELAB (coordenadas a* y b*) el día de su elaboración y el último día de almacenamiento.
270	figura VIII.26	Evolución de los parámetros a* y b* y en las mermeladas <i>MA</i> , <i>MB</i> y <i>ME</i> a lo largo del almacenamiento.
272	figura VIII.27	Evolución del croma (C*) en las mermeladas <i>MA</i> , <i>MB</i> y <i>ME</i> a lo largo del tiempo de almacenamiento.
273	figura VIII.28	Evolución de la claridad (L*) en las mermeladas <i>MA</i> , <i>MB</i> y <i>ME</i> a lo largo del tiempo de almacenamiento.
274	figura VIII.29	Evolución del ángulo del tono (h) en las mermeladas <i>MA</i> , <i>MB</i> y <i>ME</i> a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Índice de Tablas

Capítulo I

Página		
8	tabla I.1	Principales clases de compuestos fenólicos en plantas.
14	tabla I.2	Estructuras de las antocianidinas más frecuentes en la Naturaleza y de algunos de sus glicósidos.
39	tabla I.3	Flavan-3-oles monómeros más comúnmente encontrados en la Naturaleza
42	tabla I.4	Tipos de proantocianidinas y nombres de las unidades básicas constituyentes.

Capítulo IV

Página		
104	tabla IV.1	Tiempo de retención en las condiciones de análisis cromatográfico utilizadas, longitud de onda de máxima absorción en el visible (λ_{\max}) establecida con el detector de fotodiodos, ion molecular, patrón de fragmentación e identidad asignada a los antocianos detectados en los extractos de fresa.
105	tabla IV.2	Contenidos en antocianos en las variedades de fresa estudiadas en las temporadas 2001 y 2002. Los resultados (media \pm d.e.; n = 3) se expresan como mg Pg 3-gluc.kg ⁻¹ fresa congelada. Entre paréntesis se indica el porcentaje de contribución del antociano al contenido total.

Capítulo V

Página		
125	tabla V.1	Longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia en el espectro UV (λ_{\max} del compuesto antes de reacción con DMACA), tiempo de retención (t.r.) e identidad de flavanoles encontrados en los extractos de fresas.
126	tabla V.2	Contenidos de los flavanoles identificados en fresas recolectadas en las temporadas 2001 y 2002. Los resultados (media \pm desviación estándar; n = 3) se expresan como mg catequina.kg ⁻¹ fresa.
128	tabla V.3	Contenidos en flavanoles totales (expresados en mg catequina.kg ⁻¹) citados por diferentes autores.
129	tabla V.4	Porcentajes correspondientes a los monómeros catequina (C) y epicatequina (EC) y de dímeros y trímeros relacionados respecto al contenido total de flavanoles.
130	tabla V.5	Porcentajes de los dímeros B3, B1, B6 y B7 en las fresas de las dos cosechas

estudiadas.

Capítulo VI

Página		
148	tabla VI.1	Parámetros de la regresión lineal de la degradación de Pg 3-glucósido calculados en el período 0 - 55 días para los sistemas modelo GOx, GsinOx y GZ.
169	tabla VI.2	Evolución de la longitud de onda de máxima de absorción ($\lambda_{\text{máx.}}$, nm) y del Índice de Pardeamiento (IP) en la disolución GOx a lo largo del almacenamiento.
174	tabla VI.3	Cambios en la longitud de onda de máxima absorbancia ($\lambda_{\text{máx.}}$, nm) y en el Índice de Pardeamiento (IP) en la disolución GsinOx a lo largo del almacenamiento.
179	tabla VI.4	Longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia ($\lambda_{\text{máx.}}$, nm), y Índice de Pardeamiento (IP) para cada muestra de GZ a lo largo del almacenamiento.
181	tabla VI.5	Longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx.}}$), ion molecular y fragmentos MS ² y MS ³ de algunos de los productos cuya formación es observada en los ensayos realizados.

Capítulo VII

Página		
199	tabla VII.1	Tiempo de media vida ($t_{1/2}$, días), estimado por interpolación para Pg 3-glucósido, catequina y B3 en los sistemas 0,2BC, 1,0BCsinOx, 1,0BCOx, y 1,5B. Se presentan igualmente los valores estimados para las disoluciones control GOx y GsinOx.
229	tabla VII.2	Longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx.}}$), ion molecular y fragmentos MS ² y MS ³ de los principales compuestos de nueva formación observados en las distintas disoluciones de Pg 3-gluc y flavanoles ensayadas.

Capítulo VIII

Página		
244	tabla VIII.1	Formulación utilizada en la elaboración de la mermelada de fresa de referencia (<i>M.A.</i>).
253	tabla VIII.2	Tiempo de media vida, estimado por interpolación, para Pg 3-glucósido en los sistemas modelo GOx, GsinOx, GZ, 0,2BC, 1,0BCsinOx, 1,0BCOx y 1,5B (calculados en los Capítulos VI y VII), y para la mermelada <i>M.A.</i>

Apéndices

Apéndice A1

Página		
309	tabla A1.1	Concentración (μM) y logaritmo neperiano de la concentración en el día i de Pg 3-gluc en las disoluciones GOx, GsinOx y GZ.
309 - 311	tabla A1.2	Área en HPLC de los nuevos compuestos formados en las disoluciones modelo GOx, GsinOx y GZ.

Apéndice A2

Página		
313	tabla A2.1	Tiempo de retención (minutos), concentración absoluta (μM), razón concentración en el día i /concentración inicial (%) y área en HPLC de Pg 3-

		glucósido, B3 y catequina, en la disolución modelo 0,2BC.
313	tabla A2.2	Concentración absoluta (μM), razón concentración en el día <i>i</i> /concentración inicial (%) y área en HPLC de Pg 3-glucósido, B3 y catequina, en la disolución modelo 1,0BCSinOx.
313	tabla A2.3	Concentración absoluta (μM), razón concentración en el día <i>i</i> /concentración inicial (%) y área en HPLC de Pg 3-glucósido, B3 y catequina, en la disolución modelo 1,0BCOx.
314	tabla A2.4	Concentración absoluta (μM), razón concentración en el día <i>i</i> /concentración inicial (%) y área en HPLC de Pg 3-glucósido y B3, en la disolución modelo 1,5B.
314	tabla A2.5	Tiempo de retención (minutos) y área en HPLC de los nuevos productos formados en la disolución modelo 0,2BC.
314	tabla A2.6	Área en HPLC de los nuevos productos formados en la disolución modelo 1,0BCSinOx.
315	tabla A2.7	Área en HPLC de los nuevos productos formados en la disolución modelo 1,0BCOx.
315	tabla A2.8	Área en HPLC de los nuevos productos formados en la disolución modelo 1,5B.

Apéndice A3

Página		
317	tabla A3.1	Concentración de antocianos totales a lo largo del almacenamiento en las mermeladas <i>MA</i> y <i>ME</i> .
317	tabla A3.2	Concentración de Pg 3-glucósido y Pg 3-rutinósido en la mermelada <i>ME</i> a lo largo del almacenamiento.
317	tabla A3.3	Áreas HPLC de los compuestos T1 y T2 en la mermelada <i>ME</i> a lo largo del almacenamiento.

Lista de Abreviaturas y Notaciones

API	Ionización a presión atmosférica
B1	EC-(4 β →8)-C
B2	EC-(4 β →8)-EC
B3	C-(4 α →8)-C
B4	C-(4 α →8)-EC
B6	C-(4 α →6)-C
B7	EC-(4 β →6)-C
C2	C-(4 α →8)-C-(4 β →8)-C
C	Catequina
CGA	Ácido clorogénico
Cy	Cianidina
DAD	Detector de fotometría de diodos
DMACA	<i>p</i> -dimetilaminocinamaldehído
EC	Epicatequina
ECG	Epicatequina-3-O-galato
EC-EC-C	EC-(4 β →8)-EC-(4 β →8)-C
EC-EC-EC-C	EC-(4 β →8)-EC-(4 β →8)-EC-(4 β →8)-C
ESI	Ionización por electrospray
FID	Detector de ionización a la llama
GC	(+)-galocatequina
GLC	Cromatografía de gases
gluc	Glucosa
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IP	Índice de Pardeamiento
[M+H]⁺	Molécula protonada
MS	Espectrometría de masas
Mv	Malvidina
m/z	Razón masa/carga
P	Peroxidasas
Pg	Pelargonidina
ppm	Partes por millón
PPO	Polifenoloxidasas
RDA	Fisión Retro Diels-Alder
RMN	Resonancia magnética nuclear
rut	Rutinosa
SPE	Extracción en fase sólida
TFA	Ácido trifluoracético
TLC	Cromatografía en capa fina
t.r.	Tiempo de retención
u.m.	Unidades de masa

Introducción General

La calidad de un alimento es el conjunto de todas las características que hacen del mismo un producto adecuado y deseable para comer. Estas características incluyen la calidad higiénica, el valor nutricional y la calidad organoléptica (color, aroma, sabor, textura y apariencia). Dentro de esta última, el color es una de las primeras propiedades por las que el consumidor juzga la calidad de un alimento y en base a la cual puede o no ser aceptado y, en última instancia, seleccionado o rechazado. De hecho, si el producto no muestra su color habitual puede producir desconfianza o confusión en el consumidor, reduciendo de ese modo su aceptabilidad. Asimismo, diversos estudios han mostrado que frecuentemente existe una relación entre el color y el sabor percibido. Es, por tanto, fácil comprender porqué la medida y el control del color son tan importantes para la industria alimentaria.

La mayor parte de los alimentos que se consumen hoy en día son de alguna manera procesados antes de llegar al consumidor. Durante los tratamientos a que son sometidos, se produce en ocasiones una modificación del color original, lo que puede dar lugar a que sea necesario recurrir a la adición de colorantes en productos alimenticios que, de otro modo, serían incoloros o poco atractivos. Por otra parte, en los últimos años se viene asistiendo a un interés creciente por parte del consumidor acerca de la seguridad de los ingredientes que incorporan los alimentos. El consumidor busca productos “naturales”, o productos alimentarios que incorporen ingredientes naturales, en contra de todo aquello que suene a artificial, como es el caso de los colorantes sintéticos. En términos prácticos, estos aspectos se traducen en una intensificación de la búsqueda de nuevos y más estables extractos de pigmentos naturales con posible aplicación alimentaria, así como en una mayor demanda de

nuevos métodos de procesado y almacenamiento que conduzcan a alimentos con una calidad tal que tengan la apariencia de alimento “fresco”.

En la fresa, los pigmentos presentes y, en particular, los antocianos -sustancias polifenólicas de tipo flavonoide- y los factores que influyen en su síntesis, expresión y estabilidad, son los principales responsables por el color. En el caso de los productos derivados de fresa que no hayan sido adulterados, el perfil de pigmentos que contienen debería ser similar al característico del fruto fresco (García-Viguera *et al.*, 1997) y es responsable de su atractivo color rojo inicial. No obstante, durante el procesado y almacenamiento, se producen cambios en el color que revelan la existencia de reacciones de degradación inducidas por factores externos (temperatura, oxígeno, luz, manipulación, prácticas de fabricación, etc.) y/o por factores internos relativos al propio fruto o al producto procesado (de Ancos *et al.*, 1999; Skrede *et al.*, 1992).

Desde hace ya algunas décadas, la fresa y sus derivados (mermeladas, zumos, concentrados, purés...) son objeto de estudios encaminados a elucidar los procesos que conducen al cambio de color y aumentar su estabilidad. Si bien se han producido importantes avances en el conocimiento de aspectos tales como la composición química de diversas variedades, la conservación *post* recolección, etc., todavía siguen sin conocerse la totalidad de los factores y mecanismos implicados en el cambio de color, bastante rápido, que sufren los productos derivados de este fruto y, consecuentemente, se carece de soluciones que permitan reforzar o mantener en el tiempo el color rojo brillante, original de la fresa, en los mismos.

Por otra parte, en los últimos años se ha despertado un extraordinario interés por el papel que, en la salud humana, ejercen algunos componentes de las plantas y de los alimentos de origen vegetal. Diversos estudios epidemiológicos muestran que las dietas ricas en alimentos de origen vegetal reducen significativamente la incidencia y la tasa de mortalidad por enfermedades degenerativas causadas por estrés oxidativo, implicado en los procesos de envejecimiento. Este efecto protector se ha atribuido al hecho de que estos alimentos proporcionan a nuestro organismo una mezcla óptima de fitoquímicos, tales como el β -caroteno, el ascorbato, los compuestos fenólicos y otros antioxidantes naturales (Heim *et al.*, 2002; García-Alonso *et al.*, 2003). Como agentes reductores, los polifenoles – y dentro de éstos, los flavonoides - son considerados los antioxidantes más abundantes en la dieta, protegiendo a las células de los tejidos del mencionado estrés oxidativo y patologías asociadas, como cáncer y enfermedades coronarias e inflamatorias (Tapiero *et al.*, 2002; Sartor *et al.*, 2002).

El interés por el estudio de los polifenoles de la fresa y productos derivados es, por tanto, doble. Por una parte, van a ser responsables de la definición de una importante propiedad que condiciona la calidad del producto, el color. Por otra, la fresa constituye una importante fuente de fitoquímicos en nuestra dieta, especialmente de derivados de ácidos benzoicos e hidroxicinámicos y de flavonoides (antocianos, flavonoles, catequinas y taninos condensados) (Macheix *et al.*, 1990), que siguen estando presentes en sus productos procesados, condicionando, de este modo, sus características funcionales (Heinonen *et al.*, 1998a).



Marco Teórico

1 – Breves consideraciones sobre los compuestos fenólicos

2 – Compuestos fenólicos de la fresa

3 – Antocianos

- 3.1 – Estructura
- 3.2 – Equilibrios
- 3.3 – Estabilidad y reacciones
- 3.4 – Interés tecnológico
- 3.5 – Extracción, purificación y caracterización
- 3.6 – Análisis por HPLC

4 – Flavan-3-oles

- 4.1 – Descripción, estructura y nomenclatura
- 4.2 – Reactividad y propiedades
 - 4.2.1 – Hidrólisis
 - 4.2.2 – Reacciones con aldehídos
 - 4.2.3 – Interacción con proteínas
 - 4.2.4 – Actividad antioxidante y captadora de radicales libres
 - 4.2.5 – Complejación de iones metálicos
- 4.3 – Análisis
 - 4.3.1 – Extracción
 - 4.3.2 – Determinación
 - 4.3.3 – Cromatografía líquida de alta eficacia

5 – El color de la fresa y de sus derivados

- 5.1 – El color de la fresa
- 5.2 – El color en los productos procesados de la fresa
 - 5.2.1 – Influencia de la materia prima y de los procesos de recolección y *post* recolección
 - 5.2.2 – Influencia del procesado y almacenamiento

1 – BREVES CONSIDERACIONES SOBRE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos (fenoles y polifenoles) de las plantas son producidos durante el crecimiento y como respuesta en la adaptación al estrés y al desarrollo (Shetty, 2003). Constituyen un grupo diversificado de metabolitos secundarios, que poseen al menos un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo y que pueden encontrarse en la naturaleza en forma de distintos derivados (glicósidos, ésteres, metil éteres, etc.). Los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta sustancias altamente polimerizadas, como los taninos. Se presentan principalmente en forma de heterósidos, con uno o más restos de azúcar ligados a uno o varios de sus grupos hidroxilo, aunque también existen compuestos en los que el azúcar se encuentra unido directamente a un carbono aromático (C-glicósidos). Son también comunes las asociaciones con otras sustancias, como ácidos carboxílicos, aminas y lípidos, así como la unión con otros fenoles. Sin embargo, para delimitar el grupo de los compuestos fenólicos, no es totalmente satisfactorio recurrir a una definición puramente química, dada la variedad de estructuras que incluyen y el hecho de que existen compuestos de naturaleza fenólica pero con origen terpenoide (caso, por ejemplo, de los fitoestrógenos). Por esta razón, es preferible una definición biogenética. Así, los compuestos fenólicos pueden surgir biogenéticamente de dos vías: la vía del shikimato, que conduce a fenilpropanoides, como los ácidos hidroxicinámicos y las cumarinas, y la vía del acetato que produce fenoles simples y quinonas diversas. Los flavonoides, de lejos el mayor grupo de compuestos fenólicos, derivan biosintéticamente de una combinación de ambas vías (Harborne, 1989; Hvattum, 2002).

Se han propuesto diversas clasificaciones de los compuestos fenólicos presentes en vegetales, de las cuales en la tabla I.1 se recoge una de las más comunes. Solamente en las plantas vasculares se encuentra representada la gama completa de polifenoles, pudiendo existir una amplia variabilidad de compuestos en distintas partes de una misma planta, de modo que los encontrados en hojas pueden ser bastante distintos de los que están presentes en flores, tallos, raíces o frutos. Aún cuando se encuentren distribuidos por toda la planta, la concentración puede variar de modo importante de unas partes a otras (Harborne, 1989).

El grupo más importante de compuestos fenólicos son los **flavonoides**, compuestos que poseen un esqueleto básico de quince átomos de carbono, que en su

nivel más simple consta de dos anillos fenilo (anillos A y B) ligados por un puente tricarbonado, que en la mayoría de clases se encuentra formando un tercer anillo heterocíclico (anillo C). La clasificación más habitual de los flavonoides se realiza de acuerdo con las características estructurales de este puente tricarbonado y es la que se encuentra recogida en la figura I.1. Se han descrito más de 4.000 flavonoides naturales (Iwashina, 2000) y el número de compuestos identificados continúa creciendo.

Tabla I.1 – Principales clases de compuestos fenólicos en plantas (adaptado de Harborne, 1989).

<i>Nº de carbonos en la estructura base</i>	<i>Esqueleto</i>	<i>Clases</i>	<i>Ejemplos</i>
6	C ₆	Fenoles simples Benzoquinonas	catecol, hidroquinona 2,6-dimetoxibenzoquinona
7	C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos	ácidos <i>p</i> -hidroxibenzoico, salicílico
8	C ₆ -C ₂	Acetofenonas Ácidos fenilacéticos	3-acetil-6-metoxibenzaldehído ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético
9	C ₆ -C ₃	Ácidos hidroxicinámicos Cumarinas Cromonas	ácidos cafeico, cumárico, ferúlico umbeliferona, esculetina eugenina
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinonas	juglona, plumbagina
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas	mangiferina
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos Antraquinonas	resveratrol emodina
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides Isoflavonoides	quercetina, cianidina genisteína, daidzeína
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanos Neolignanos	pinosresinol eusiderina
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides	amentoflavona
<i>n</i>	(C ₆ -C ₃) _n (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Ligninas Taninos condensados	– procianidinas, prodelfinidinas

La presencia de flavonoides es ubicua en los alimentos de origen vegetal, aunque algunos tipos están mejor representados en determinadas plantas o partes de las mismas. Así, las flavanonas son especialmente abundantes en frutos cítricos, los isoflavonoides en leguminosas, los antocianos, flavanos y proantocianidinas en frutos, las flavonas en plantas herbáceas y los flavonoles en frutas y hortalizas. La preparación de alimentos y el procesado de vegetales pueden disminuir el contenido en flavonoides por lixiviación, degradación o remoción de partes de la planta ricas en ellos. No obstante, algunos productos vegetales procesados, como el vino, el té o el chocolate, continúan siendo buenas fuentes dietéticas de flavonoides. También la miel suele presentar cantidades menores de flavonoides. Los alimentos de origen animal no los contienen de modo natural ni tampoco son sintetizados por el organismo humano (Peterson y Dwyer, 1998).

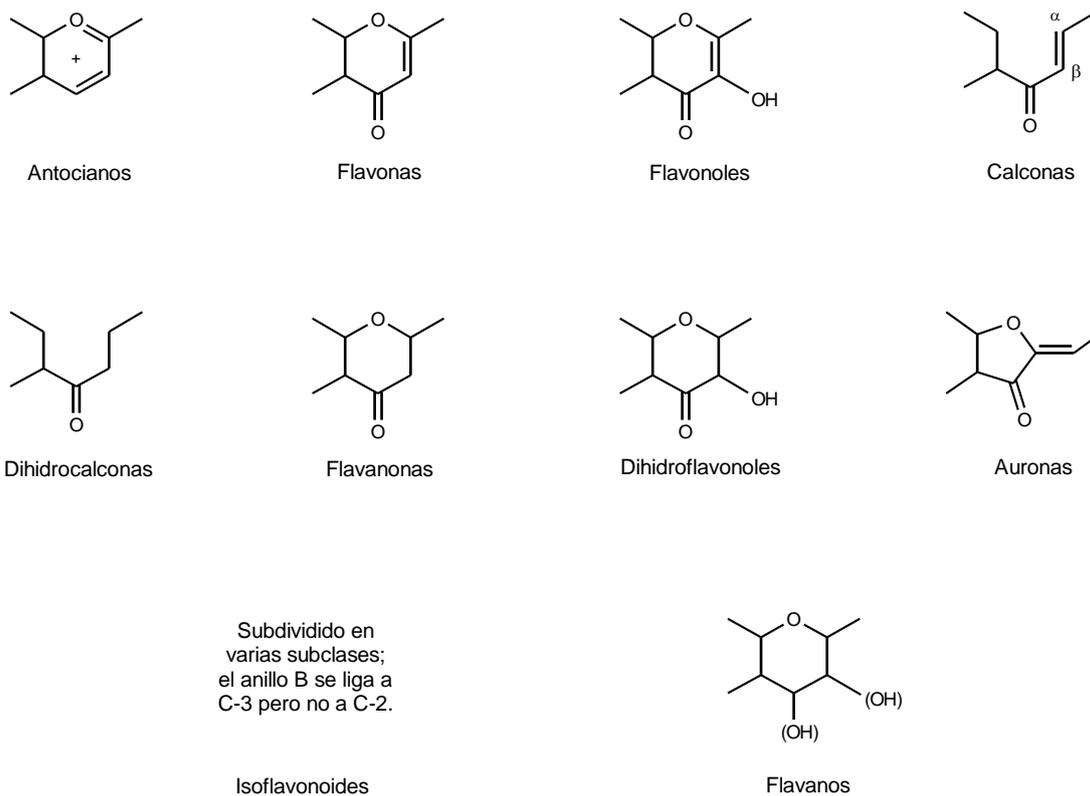


Figura I.1 – Principales clases de flavonoides y respectiva estructura básica del anillo C.

Los flavonoides y los compuestos fenólicos en general son sustancias importantes en los alimentos de origen vegetal, al ser responsables de algunas de sus características organolépticas y tecnológicas, estar relacionados con efectos beneficiosos para la salud y poder ser utilizados analíticamente como indicadores de adulteraciones en determinados productos (p. ej., zumos, jaleas, mermeladas) o para la clasificación de acuerdo a su tipo u origen (p. ej., uvas, vinos, miel).

2 - COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA FRESA

Botánicamente la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) es una planta de la familia *Rosaceae*, cuyo fruto es un agregado formado por la maduración conjunta de varios ovarios, todos pertenecientes a una única flor y adheridos a un receptáculo pulposo común; aunque es común referirse al mismo como baya, no lo es verdaderamente, pues carece de semillas entre su tejido carnoso. El fruto es inicialmente blanco con matices verdosos y al madurar evoluciona hacia un rojo brillante (Mazza y Miniati, 1993). Nutricionalmente, la fresa aporta principalmente azúcares y algunos micronutrientes (vitaminas y minerales) y, además, es rica en sustancias fitoquímicas, como flavonoides (especialmente antocianos) y ácidos fenólicos (Wang *et al.*, 2003). Su composición fenólica, cualitativa y cuantitativa, hace de la fresa una buena fuente de compuestos que, no siendo nutrientes, son biológicamente activos y potencialmente beneficiosos para la salud humana. En particular, su actividad antioxidante ha sido objeto de diversos estudios y, aunque dependa de la variedad, está positivamente correlacionada con el contenido en compuestos fenólicos totales y, sobre todo, con el contenido de antocianos, polifenoles cuantitativamente más importantes en la fresa (Wang y Lin, 2000; Wang y Jiao, 2000).

El principal pigmento antocianico de la fresa es el pelargonidina 3-glucósido (Pg 3-gluc), primeramente identificado por Robinson y Robinson (1931). Posteriormente, Lukton *et al.* (1955) identificaron cianidina 3-glucósido (Cy 3-gluc) y Hong y Wrolstad (1990b) Pg 3-rutinósido (Pg 3-rut), como pigmentos mayoritarios. Con relación a otros flavonoides, Co y Markakis (1968) describieron la presencia de cuatro flavonoles: quercetina 3-glucósido y 3-glucurónido, y kaempferol 3-glucósido y 3-glucurónido, y Stöhr y Herrmann (1975) detectaron tres flavan-3-oles: (+)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC) y (+)-galocatequina (GC), e identificaron diversos ácidos fenólicos, como ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido protocatéquico, ácido gálico, metil-galato y ácido elágico, además de los ácidos salicílico, gentísico y vanílico en cantidades traza. El ácido elágico es un ácido benzoico particularmente importante en la fresa, donde se puede encontrar tanto en forma libre como, más comúnmente, formando parte de elagitaninos hidrolizables solubles en agua (Gil *et al.*, 1997; Zafrilla, 1999; Häkkinen *et al.*, 2000a; Häkkinen y Törrönen, 2000c; Törrönen, 2000; Williner *et al.*, 2003; Kosar *et al.*, 2004). En la compilación hecha por Macheix *et al.* (1990) se hace referencia a la presencia en fresa de algunos de los flavonoides y ácidos fenólicos ya indicados y se añaden el ácido 5'-galoilquínico y los glucósidos de los ácidos *p*-hidroxibenzoico, *p*-cumárico, cafeico y ferúlico, así como los flavonoles:

kaempferol 3-galactósido, 3-xilosilglucurónido, 3-xilosilglucósido y posiblemente 7-glucósido, y quercetina 3-xilosilgalactósido y 3-xilosilglucurónido. Con respecto a flavanoles, de Pascual-Teresa *et al.* (2000) refieren, además de C, EC y GC, la presencia en fresa de procianidinas oligómeras (dímeros B1 a B4 y trímero EC-4,8-EC-4,8-C), EC-3-O-galato (ECG), (-)-epigallocatequina (EGC) y prodelfinidinas dímeras (GC-4,8-C). Más recientemente se ha detectado como componente minoritario la dihidrocalcona floridzina (Hilt *et al.*, 2003).

Los estudios disponibles sobre composición química, y particularmente perfil fenólico, de la fresa ponen de manifiesto la existencia de una notable variabilidad en función del genotipo, grado de madurez de los frutos, localización geográfica, técnica de cultivo y formas de conservación *post-recolección* y de procesado (Maas *et al.*, 1991; Bakker *et al.*, 1994; Gil *et al.*, 1997; Wang y Lin, 2000; Häkkinen *et al.*, 2000a y 2000b; Wang y Jiao, 2000; Häkkinen y Törrönen, 2000c; Wang *et al.*, 2002; Williner *et al.*, 2003; Sturm *et al.*, 2003; Kosar *et al.*, 2004). No obstante, Kosar *et al.* (2004), en un estudio reciente sobre la composición fenólica de diversas variedades e híbridos de fresa a lo largo de la maduración, tras contrastar sus resultados con los de otros autores, llegaron a la conclusión de que las diferencias en la misma encontradas en la literatura podrían en parte explicarse por el uso de diferentes métodos de extracción/hidrólisis y analíticos.

3 – ANTOCIANOS

3.1 – ESTRUCTURA

Los antocianos (del griego *anthos* = flor y *kianos* = azul) son pigmentos pertenecientes a la clase de compuestos fenólicos más extendida, los flavonoides. En los tejidos vegetales son responsables de una paleta variada de colores: naranja, rosa, escarlata, rojo, malva, violeta, y azul (Strack y Wray, 1989), pudiendo estar presentes en todas las partes de las plantas (Brouillard, 1982) – frutos, flores, tallos, hojas y raíces. Habitualmente se encuentran en disolución dentro de las vacuolas celulares, aunque a veces pueden estar localizados en vesículas esféricas existentes en el interior de la célula, llamadas antocianoplastos (Strack y Wray, 1989).

Químicamente los antocianos se definen como glicósidos y acilglicósidos de antocianidinas (aglicones antociánicos). A su vez, éstas son derivados polihidroxilados/polimetoxilados del catión flavilio - el 2-fenilbenzopirilio – que es un híbrido de resonancia, en el cual la carga positiva está deslocalizada por todo el sistema heteroaromático, dando lugar a un catión heteroaromático carboxonio (figura I.2), cuya mayor densidad relativa de carga positiva se localiza sobre los carbonos C-2 y C-4, (Brouillard, 1982; Strack y Wray, 1994). La presencia del ion oxonio adyacente a la posición C-2 en los antocianos, es responsable de su característica naturaleza anfotérica (Jackman y Smith, 1996).

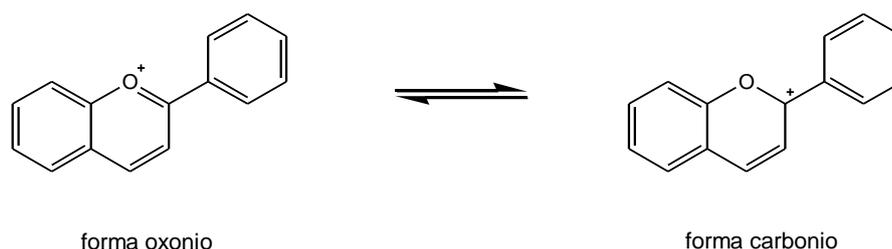
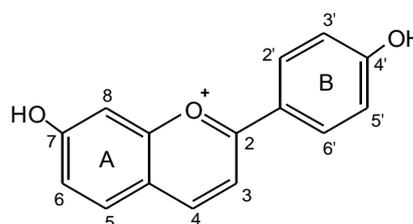


Figura I.2 – Equilibrio para las estructuras de resonancia oxonio-carbonio del 2-fenilbenzopirilio o ion flavilio.

Se han descrito 22 antocianidinas monoméricas (Andersen, 2002) con diferencias en el número y posición de los sustituyentes hidroxilo y metoxilo, aunque seis de ellas constituyen la mayoría de los antocianos comunes (tabla I.2). Se conocen varios

centenares de antocianos, que se diferencian de acuerdo a la antocianidina de base, la identidad, número y posición de unión de las moléculas de azúcar, la existencia o no de acilación del azúcar y la identidad del agente o agentes acilantes, cuando lo(s) haya (Clifford, 2000). Las clases de glicósidos más comunes son los 3-monósidos, 3-biósidos y 3-triósidos, así como los 3,5-diglucósidos y, más raramente, los 3,7-diglucósidos; también se han descrito antocianos glicosilados en las posiciones 3' y 5'. Los azúcares que más frecuentemente se encuentran unidos al aglucón son glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa y fructosa. También son frecuentes disacáridos, como rutinosa (6-O- α -L-ramnosil-D-glucosa), soforosa (2-O- β -D-glucosil-D-glucosa) y sambubiosa (2-O- β -D-xilosil-D-glucosa), o trisacáridos como 2-xilosilrutinosa y glucosilrutinosa. Latirósidos, gentiobiósidos o laminariobiósidos son mucho menos frecuentes. Entre los agentes acilantes que pueden estar ligados al residuo(s) de azúcar(es), se encuentran ácidos hidroxicinámicos (cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico), que pueden ellos mismos presentar restos azúcar adicionales, ácidos hidroxibenzoicos (*p*-hidroxibenzoico, gálico, vinílico, siríngico y protocatéquico), ácido acético y algunos ácidos alifáticos dicarboxílicos, como malónico, málico, oxálico y succínico (Harborne y Grayer, 1988; Strack y Wray, 1989; Strack y Wray, 1994; Jackman y Smith, 1996).

Tabla I.2 – Estructuras de las antocianidinas más frecuentes en la Naturaleza y de algunos de sus glicósidos.

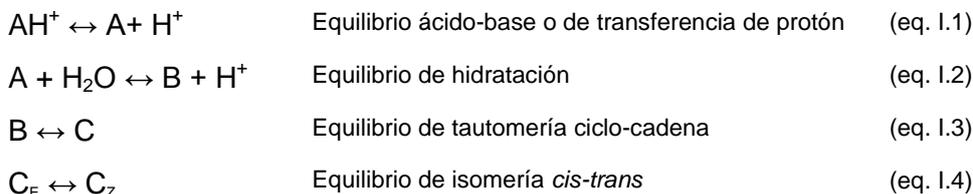


Antocianidina	Patrón de sustitución*			
	3'	5'	3	5
<i>Estructuras básicas comunes</i>				
Pelargonidina (Pg)	H	H	OH	OH
Cianidina (Cy)	OH	H	OH	OH
Delfinidina (Dp)	OH	OH	OH	OH
<i>Estructuras metiladas comunes</i>				
Peonidina (Pn)	OMe	H	OH	OH
Petunidina (Pt)	OMe	OH	OH	OH
Malvidina (Mv)	OMe	OMe	OH	OH
Antocianos				
Pg 3-glucósido (calistefina)	H	H	O-glucosa	OH
Cy 3-rutinósido (keracianina)	OH	H	O-glucosa	OH
Mv 3-glucósido (oenina)	OMe	OMe	O-glucosa	OH
Mv 3,5-diglucósido (malvina)	OMe	OMe	O-glucosa	O-glucosa

Los cromóforos antociánicos básicos son pelargonidina (escarlata), cianidina, (carmesí) y delphinidina (morada) (Strack y Wray, 1994). Un aumento en el número de grupos hidroxilo tiende a conferir matices más azulados, mientras que el aumento en el número de grupos metoxilo desplaza el color a tonos más rojizos (Jackman y Smith, 1996; Delgado-Vargas *et al.*, 2000). La combinación con azúcares y/o grupos acilo y las interacciones con otras moléculas y/o condiciones del medio son la razón de la diversidad de colores observada en la Naturaleza a partir de una misma antocianidina (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

3.2 – EQUILIBRIOS

El color de los antocianos está profundamente afectado por la naturaleza físico-química del medio en el que se encuentran. En disolución acuosa a valores de pH débilmente ácidos existen cinco tipos estructurales básicos de antocianos en equilibrio: el catión flavilio, AH^+ (rojo), la anhidrobase quinoidal, A (azul), la base carbinol, B (incolora), la forma *cis*-calcona, C_E (amarilla) y la forma *trans*-calcona, C_Z (amarilla). La interconversión entre estas cinco estructuras tiene lugar de acuerdo con el esquema:



Cada una de estas especies presenta un número de formas tautoméricas en las que se pueden interconvertir rápidamente (Clifford, 2000). La figura I.3 ejemplifica esta interconversión estructural para el principal antociano de la fresa, la Pg 3-glucósido. La proporción entre las diversas formas estructurales está determinada principalmente por el pH. El catión flavilio (AH^+) permanece estable solamente en medios suficientemente ácidos. A pH ácido, pero próximo a la neutralidad, y en medio no acuoso, las formas que predominan son las anhidrobases quinoidales (colectivamente designadas por A). La especie flavilio actúa como un agente electrófilo, con facilidad para sufrir una adición covalente nucleofílica en las posiciones 2 y/o 4; de este modo, en medios acuosos, existe una relativamente rápida adición de agua al sistema flavilio, empezando a valores de pH cercanos a 2, con formación de los aductos hemiacetal o pseudobases carbinol (colectivamente designadas por B) y consecuente pérdida de color. El ion

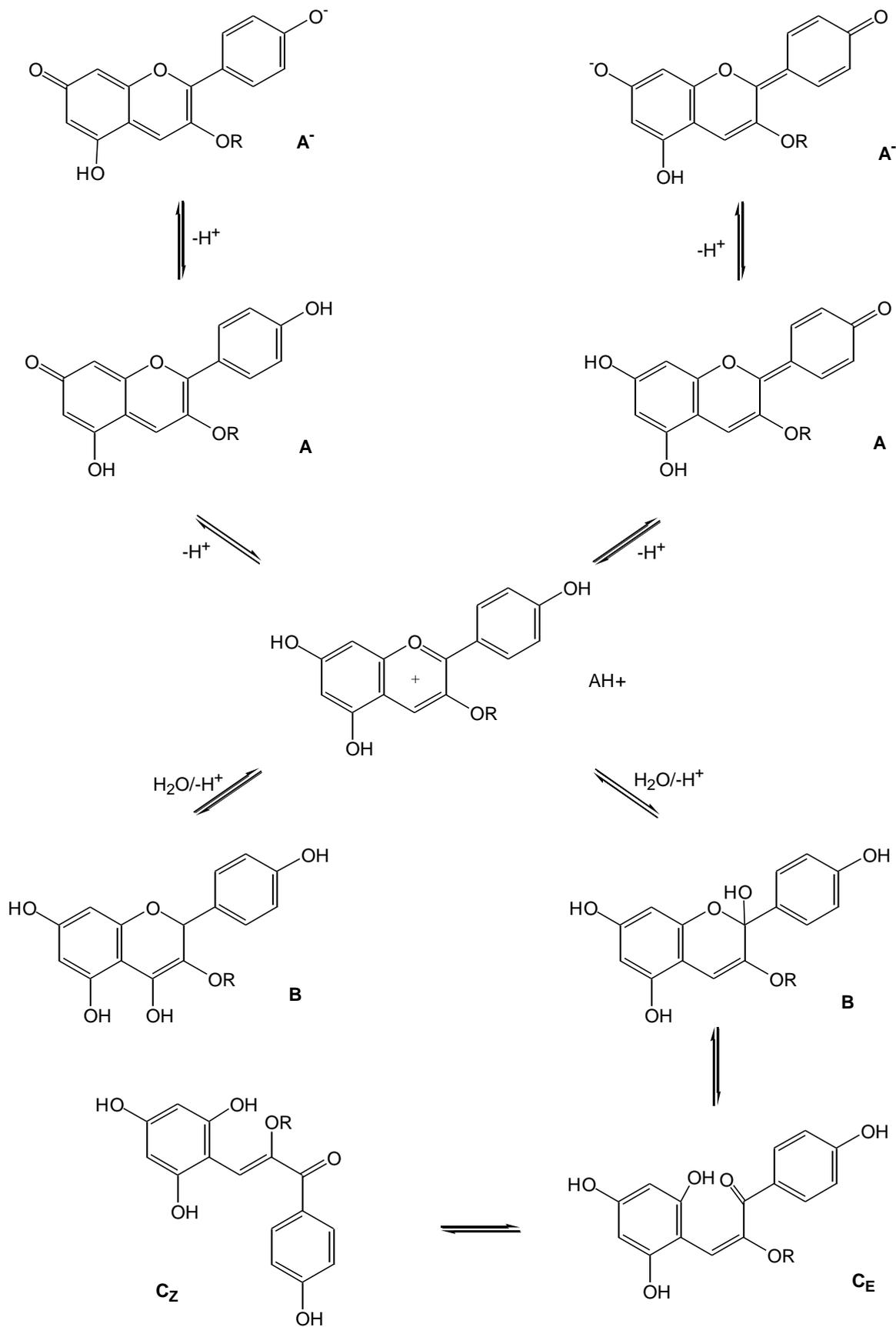


Figura 1.3 – Transformaciones estructurales del antociano mayoritario de la fresa: pelargonidina 3-glucósido (adaptado de Brouillard *et al.*, 1997).

flavilio puede ser restaurado por subsecuente acidificación. El primer equilibrio (ácido-base) es muy rápido (del orden de milisegundos) comparado con el mucho más lento equilibrio de hidratación (varios segundos). A temperatura ambiente y en medios poco ácidos, la transformación de la base carbinol en las formas abiertas calcona (colectivamente designadas por C) tarda varias horas en alcanzarse. En el equilibrio *cis/trans*-calcona prevalece la forma *cis* (C_E), que se reconvierte fácilmente al catión flavilio al disminuir el pH, mientras que la forma *trans* (C_Z) encuentra mayor dificultad para la reversión. En medio alcalino, las estructuras calcona existen en parte en forma ionizada (Jackman y Smith, 1996; Brouillard *et al.*, 1997; Moncada *et al.*, 2003).

Estas reacciones son características del aglucón y no implican directamente la participación de los azúcares y/o grupos acilados, aunque éstos puedan tener un profundo efecto sobre los equilibrios de hidratación, apertura del anillo e isomerización. Por otro lado, las reacciones $A \rightarrow AH^+$, $AH^+ \rightarrow B$ y $B \rightarrow C$ son todas endotérmicas; así, cualquier aumento de temperatura favorece el desplazamiento hacia las formas calcona C, que serán las formas predominantes a temperaturas superiores a 60°C (Brouillard, 1982).

3.3 – ESTABILIDAD Y REACCIONES

Los antocianos son intrínsecamente inestables y, particularmente, cuando se encuentran fuera de su medio natural y de la protección ofrecida por la copigmentación (ver posteriormente). El conocimiento de sus mecanismos de degradación y de los factores que rigen su estabilidad es importante no sólo para una eficiente extracción/purificación con vistas a su uso posterior (por ejemplo, como colorantes de alimentos), sino también para mejorar los procesos tecnológicos industriales y obtener, así, alimentos con un color adecuado y estable. La velocidad de degradación de los antocianos depende de la acidez, siendo más rápida a valores de pH elevados. Además del pH, también tienen gran influencia sobre la estabilidad otros factores, como la temperatura, la presencia de oxígeno y la luz, así como la actividad enzimática y las interacciones con otros componentes de los alimentos (p. e., ácido ascórbico, iones metálicos, azúcares o copigmentos) (Jackman y Smith, 1996). La pérdida del resto o restos de azúcar, por vía enzimática o por hidrólisis ácida, desestabiliza los antocianos, ya que la forma calcona no glicosilada es una α -dicetona inestable, que sufre una fácil ruptura. Daños físicos como el pelado, el corte, el troceado, etc., rompen las

membranas y facilitan la mezcla de enzimas y antocianos, localizados anteriormente en compartimentos separados (Clifford, 2000).

A continuación, se comentan de manera resumida los efectos que distintos factores muestran sobre la estabilidad de los antocianos, aunque se debe tener en cuenta la interdependencia existente entre los mismos, que imposibilita la evaluación de su importancia por separado (Jackman y Smith, 1996).

1) Estructura química

No todos los antocianos presentan la misma resistencia a los efectos deletéreos de los distintos agentes. La presencia y posición de los grupos hidroxilo y metoxilo, azúcares y tipo y grado de acilación influyen sobre la estabilidad de los antocianos (Cabrita *et al.*, 2000; Cooper-Driver, 2001). Diversos autores han comprobado que los antocianos diglucósidos son más estables a la decoloración, por efecto del calor y la luz, que los monoglucósidos. Esto puede ser explicado si se considera que la sustitución en C5 reduce el carácter nucleofílico de las posiciones C6 y C8, y así, los antocianos 3,5–diglucósidos son menos susceptibles de ataque electrofílico que los 3-glucósidos (Shenoy, 1993; Zafrilla, 1999; Martí *et al.*, 2001). La acilación estabiliza los antocianos via copigmentación intramolecular, debido a la protección que los grupos acilo ofrecen al anillo pirilio a través de la formación de estructuras plegadas de tipo “sandwich” (ver figura 1.5, más adelante), siendo el efecto más acusado cuando los sustituyentes son grupos acilo aromáticos (Dangles *et al.*, 1993; Jackman y Smith, 1996). Fossen *et al.* (1998) también comprobaron que la estabilidad e intensidad de color de las formas quinoidales es reforzada por la existencia de acilación.

2) pH

En la figura 1.4 se recoge la distribución entre distintas formas estructurales en medios acuosos en función del pH para cianidina 3,5-diglucósido establecida en sistemas modelo. De acuerdo con esta distribución, en las vacuolas celulares, donde el pH suele situarse entre 3,0 y 7,0, debería existir un predominio de estructuras incoloras. Sin embargo, las especies incoloras raras veces son encontradas en los tejidos celulares intactos, indicando que *in vivo*, existen mecanismos de estabilización que desplazan los equilibrios hacia las formas coloreadas de los antocianos. Entre estos mecanismos, la copigmentación, de la que se hablará a continuación, es probablemente el más eficiente, favoreciendo la existencia de los cromóforos

antocianos por reducción de los valores de K'_h y confiriendo así color al tejido vegetal en un intervalo de pH en el que los antocianos deberían encontrarse en forma incolora. Igualmente, Harborne sugirió que en la vacuola celular los antocianos podrían estar ligados iónicamente ácidos orgánicos alifáticos, tales como los ácidos malónico, málico o cítrico, y que estas interacciones constituirían una forma de estabilización del color *in vivo* (Jackman y Smith, 1996).

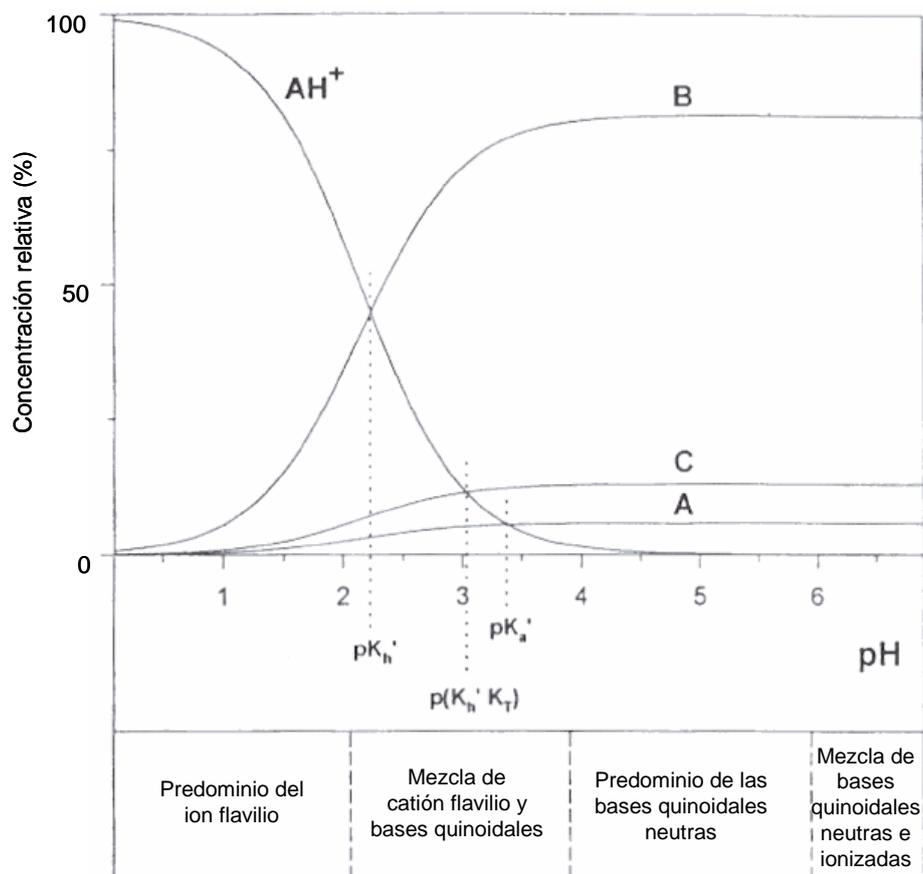


Figura I.4 – Distribución de formas estructurales de cianidina 3,5-diglucósido (a 25°C) en función del pH: catión flavilio (AH^+); bases carbinol (B); calconas (C), base(s) quinoidal(es) (A). $pK'_a = -\log K'_a$; $pK'_h = -\log K'_h$; $pK_t = -\log K_t$; $K'_a = ([A]/[AH^+])a_{H^+}$; $K'_h = (([B]+[C])/[AH^+])a_{H^+}$; $K_t = ([C]/[B])$; a_{H^+} es la actividad del proton (Jackman y Smith, 1996).

El pH del medio, al hacer variar la estructura de un antociano, tiene una marcada influencia sobre su color y estabilidad. Cuando están fuera de su medio natural, en disoluciones acuosas ligeramente ácidas, la mayoría de los antocianos tienden a decolorar rápida y, en ocasiones, completamente (Jackman y Smith, 1996; Brouillard *et al.*, 1997; Clifford, 2000). En general, se considera que los antocianos diglucósidos son

más resistentes a la degradación a pH poco ácido que los monoglucósidos (Zafrilla, 1999).

3) Copigmentación

El proceso de copigmentación es exclusivo de la familia antociánica (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Se trata de un conjunto de interacciones moleculares que estabilizan las formas catión flavilio/anhidrobases quinoidales, evitando la reacción con el agua y la subsecuente formación de formas carbinol decoloradas (Brouillard *et al.*, 1997; Cooper-Driver, 2001). Las especies antociánicas coloreadas (cation flavilio y bases quinoidales) son casi planas y con un sistema de electrones- π fuertemente deslocalizado, lo que facilita un buen contacto molecular con un copigmento que tenga un patrón de estructura similar (Jackman y Smith, 1996). Los copigmentos son sustancias generalmente aromáticas, capaces de establecer interacciones intermoleculares hidrofóbicas entre su(s) propio(s) núcleo(s) aromático(s) y los del antocianos; pueden actuar inter- o intramolecularmente y presentar poco o ningún color por sí mismos (Figueiredo *et al.*, 1996). Casi todos los polifenoles pueden actuar como copigmentos, con más o menos eficiencia dependiendo de su estructura química (Brouillard *et al.*, 1997). En distintos medios naturales han sido encontrados como copigmentos, ácido clorogénico, diversos flavonoides, incluyendo taninos, flavonas y flavonoles (Figueiredo *et al.*, 1996), alcaloides, aminoácidos, ácidos benzoicos, cumarinas y ácidos cinámicos (Delgado-Vargas *et al.*, 2000); además algunos iones metálicos, y especialmente magnesio, hierro (Cooper-Driver, 2001) y aluminio (Brouillard, 1982), pueden mostrar efectos similares a los de la copigmentación.

Estas asociaciones provocan un desplazamiento hiperacrómico, generalmente acompañado por un cambio batocrómico, en la banda de absorción visible. En la formación de los complejos de copigmentación se produce una desolvatación parcial de las moléculas de pigmento y copigmento, permitiendo un contacto más próximo entre ambas moléculas. La estequiometría de los complejos formados suele ser de tipo 1:1. El efecto hiperacrómico se debe al acceso reducido de las moléculas de agua a los sitios electrofílicos C-2 y C-4 de la estructura flavilio, lo que evita su decoloración y hace que existan más cromóforos en disolución. El desplazamiento batocrómico (aumento de la longitud de onda de máxima absorción en la región del visible) resulta de una reducción de la polaridad en la vecindad inmediata del cromóforo, como consecuencia del desplazamiento de parte de las moléculas de agua por una molécula orgánica menos polar (Brouillard, 1982; Brouillard *et al.*, 1997; Jackman y Smith, 1996).

Existen diferentes modos posibles de copigmentación (figura I.5) según el tipo de copigmento, así se habla de copigmentación intermolecular (el agente es una molécula diferente al antociano), intramolecular (una parte del antociano actúa como copigmento) y autoasociación o copigmentación homomolecular (las interacciones se establecen entre distintas moléculas de antocianos). La copigmentación intramolecular se establece cuando los antocianos presentan sustituyentes acilo aromáticos, cuyos anillos bencílicos, por plegado de la molécula, son capaces de interactuar con el cromóforo protegiéndolo del ataque nucleofílico del agua y evitando así la formación de especies hidratadas. Se ha indicado que este tipo de copigmentación es más eficaz que la intermolecular (Brouillard *et al.*, 1982; Dangles *et al.*, 1993). La autoasociación es una asociación de las formas catiónicas de los antocianos, que se manifiesta en forma de una desviación a la ley de Beer, al dar lugar a un aumento en el color de las disoluciones superior al que cabría esperar para incrementos lineales en la concentración del pigmento. Este fenómeno se observa en disoluciones concentradas poco ácidas o neutras y está afectado por el tipo y concentración del antociano (Brouillard, 1982; Zafrilla, 1999). Se ha sugerido que al mismo podría también contribuir la complejación con iones metálicos (Cooper-Driver, 2001).

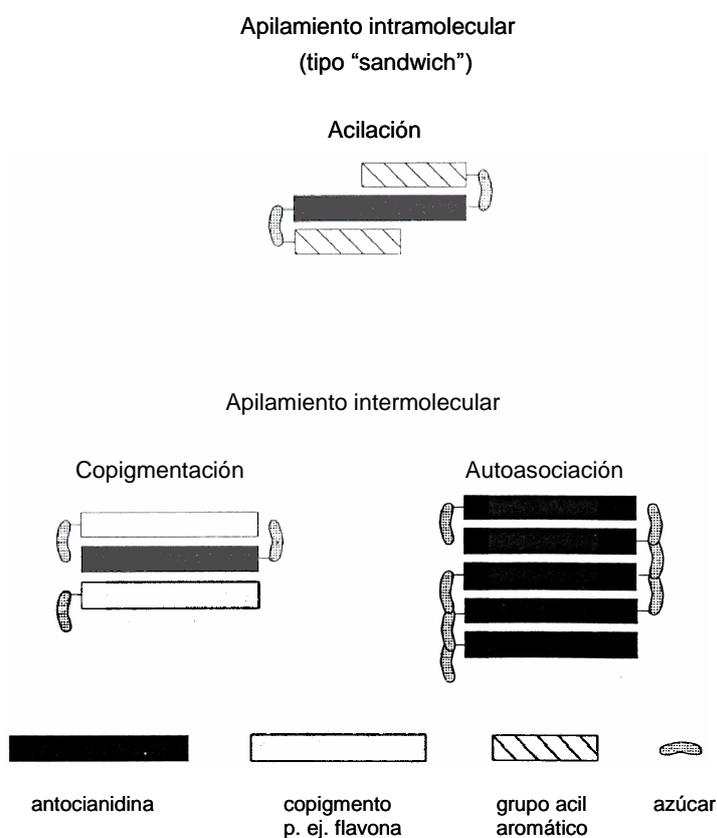


Figura I.5 – Representación esquemática de los mecanismos de estabilización antocianica vía copigmentación (Jackman y Smith, 1996).

4) Enzimas

Existen enzimas endógenas de algunos tejidos de las plantas implicadas en la degradación de los antocianos y su consiguiente pérdida de color. De acuerdo con su actividad, se identifican tres grupos principales de enzimas que pueden utilizar compuestos fenólicos como sustratos: glicosidasas, polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasas (P). Algunas glicosidasas son capaces de hidrolizar la unión glicosídica para liberar el azúcar unido al antociano, dando lugar a la antocianidina, inestable, que se degrada espontáneamente a través de la forma calcona (Piffaut *et al.*, 1994; Jackman y Smith, 1996; Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Las glicosidasas presentes en productos de origen vegetal pueden también tener un origen fúngico (Shenoy, 1993).

Las PPO y P están implicadas en el pardeamiento enzimático de tejidos vegetales. Las PPO catalizan la transformación oxidativa de catecol y otros compuestos *o*-dihidroxifenólicos a sus correspondientes *o*-quinonas, las cuales pueden entonces reaccionar entre sí, con aminoácidos o proteínas y/o con otros compuestos fenólicos, dando lugar a la formación de polímeros de color marrón. De este modo, se ha indicado que mientras la cianidina 3-glucósido (antociano *O*-difenólico) es degradada por un mecanismo oxidativo, la pelargonidina 3-glucósido (antociano no *O*-difenólico) se pierde principalmente a través de un proceso de condensación no oxidativo (Kader *et al.*, 2001; Kader *et al.*, 2002).

Está demostrado que el ácido clorogénico (CGA) se comporta como un buen copigmento de los antocianos (Mazza y Brouillard, 1987). Sin embargo, los antocianos son también oxidados por la quinona del CGA, formada a partir de su oxidación por acción de la peroxidasa en presencia de H₂O₂. Así, estudios hechos en sistemas modelo (Kader *et al.*, 1999, 2002) revelan que la degradación de los antocianos aumenta de manera importante en presencia de CGA y peroxidasa; en el caso del principal pigmento de la fresa - pelargonidina 3-glucósido – se ha estimado que la tasa inicial de degradación es 2,4 veces mayor en presencia que en ausencia de CGA. Para la peroxidasa, el factor limitante de su actividad suele ser la baja concentración celular en H₂O₂ (Kader *et al.*, 2002).

La actividad de estas enzimas puede ser reducida por escaldado o adición de dióxido de azufre (Jackman y Smith, 1996; Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

5) Temperatura

La degradación de los antocianos es acelerada por el aumento de la temperatura (Shenoy, 1993). De acuerdo con Delgado-Vargas *et al.* (2000), para un calentamiento a temperatura constante, la destrucción de antocianos con el tiempo sigue un proceso de tipo logarítmico. En general, los perfiles estructurales que confieren mayor estabilidad frente a las variaciones de pH (esto es, metoxilación, glicosilación, acilación), también confieren mayor estabilidad térmica. En presencia de oxígeno, el valor de pH al que existe la mayor estabilidad térmica aumenta al hacerlo el número de sustituciones metoxil, glicosil y/o acil. En condiciones anaerobias, sin embargo, la degradación de antocianos parece ser independiente del pH (Calvi y Francis, 1978; Jackman y Smith, 1996).

Las reacciones de hidratación del catión flavilio ($AH^+ \rightarrow B$) y de apertura del anillo ($B \rightarrow C_E$) son endotérmicas, por lo que el aumento de la temperatura desplaza los equilibrios estructurales de los antocianos hacia la forma calcona, lo que conduce a una decoloración de sus disoluciones.

A pesar de que la desglicosilación no parece necesaria para la inducción de la degradación térmica de antocianos, la extensión de este proceso aumenta al hacerlo la temperatura, teniendo lugar de manera rápida a temperaturas en torno a 100°C o superiores. El tratamiento a temperaturas altas durante tiempos cortos, sin embargo, no conlleva, en general, una degradación significativa de los antocianos y/o transformaciones a especies incoloras (Jackman y Smith, 1996) y se ha recomendado para mejorar la retención de pigmentos antocianicos en alimentos procesados (Rommel *et al.*, 1992). Hay estudios que indican que durante la esterilización a elevada temperatura de frutos rojos, la pérdida de pigmentos es despreciable comparada con la que ocurre durante un enfriamiento lento o el almacenamiento prolongado a temperatura ambiente (Shenoy, 1993).

La cinética de desglicosilación térmica varía con el número y naturaleza de los sustituyentes glicosilo, influyendo posiblemente en el mecanismo de degradación térmica (Jackman y Smith, 1996). Así, se ha detectado la formación de una cumarina glicosilada como un producto común de la degradación térmica de antocianidinas 3,5-diglucósido; sin embargo, no se ha observado la producción de cumarinas a partir de las antocianidinas 3-glucósido. Una vez producida la desglicosilación, todas las antocianidinas parecen experimentar una degradación térmica similar, con formación de una calcona intermediaria, cuya subsiguiente ruptura origina un ácido carboxílico a

partir del anillo B y carboxialdehídos a partir del anillo A (Furtado *et al.*, 1993; Piffaut *et al.*, 1994; Maccarone *et al.*, 1987).

En el procesado de alimentos, hay que tener en cuenta que los productos que resultan de la degradación de los carbohidratos, como furfural e hidroximetilfurfural (HMF), también favorecen la pérdida de antocianos a través de diferentes reacciones, que pueden también implicar a otros compuestos fenólicos, dando lugar, en algunos casos, a la formación de nuevos pigmentos (Shenoy, 1993; Es-Safi *et al.*, 2000; Debicki *et al.* 1983).

6) Oxígeno

El oxígeno acelera notablemente la velocidad de degradación de los antocianos (Shenoy, 1993), tanto por mecanismos de oxidación directa como indirecta, a través de otros constituyentes oxidados del medio que reaccionan con los mismos (Jackman y Smith, 1996). La presencia de ácido ascórbico tiene un efecto sinérgico con el oxígeno en el proceso de degradación de antocianos, como se podido comprobar para pigmentos de la fresa en estudios realizados en zumos y en sistemas modelo (Poei-Langston y Wrolstad, 1981).

7) Ácido ascórbico

El efecto destructivo mutuo que, en presencia de oxígeno, ejercen entre sí los antocianos y el ácido ascórbico se conoce desde hace mucho y ha sido objeto de diversos estudios tanto en disoluciones modelo (Poei-Langston y Wrolstad, 1981; García-Viguera y Bridle, 1999; Ortega Meder, 1995) como en sistemas naturales como zumos de fruta (Martí *et al.*, 2001). Se cree que la degradación de antocianos inducida por el ácido ascórbico tiene lugar a través del peróxido de hidrógeno, liberado en la oxidación de la vitamina en presencia de O₂ e iones cobre. Este tipo de interacción representa un problema importante, ya que muchos frutos ricos en antocianos contienen también cantidades elevadas de ácido ascórbico. Se ha visto que flavonoles, como quercetina, pueden ejercer un papel anti-oxidativo protector frente a la degradación de los antocianos por este proceso (García-Viguera y Bridle, 1999). El efecto deletéreo del ácido ascórbico sobre los 3-glucósidos es mayor que sobre los 3,5-diglucósidos (Martí *et al.*, 2001).

8) Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) tiene capacidad para decolorar los antocianos, incluso a valores de pH bajos ($pH=2$), en los cuales éstos son más estables. Además de formarse en el proceso de oxidación del ácido ascórbico, el H_2O_2 puede tener también un origen exógeno, al ser utilizado para la desinfección de la superficie de frutas y vegetales como alternativa a la cloración y también como esterilizante del envase en el procesado aséptico, donde podrían ocasionalmente quedar residuos (Özkan *et al.*, 2002). Según estos mismos autores, la susceptibilidad al H_2O_2 es más grande en antocianos cuyo aglucón es la pelargonidina que en otros, como, por ejemplo, los derivados cianidina, lo que hace los productos de la fresa particularmente sensibles a la decoloración. Además, el elevado contenido en ácido ascórbico de la fresa, comparado con otras frutas, puede también contribuir a su mayor degradación. La degradación de antocianos catalizada por H_2O_2 muestra una elevada dependencia de la temperatura, por lo que se recomienda el almacenamiento en frío de zumos de fresa envasados asépticamente.

La cinética de la degradación de antocianos por H_2O_2 fue estudiada por Sondheimer y Kertsz en 1952 en zumos de fresa y en disoluciones de pelargonidina 3-glucósido, observando que el proceso se producía en dos etapas: una reacción inicial reversible con la formación de un aducto antociano- H_2O_2 , seguido de otra reacción más lenta e irreversible. Según Jackman y Smith (1996), el H_2O_2 actúa a través del ataque nucleofílico sobre la posición C-2 de los antocianos, lo que conduce inicialmente a la apertura del heterociclo con formación de una estructura calcona, que posteriormente se rompe a diversos ésteres incoloros y derivados de cumarina. Éste no debe ser, sin embargo, el único mecanismo responsable de la destrucción de antocianos inducida por peróxido de hidrógeno. En disolución acuosa, el H_2O_2 se descompone fácilmente hacia productos muy reactivos, como el anión perhidroxilo (HOO^-) y los radicales hidroxilo ($\cdot OH$) y perhidroxilo ($\cdot OOH$), capaces de reaccionar con los antocianos decolorándolos. Por otra parte, en productos ricos en compuestos fenólicos, los antocianos pueden también interaccionar con las quinonas formadas como resultado de la oxidación de los primeros catalizada por H_2O_2 , lo que induce reacciones de oxidación en cadena y procesos de condensación.

9) Luz

La luz tiene dos efectos opuestos sobre el contenido de antocianos en los productos vegetales: en tejidos vivos favorece normalmente su biosíntesis, mientras que en productos procesados acelera su degradación. Los antocianos son en general más inestables cuando están expuestos a la luz ultravioleta o visible u otras fuentes de radiación ionizante (Maccarone *et al.*, 1987; Furtado *et al.*, 1993; Delgado-Vargas *et al.*, 2000). La velocidad de degradación de los antocianos en presencia de luz se ajusta a una cinética de primer orden, cuya pendiente es directamente proporcional a la intensidad luminosa (Zafrilla, 1999). Furtado *et al.* (1993) encontraron que la fotodegradación conduce a los mismos productos que la degradación térmica y que la luz aumenta la tasa de degradación térmica de los antocianos por formación de un estado excitado del catión flavilio. De acuerdo con Shenoy (1993), los antocianos diglucósidos son más estables frente a la fotólisis que los monoglucósidos y éstos más que sus correspondientes antocianidinas. Flavonas e isoflavonas parecen aumentar la fotoestabilidad de los pigmentos (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

10) Actividad de agua, azúcares y sus productos de degradación

El uso de concentraciones elevadas de azúcar (superiores al 20%) o jarabes para conservar frutas y productos derivados tiene un efecto protector sobre los cromóforos, antocianicos, presumiblemente debido a la disminución de la actividad del agua (Wrolstad *et al.*, 1990). La reducción en la actividad del agua (a_w) está asociada con una menor tasa de degradación de los antocianos, ya que la reacción de hidratación que conduce a especies incoloras de los antocianos está menos favorecida a medida que el agua se vuelve limitante (Erlandson y Wrolstad, 1972). De este modo, los antocianos en forma de polvo ($a_w \leq 0.3$) son relativamente estables a temperatura ambiente cuando se guardan en recipientes cerrados herméticamente (Jackman y Smith, 1996).

Para concentraciones bajas de azúcares, por encima de un determinado umbral de concentración, estimado en torno a 100 ppm, los azúcares y sus productos de degradación aceleran la pérdida de antocianos (Calvi y Francis, 1978). Fructosa, arabinosa, lactosa y sorbosa tienen un efecto deletéreo superior a glucosa, sacarosa o maltosa. La velocidad de destrucción de los antocianos en presencia de azúcares está asociada con la velocidad a la que los azúcares son degradados a compuestos de tipo furfural (formado mayoritariamente a partir de aldo-pentosas) o *t*-hidroximetilfurfural

(HMF; formado a partir de ceto-hexosas). Este tipo de productos aparecen como resultado de reacciones de pardeamiento no enzimático, como la reacción de Maillard o la oxidación del ácido ascórbico, y son capaces de reaccionar y/o condensar con los antocianos y otros compuestos fenólicos, dando lugar a productos incoloros o pardos (Shenoy, 1993; Es-Safi *et al.*, 2000; Debicki *et al.*, 1983). La pérdida de antocianos en presencia de furfural y HMF es directamente dependiente de la temperatura y más pronunciada en sistemas naturales (por ejemplo, zumos). Se ha comprobado que el oxígeno aumenta los efectos degradativos de todos los azúcares y derivados (Jackman y Smith, 1996).

11) Metales

Los antocianos son capaces de formar complejos con diversos metales di- o trivalentes, como estaño, cobre, aluminio o hierro, dando lugar a cambios en su coloración. De manera general, estos complejos se establecen con antocianos que poseen grupos ortodihidroxilo en el anillo B y dan lugar a un desplazamiento batocrómico en la banda de absorción en el visible, es decir desplazan el color hacia tonos más azules (Elhabiri *et al.*, 1997). Los complejos entre antocianos y metales contribuyen a la estabilización del color en diversos medios naturales y en algunos casos se han también propuesto como colorantes (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Sistrunk y Cash (1970) utilizaron sales de estaño para estabilizar el color de puré de fresa. Wrolstad y Erlandson (1973) sugirieron que la estabilización del color en zumos de fresa inducida por sales de estaño debía atribuirse a la formación de complejos con cianidina 3-glucósido, ya que el antociano mayoritario de la fresa (pelargonidina 3-glucósido) no posee un grupo ortodifenólico. Los antocianos pueden entrar en contacto con metales, bien de forma espontánea durante el procesado de frutas y hortalizas, o mediante la adición deliberada de sales a los alimentos (Zafrilla, 1999).

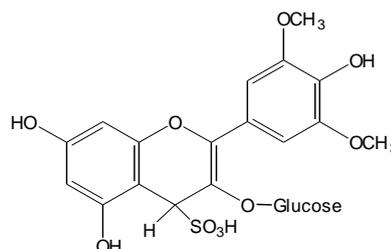
Por otra parte, los metales pueden actuar como catalizadores en procesos de degradación de antocianos. Es bien conocida por la industria la decoloración de los antocianos de frutas por reacción con la hojalata de los botes de conserva (Shenoy, 1993).

12) Dióxido de azufre

El dióxido de azufre (SO₂) y sus análogos, usados como agentes antimicrobianos y como inhibidores de PPO, provocan la decoloración de los antocianos, por formación

de un aducto incoloro en C4, cuya identidad estereoquímica ha sido confirmada inequívocamente (figura I.6). La decoloración de los antocianos por esta vía puede ser reversible o irreversible. Frutos y mostos son preservados por adición de cantidades moderadas de bisulfito y desulfitados antes del posterior procesado, recuperando el color del antociano (Shenoy, 1993). El blanqueo irreversible se produce cuando se utilizan cantidades muy elevadas de SO₂, del orden del 0,8 al 1,5% (Zafrilla, 1999).

Figura I.6 – Estructura del aducto incoloro entre malvidina 3-glucósido y bisulfito (Berké *et al.*, 1998).



3.4 – INTERÉS TECNOLÓGICO

El análisis del perfil de antocianos ha sido utilizado para la detección de eventuales adulteraciones en algunos alimentos (Hong y Wrolstad, 1990a; Boyles y Wrolstad, 1993), así como para determinar el origen o la autenticidad en diversos productos, como vinos tintos, zumos o confituras de fruta (Santos-Buelga *et al.*, 1991; Boyles y Wrolstad, 1993; García-Viguera *et al.*, 1997; Clifford, 2000). La composición antociánica cuali- y cuantitativa puede, además, ser utilizada como un indicador de condiciones inadecuadas de procesado o almacenamiento, si durante estas fases hay formación de cantidad elevada de pigmentos poliméricos en detrimento de los antocianos monómeros, lo que, en general, se asocia a un producto de menor calidad (Boyles y Wrolstad, 1993).

Otro aspecto de interés en relación con los antocianos es la posibilidad de su utilización como aditivos alimentarios. La seguridad de los colorantes sintéticos empleados como colorantes en alimentos ha sido continuamente cuestionada en los últimos años, lo que ha conducido a una reducción en el número de sustancias autorizadas y a una búsqueda de alternativas más seguras, entre las cuales se encuentran los extractos de pigmentos naturales. Dado que buena parte de los colores naranja, rojo y azul encontrados en el reino vegetal son debidos a los antocianos, es natural que se piense en los mismos como colorantes en este intervalo de colores. De

hecho, los antocianos (E-163) figuran en las listas positivas de aditivos colorantes (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1996a,1996b) y, con este fin, han sido utilizados en bebidas refrescantes, preparaciones de frutas, mermeladas y confituras, productos de confitería, derivados lácteos, postres ácidos y bebidas en polvo (Henry, 1996). Aunque, como se ha indicado, se trata en general de pigmentos inestables, el número de aplicaciones potenciales está aumentando debido al mejor conocimiento y comprensión de los factores que contribuyen a reforzar su estabilidad en las matrices alimentarias (Giusti, 2002).

Para la extracción de antocianos con vistas a su utilización como colorantes naturales se han empleado distintas fuentes vegetales, como hollejos de uva o subproductos de vinificación (*enocianina*), col roja, diferentes bayas (como la de saúco, grosella negra o arándano), naranja sanguina, rábano, patatas pigmentadas o maíz morado, estas tres últimas fuentes ricas en antocianos acilados, considerados más estables. En la búsqueda de nuevos antocianos acilados más estables se han identificado algunas flores como fuentes potenciales para la extracción, como las flores de *Hibiscus sabdariffa* L o de *Tradescantia pallida* (Shi *et al.*, 1992; Clydesdale *et al.*, 1978; Skrede *et al.*, 1992; Jackman y Smith, 1996; Rodriguez-Saona *et al.*, 1998; Giusti *et al.*, 1998b; Giusti, 2002). No obstante, a la hora de elegir una fuente vegetal para la extracción de antocianos se debe tener en cuenta que el nivel y también, en ocasiones, el tipo de pigmentos presentes están influidos por la variedad, estado de maduración y factores ambientales y de cultivo (luz, temperatura, fertilización, suministro de agua, etc.) (Mazza y Miniati, 1993b; Giusti *et al.*, 1998b). El cultivo de tejidos vegetales podría ser una alternativa adecuada para la producción industrial de antocianos y asegurar un suministro continuo de los mismos con una calidad uniforme (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

La inestabilidad de los antocianos hace que sus niveles en los productos vegetales procesados que los contienen, de modo natural o añadido, vayan disminuyendo gradualmente con el paso del tiempo, a la vez que aparecen nuevos productos, coloreados o no, como resultado de sus transformaciones y se produce un cambio de color. Estos procesos han sido, sobre todo, estudiados en relación con el envejecimiento de los vinos tintos, aunque se puede esperar que en otros sistemas alimentarios se produzcan cambios similares. De modo general, se pueden caracterizar hasta cinco tipos de transformaciones principales (Clifford, 2000):

- condensación directa entre antocianos y flavanoles monómeros u oligómeros (Bishop y Nagel, 1984; Remy-Tanneau *et al.*, 2003; Salas *et al.*, 2004), que

- podría ser seguida en algunos casos por deshidratación y protonación para formar sales de xantilio de color naranja (Liao *et al.*, 1992; Santos-Buelga *et al.*, 1996);
- condensación directa entre antocianos y flavanoles mediada por acetaldehído y posiblemente también por otros aldehídos provenientes de la transformación térmica de azúcares y ácido ascórbico (Rivas-Gonzalo *et al.*, 1995; Es-Safi *et al.*, 1999a, 1999b, 2002a; Vivar-Quintana *et al.*, 1999; Escribano-Bailón *et al.*, 2001);
 - constitución de dímeros entre antocianos y flavanoles y de homodímeros de flavanoles mediados por ácido glioxílico proveniente de la oxidación del ácido tartárico catalizada por Fe^{2+} (Fulcrand *et al.*, 1997; Es-Safi *et al.*, 2000, 2002b);
 - cicloadición a antocianos de acetaldehído, vinilfenoles (derivados de la descarboxilación de ácidos hidroxicinámicos) o de ácido pirúvico, con formación de derivados de tipo piranoantociano, que resisten al ataque por el SO_2 y retienen significativamente el color rojo incluso a valores de pH neutros (Bakker y Timberlak e, 1997; Fulcrand *et al.*, 1996; Francia-Aricha *et al.*, 1997; Mateus *et al.*, 2002);
 - y condensación directa entre antocianos y quinonas derivadas de la oxidación de compuestos fenólicos (Sarni-Manchado *et al.*, 1995, 1997; Kader *et al.*, 1998, 1999, 2001);

En un artículo de revisión, Shenoy (1993) hace referencia a diversas estrategias que pueden ser utilizadas para intentar estabilizar los antocianos con vistas a su aplicación alimentaria. En particular, recoge dos patentes japonesas: una, en la cual se estabilizan antocianos por adición en la formulación de ácido fítico y flavonas o flavonoles, como miricetina, quercetina o kaempferol; y otra, en donde la estabilización de antocianos se intenta conseguir emulsificando los pigmentos en agua que contiene un surfactante con un volumen igual de aceite, a $\text{pH}=3,5$. La estabilidad del color de los antocianos en sistemas alimentarios puede también mejorarse a través del establecimiento de complejos de copigmentación con otros compuestos fenólicos. En este sentido, en su revisión, Shenoy (1993) cita también estudios realizados por otros investigadores que proponen la incorporación al alimento de los ácidos clorogénico o cafeico para prevenir decoloración de los antocianos, o la adición de ácido tánico propuesta para estabilizar el color en zumos de naranja sanguina.

3.5 – EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

La elección del método para la extracción de antocianos depende fundamentalmente del propósito de la extracción (preparativo o analítico, grado de recuperación y de pureza pretendidos, etc.) y también de la naturaleza de los antocianos. Idealmente, los procedimientos de extracción y purificación no deberían consumir demasiado tiempo, ni resultar excesivamente complejos o caros (García-Viguera *et al.*, 1998). Los métodos convencionales de extracción se basan en la maceración repetida del material vegetal molido o triturado en un alcohol de bajo punto de ebullición, que contenga una pequeña concentración de un ácido mineral (por ejemplo, $\leq 1\%$ HCl). El metanol (MeOH) es el alcohol más frecuentemente usado, aunque, debido a su toxicidad, es preferible el etanol cuando los extractos van a ser usados con fines alimentarios, a pesar de ser menos efectivo y más difícil de concentrar. Otros solventes que también se han utilizado son mezclas metanol/agua, *n*-butanol, etilenglicol, acetona, mezclas acetona/metanol/agua, agua y vapor de agua. La extracción con agua sulfitada (1000 ppm SO₂) o con soluciones etanólicas de SO₂ se han utilizado con fines industriales, ya que aumentan el rendimiento en pigmento (Strack y Wray, 1989; Jackman y Smith, 1996).

La acidificación (típicamente realizada con HCl) es habitual para mantener un pH bajo, proporcionando de ese modo un medio favorable para la formación de las sales de flavilio de los antocianos (Jackman y Smith, 1996). La concentración del ácido no debe ser demasiado alta para reducir el riesgo de hidrólisis que altere la forma nativa del antociano. En este sentido, además de la separación de los azúcares con liberación de los aglucones inestables, se puede también producir una desacilación en el caso de los antocianos acilados con ácidos alifáticos (García-Viguera *et al.*, 1998). Por esta razón, se ha recurrido a la utilización de ácidos más débiles (acético, fórmico, cítrico, tartárico, perclórico), o fuertes pero más volátiles (como el ácido trifluoroacético), cuando existen antocianos acilados con ácidos alifáticos dicarboxílicos.

Además del tipo de solvente existen otros factores que influyen sobre la eficacia de la extracción sólido-líquido de antocianos, así como sobre la rapidez con la que éstos se disuelven y alcanzan la concentración de equilibrio en el líquido. Así, la tasa de extracción puede ser mejorada aumentando su coeficiente de difusión utilizando menores tamaños de partículas sólidas. El aumento de la temperatura y la disminución en el coeficiente de viscosidad aumentan significativamente la capacidad de difusión (Cacace y Mazza, 2002). Una vez extraídos, a fin de minimizar la degradación, es

conveniente realizar la concentración *in vacuo* y a baja temperatura, inferior a 30°C (Jackman y Smith, 1996; Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

Con frecuencia es necesaria la purificación de los extractos de antocianos, ya que ninguno de los solventes comúnmente utilizados para su extracción es totalmente específico para los mismos, por lo que se suelen extraer también cantidades considerables de material ajeno, como otras sustancias polifenólicas o pectinas, que pueden influir sobre la estabilidad y/o análisis de estos pigmentos. La eliminación de los flavonoides co-extraídos puede realizarse por técnicas cromatográficas, para lo cual se han empleado diversos tipos de fases, como polivinilpirrolidona (PVP), poliamida, geles de dextrano (Sephadex® G-25 o LH-20), octadecilsilano, resinas de intercambio iónico (p.ej., Amberlita® CG-50) o celulósicas, etc. En caso de que existan cantidades apreciables de lípidos, clorofilas o polifenoles lipófilos, se puede recurrir al lavado con un disolvente apolar, como éter de petróleo, éter etílico, éter dietílico o acetato de etilo (Jackman y Smith, 1996). Para fines analíticos (cualitativos y cuantitativos), se puede conseguir la separación rápida y eficiente de mezclas complejas a través de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), mediante la selección apropiada de eluyentes, columna (normalmente una fase reversa) y condiciones de flujo, temperatura y gradiente (Hong y Wrolstad, 1990a, 1990b).

La caracterización estructural implica la identificación del aglucón, de los azúcares y de los sustituyentes acilo, en el caso de que estén presentes, y la determinación de las posiciones respectivas de enlace. La identificación tradicional de antocianos se efectuaba mediante realización de hidrólisis controladas (ácida, alcalina, enzimática) y/o peroxidación, con posterior identificación de los productos formados por técnicas cromatográficas. Este tipo de procedimientos continúan siendo muy utilizados, ya que aportan información valiosa, especialmente cuando se conjugan con HPLC, para la identificación de los distintos elementos que forman parte de la estructura del antociano: antocianidina, azúcares y/o restos acilo, pero no aportan información sobre el tipo y las posiciones de enlace entre los mismos. La hidrólisis ácida permite separar aglucones y azúcares, facilitando la posterior identificación de ambos; en antocianos que cuentan con más de un azúcar sustituyente, puede recurrirse a una hidrólisis ácida secuencial, con el objeto de obtener productos intermedios, para concluir sobre el patrón de glicosilación. La hidrólisis alcalina permite separar los restos esterificados, por lo que se suele emplear para la determinación del grupo acilo (Jackman y Smith, 1996).

Actualmente para la identificación rápida y precisa de los antocianos es habitual recurrir a la combinación de técnicas cromatográficas (habitualmente HPLC) y espectroscópicas, normalmente espectrofotometría ultravioleta/visible, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas y, menos frecuentemente, espectrometría infrarroja, resonancia Raman o dicroísmo circular. Aunque la resonancia magnética nuclear mono- (1D) y bidimensional (2D) permita, por sí misma, la caracterización estructural completa de antocianos (Giusti *et al.*, 1998a), en general requiere cantidades relativamente grandes de material purificado para la correcta resolución. Por eso, cuando la cantidad de material disponible es pequeña, suele recurrirse a la espectrometría de masas, sola o en combinación con otras técnicas espectroscópicas, aunque generalmente resultan insuficientes para la caracterización total de la estructura (Strack y Wray, 1989).

3.6 – ANÁLISIS POR HPLC

El método cromatográfico que se ha vuelto de utilización habitual para el análisis de antocianos es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), especialmente desde la introducción de los sistemas de detección por fotodiodos (DAD). La HPLC-DAD es usada en aplicaciones analíticas y (semi)preparativas y posee la ventaja de permitir simultáneamente la separación, identificación y cuantificación de los antocianos, sin exigir una pureza excesiva de los extractos. Las fases estacionarias más comúnmente utilizadas para la separación de antocianos en HPLC son las fases reversas, especialmente los soportes de gel de sílice unidos a restos C-18. Los factores que afectan a la separación de los antocianos en este tipo de columnas están bien documentados (Hebrero *et al.*, 1988; Hong y Wrolstad, 1990a y 1990b; Strack y Wray, 1989); los más importantes se resumen a continuación:

(i) *Patrón de sustitución de la antocianidina en el anillo B.* Las antocianidinas más comunes eluyen en función del tipo de sustitución que presentan en el anillo B y en el siguiente orden: delfinidina < cianidina < petunidina < pelargonidina < peonidina < malvidina; los grupos hidroxilo aumentan la movilidad del compuesto, mientras que los metoxilo la disminuyen. Los pares cianidina/petunidina y peonidina/malvidina suelen ser los más críticos en cuanto a su resolución.

(ii) *Naturaleza, posición y número de azúcares unidos a las antocianidinas.* En general, la movilidad aumenta al hacerlo el número de azúcares existentes en la estructura del antociano. Dentro de los patrones de glicosilación más habituales, el

orden que se observa suele ser el siguiente: 3,7-diglicósidos < 3,5-diglicósidos < 3-glicósidos. La naturaleza del azúcar también afecta de manera determinante la movilidad del pigmento; así, por ejemplo, los 3-galactósidos eluyen antes que los 3-glucósidos y éstos, antes de los 3-rutinósidos.

(iii) *Acilación de los azúcares.* La existencia de restos acilo, ya sean ácidos fenólicos (hidroxicinámicos o hidroxibenzoicos) o ácidos alifáticos, aumenta el tiempo de retención. La polaridad de dichos ácidos determina el orden de elución; por ejemplo, un compuesto acilado con ácido cafeico eluye antes que el correspondiente acilado con ácido cumárico, y un conjugado con ácido málico lo hace antes que el que lo está con ácido malónico. Esta regla no es estricta, ya que la posición de unión del ácido al azúcar, su conformación y la posible existencia de copigmentación intramolecular influyen también sobre el tiempo de retención.

Cuando la HPLC se encuentra acoplada a un sistema de detección por fotodiodos, el eluato es escrutado cada pocos milisegundos, generando datos espectrales ultravioleta/visible, lo que permite tanto obtener el espectro de absorción de los compuestos detectados como registrar los cromatogramas a diferentes longitudes de onda. La información obtenida puede ser utilizada con fines cualitativos, para la identificación de compuestos de acuerdo a sus características de elución y espectro UV-visible, y también cuantitativos a partir de la integración de las áreas de los picos registrados a una determinada longitud de onda; adicionalmente, se puede analizar la pureza de cada pico. A valores de pH ácido, como el que habitualmente poseen los eluyentes utilizados para la separación de antocianos, éstos y sus antocianidinas presentan máximos de absorción característicos en la zona del ultravioleta (en torno a 270-280 nm) y del visible (entre 465 y 560 nm) (Markham, 1982; Jackman y Smith, 1996). La absorbancia en el visible es debida a la estructura del heterociclo central, a la conjugación de los dos ciclos bencénicos, y está influida por el pH y el medio disolvente. El número y tipo de sustituyentes que lleve el anillo B también van a influir sobre dicha absorbancia:

- los antocianos con menor número de sustituyentes en el anillo B tienen el máximo de absorción a menor longitud de onda. La pelargonidina, al poseer un solo sustituyente, es la que presenta un máximo de absorción más bajo. Delfinidina, petunidina y malvidina, con tres sustituyentes, tienen el máximo de absorción a longitud de onda superior. Estas diferencias se observan tanto para los aglucones como para sus correspondientes glicósidos;

- a medida que aumenta el número de grupos hidroxilo sobre el anillo B, el máximo de absorción en el visible se desplaza hacia longitudes de onda mayores y el color sufre un desplazamiento batocrómico (hacia tonalidades más azuladas);
- la presencia de grupos metoxilo en el anillo B confiere mayor estabilidad a la molécula y origina un desplazamiento del máximo del visible hacia longitudes de onda más bajas (desplazamiento hipsocrómico), trasladando el color hacia la zona del rojo.

La glicosilación también afecta a la absorbancia en el visible, originando un desplazamiento del máximo de absorción del orden de 10 nm hacia longitudes de onda más bajas con respecto al aglicón correspondiente. La glicosilación disminuye, asimismo, el coeficiente de absorción molecular. De esta manera, los antocianos diglucósidos tienen sus máximos de absorción desplazados hacia longitudes de onda menores que los correspondientes monoglucósidos. Si existe acilación con ácidos hidroxicinámicos aparece un hombro o máximo adicional a 310-330 nm en el espectro de absorción del antociano característico del resto acilante. Así, la esterificación con los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico produce aumentos de la absorción en torno a 310 nm, 330 nm y 326 nm, respectivamente. Normalmente, la naturaleza del azúcar y la acilación con ácidos alifáticos no suele tener consecuencias cualitativas importantes sobre el espectro de absorción de los antocianos (Markham, 1982; Hong y Wrolstad, 1990b).

Harborne (1958), demostró que si un antociano carece de sustitución en el grupo hidroxilo en posición 5, se produce un aumento de la absorbancia en torno a los 440 nm, dando lugar a la aparición de un hombro en esa zona del espectro, lo que es característico, por ejemplo, de los antocianos monoglucósidos y no existe en los diglucósidos. La pelargonidina es una excepción, ya que tanto el aglicón como sus derivados mono- y diglucósido poseen siempre un hombro aproximadamente a esa longitud de onda. También el disolvente empleado afecta los coeficientes de absorción y puede producir un desplazamiento en la posición y la intensidad de una banda de absorción. Los antocianos no acilados experimentan un mayor efecto del disolvente en sus características espectrales (Giusti *et al.*, 1999b). Los cambios en el patrón de sustitución del anillo A tienden a reflejarse en la banda de absorción del ultravioleta. Esta zona del espectro no se ve afectada por el pH de la muestra, ni por la glicosilación.

Más recientemente se han introducido los equipos de HPLC acoplados a detectores de espectrometría de masas (HPLC-MS), que, empleando cantidades de muestra ($\geq 5 \mu\text{L}$) y flujos ($\geq 200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) mínimos, permiten obtener excelentes resultados en la identificación de moléculas complejas, al facilitar sus iones moleculares y/o de los fragmentos que se originan en su ruptura. La técnica de ionización más utilizada en los equipos de HPLC-MS es la de electrospray (ESI-MS), que produce una ionización suave, dando lugar a iones intactos a partir de moléculas grandes y complejas, incluyendo compuestos polares, termolábiles y no volátiles. El único pre-requisito para esta forma de ionización es que los analitos sean solubles en algún disolvente. El análisis de masas-masas (MS-MS o MS²) conduce a la formación de fragmentos resultantes de la disociación de los principales iones detectados, inducida por colisión de baja energía. La energía interna del ion a fragmentar está determinada por la aportada en el proceso inicial de ionización y la ganada en la colisión, siendo la reproducibilidad del proceso de fragmentación dependiente de las condiciones experimentales; cuando éstas están controladas, las diferencias entre espectros MS-MS son indicativas de diferencias en las estructuras de los iones fragmentados (Giusti *et al.*, 1999a).

En los últimos años han aparecido diversos estudios sobre fragmentación de los antocianos en espectrometría de masas, observando que se produce de acuerdo a patrones que se repiten, lo que resulta útil a la hora de identificar el compuesto original. El aglucón antociánico es muy estable y no posee ningún enlace en el que la ruptura se pueda realizar fácilmente, por eso cuando se opera en modo positivo, su espectro presenta un catión intenso y muy poca fragmentación. Los antocianos, por su parte, sufren la ruptura de los enlaces glicosídicos entre el anillo del ion flavilio y los azúcares directamente unidos a él. Hay transferencia de un átomo de hidrógeno desde un grupo -OH del azúcar hasta los iones formados, y en función de que la sustancia sea monoglucósido, diglucósido o biósido, el número y tipo de fragmentos formados serán diferentes (Alcalde-Eon, 2002). En caso de antocianos acilados, no se produce la ruptura de los enlaces tipo éster y se pierde conjuntamente el azúcar y el ácido (Giusti *et al.*, 1999a).

Además de rápida y efectiva, la técnica de ESI-MS no requiere más que una preparación mínima de la muestra, permitiendo el análisis de compuestos polares presentes en soluciones acuosas sin necesidad de derivatización, lo que la vuelve apropiada para el análisis conjunto y en línea con la cromatografía líquida. La combinación de la información obtenida a partir de las características de retención de

los compuestos en HPLC, sus espectros UV-vis facilitados por el detector de fotodiodos y los espectros de masas y de fragmentación, constituye una herramienta poderosísima en la identificación y caracterización antociánica (Giusti *et al.*, 1999a; Flamini, 2003).

4 – FLAVAN-3-OLES

4.1 – DESCRIPCIÓN, ESTRUCTURA Y NOMENCLATURA

Los flavan-3-oles son compuestos fenólicos de la clase de los flavonoides, en cuyo esqueleto básico característico los dos ciclos bencénicos están unidos por un elemento heterocíclico no aromático hidroxilado en su posición 3 (figura I.7) y que difieren entre ellos en el grado de hidroxilación de los distintos anillos y en la estereoquímica de los carbonos asimétricos del heterociclo: C2 y C3 y en los compuestos condensados también C4. En la naturaleza se pueden encontrar como monómeros o condensados entre sí, formando compuestos con grado de polimerización diverso. Pueden poseer restos acilo, siendo el ácido gálico el sustituyente más frecuente. Al contrario de lo que ocurre con otros flavonoides son menos habituales las combinaciones de tipo heterosídico (Haslam, 1982; Haslam, 1989).

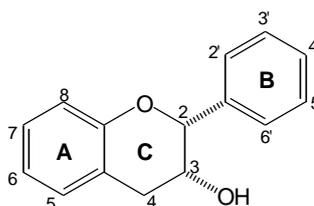


Figura I.7 – Estructura general de un flavan-3-ol.

La tabla I.3 presenta una lista de los principales flavan-3-ol monómeros encontrados en la Naturaleza, entre ellos los más comunes son los pares diastereoisoméricos (+)-catequina / (-)-epicatequina y (+)-galocatequina / (-)-epigalocatequina (Haslam, 1989).

Tabla I.3 – Flavan-3-oles monómeros más comunmente encontrados en la Naturaleza (Haslam, 1989).

Nombre trivial	Patrón de hidroxilación*	Configuración absoluta
(+)-Afzelequina	5, 7, 4'	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>
(-)-Epiafzelequina	5, 7, 4'	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>
(+)-Epiafzelequina	5, 7, 4'	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>
(-)-Fisetinidol	7, 3', 4'	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>
(-)-Robinetinidol	7, 3', 4', 5'	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>
(+)-Catequina	5, 7, 3', 4'	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>
(-)-Epicatequina	5, 7, 3', 4'	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>
(+)-Epicatequina	5, 7, 3', 4'	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>
(+)-Galocatequina	5, 7, 3', 4', 5'	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>
(-)-Epigalocatequina	5, 7, 3', 4', 5'	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>

* Ver figura I.7 para la numeración de flavanoles.

Entre los flavan-3-oles encontrados en vegetales se distinguen tres tipos principales, según el grado de hidroxilación del anillo B. Al poseer en su estructura – como todas las catequinas - dos carbonos asimétricos (C2 y C3), es posible la existencia de cuatro isómeros ópticos para cada uno de estos compuestos, cuyas configuraciones se presentan en la figura I.8.

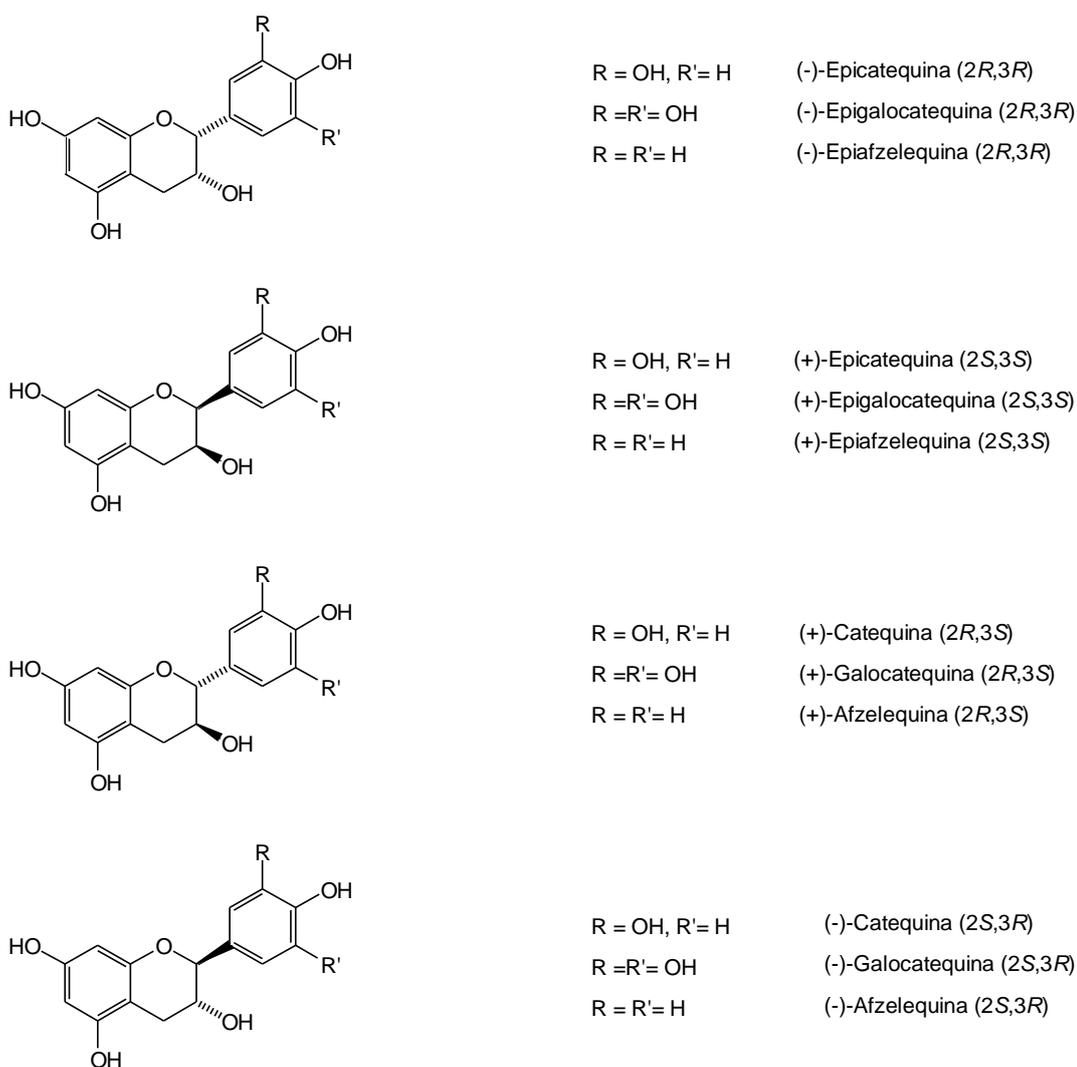
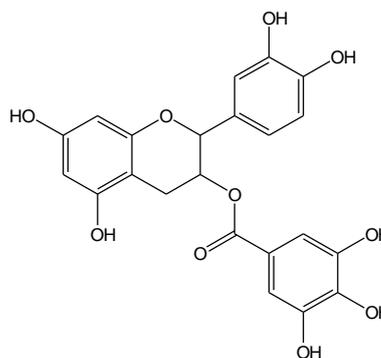


Figura I.8 – Estructuras de los tres tipos principales de flavan-3-ol monómeros.

Los flavan-3-oles se pueden encontrar en la Naturaleza como tales, o, menos habitualmente, en forma de derivados metilados, glicosilados o como ésteres de flavan-3-ol, de los cuales se da un ejemplo en la figura I.9, donde se muestra un éster gálico de epicatequina, en que el ácido está fijado al hidróxilo en posición 3 del heterociclo y que es relativamente frecuente.

Figura 1.9 – Estructura correspondiente a (-)-epicatequina-3-O-galato.



Cuando condensan entre sí, a través de enlaces C-C y, ocasionalmente, C-O-C, los flavan-3-oles dan lugar a los taninos condensados (figura 1.10). Éstos, tienen la capacidad de transformarse en antocianidinas por calentamiento en medio ácido mineral, por lo que se denominan también proantocianidinas condensadas, entre las cuales se distinguen procianidinas, prodelfinidinas, propelargonidinas, etc., según den lugar en su hidrólisis a cianidina, delfinidina, pelargonidina, etc., respectivamente (tabla 1.4). En los compuestos condensados los tres carbonos del heterociclo flavánico (C2, C3 y C4) son asimétricos, por lo que pueden existir numerosas combinaciones de sustancias con diferentes configuraciones. No obstante, el enlace interflavánico en C4 adopta siempre la configuración *trans* con respecto al grupo hidroxilo en C3.

Inicialmente las proantocianidinas eran designadas por un sistema alfanumérico que utilizaba las letras A, B y C según el tipo de enlace interflavanol y grado de condensación (Weinges *et al.*, 1968; Thompson *et al.*, 1972). Por su amplia aceptación, esta denominación trivial continúa empleándose, aunque el sistema de nomenclatura más usado actualmente para proantocianidinas es el propuesto por Hemingway (1989) y que se resume básicamente a continuación (Haslam, 1989; Porter, 1994):

1. Se asume la numeración del esqueleto usada para los flavonoides en general que aparece en la figura 1.7.
2. Las unidades flavanol básicas se designan por sus nombres comunes, que se presentan parcialmente en la tabla 1.4. Cuando tienen configuración *2R*, *3R* se antepone el prefijo “epi” al nombre del flavanol. Si las unidades tienen configuración *2S*, se distinguen por el prefijo “ent”. La ausencia de prefijo indica la existencia de configuración *2R*, *3S* en la unidad.
3. En las proantocianidinas condensadas el enlace interflavánico se indica de la misma forma que se hace para los polisacáridos, es decir, se incluyen los números de los átomos que intervienen en el enlace y su dirección entre

parentesis (4→). La configuración del enlace interflavánico se indica utilizando la nomenclatura $\alpha\beta$ IUPAC (1979) dentro del paréntesis anterior.

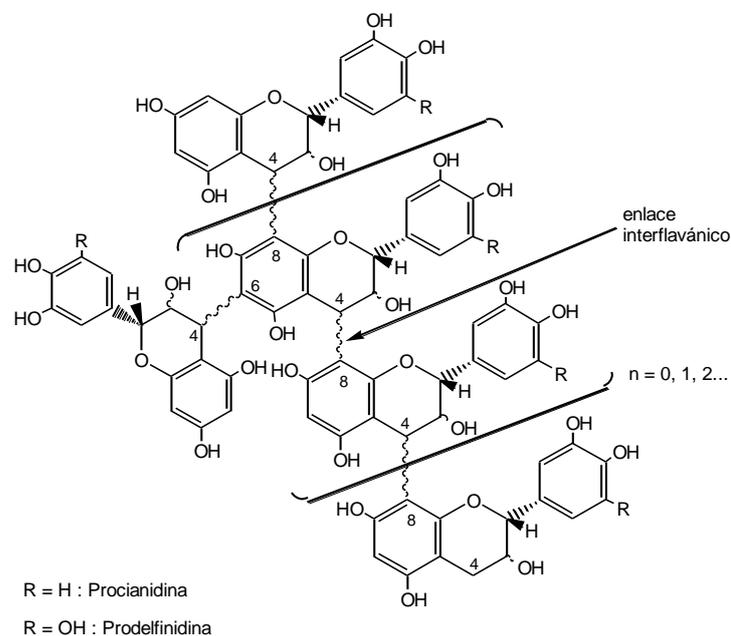


Figura I.10 – Estructura básica de las proantocianidinas condensadas.

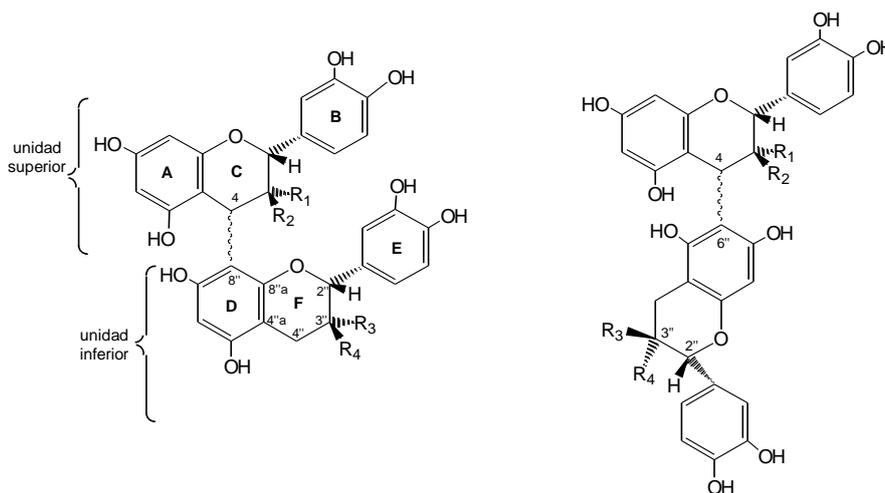
Tabla I.4 – Tipos de proantocianidinas y nombres de las unidades básicas constituyentes (Porter, 1994).

Clase de Proantocianidina	Unidad monomérica	Patrón de sustitución*						
		3	5	7	8	3'	4'	5'
Prodistenidina	Distenidina	OH	OH	OH	H	H	H	H
Propelargonidina	Afzelequina	OH	OH	OH	H	H	OH	H
Procianidina	Catequina	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
Prodelfinidina	Galocatequina	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH
Proguiburtinidina	Guiburtinidina	OH	H	OH	H	H	OH	H
Profisetinidina	Fisetinidina	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Prorobinetinidina	Robinetinidina	OH	H	OH	H	OH	OH	OH
Proteracacínidina	Oritina	OH	H	OH	OH	H	OH	H
Promelacacínidina	Mesquitol	OH	H	OH	OH	OH	OH	H

* La numeración se basa en la indicada en la figura I.7.

Las proantocianidinas más comunes en alimentos son las procianidinas (con sustitución 3',4'-dihidroxil en el anillo B), donde se encuentran solas o en mezclas con prodelfinidinas (3',4',5'-trihidroxil). Las propelargonidinas (4'-hidroxil) son relativamente

raras en alimentos. Todos estos grupos de proantocianidinas pueden subdividirse, a su vez, según el grado de polimerización que presenten, en oligómeros (dímeros, trímeros y tetrameros) y polímeros (con grado de polimerización igual o superior a 5). Los enlaces interflavánicos más comunes son los enlaces C-C establecidos entre el C4 de una unidad de flavanol y el C8 o C6 de otra unidad (unidad inferior). Las proantocianidinas que presentan este tipo de enlace corresponden a los compuestos inicialmente designados de tipo B (diméricas) y tipo C (triméricas) (figuras I.11 y I.12).



Procianidinas del tipo B

B₁: R₁=OH; R₂=H; R₃=H; R₄=OH
B₂: R₁=OH; R₂=H; R₃=OH; R₄=H
B₃: R₁=H; R₂=OH; R₃=H; R₄=OH
B₄: R₁=H; R₂=OH; R₃=OH; R₄=H

B₅: R₁=OH; R₂=H; R₃=OH; R₄=H
B₆: R₁=H; R₂=OH; R₃=H; R₄=OH
B₇: R₁=OH; R₂=H; R₃=H; R₄=OH
B₈: R₁=H; R₂=OH; R₃=OH; R₄=H

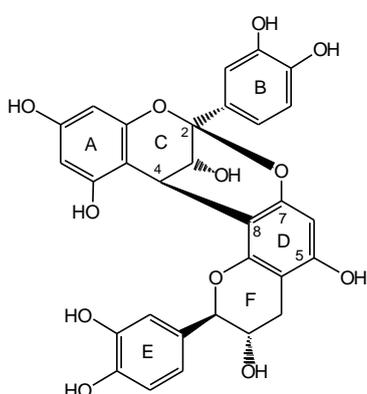
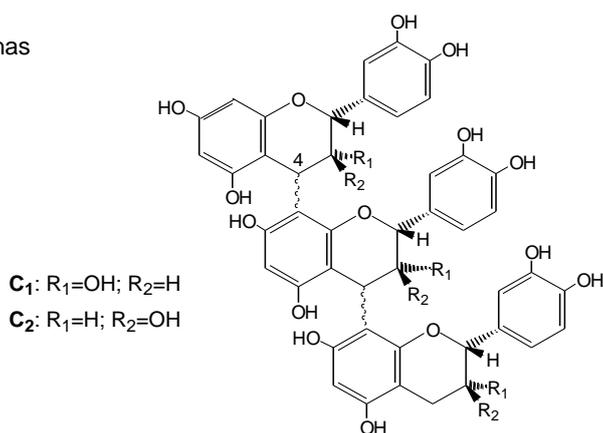
Nomenclatura

B₁: 2,3-*cis*-3,4-*trans*-2'',3''-*trans* [2*R*,3*R*,4*R*,2''*R*,3''*S*] epicatequina-(4β → 8) -catequina
B₂: 2,3-*cis*-3,4-*trans*-2'',3''-*cis* [2*R*,3*R*,4*R*,2''*R*,3''*R*] epicatequina-(4β → 8) -epicatequina
B₃: 2,3-*trans*-3,4-*trans*-2'',3''-*trans* [2*R*,3*S*,4*S*,2''*R*,3''*S*] catequina-(4α → 8) -catequina
B₄: 2,3-*trans*-3,4-*trans*-2'',3''-*cis* [2*R*,3*S*,4*S*,2''*R*,3''*R*] catequina-(4α → 8) -epicatequina
B₅: 2,3-*cis*-3,4-*trans*-2'',3''-*cis* [2*R*,3*R*,4*R*,2''*R*,3''*R*] epicatequina-(4β → 6) -epicatequina
B₆: 2,3-*trans*-3,4-*trans*-2'',3''-*trans* [2*R*,3*S*,4*S*,2''*R*,3''*S*] catequina-(4α → 6) -catequina
B₇: 2,3-*cis*-3,4-*trans*-2'',3''-*trans* [2*R*,3*R*,4*R*,2''*R*,3''*S*] epicatequina-(4β → 6) -catequina
B₈: 2,3-*trans*-3,4-*trans*-2'',3''-*cis* [2*R*,3*S*,4*S*,2''*R*,3''*R*] catequina-(4α → 6) -epicatequina

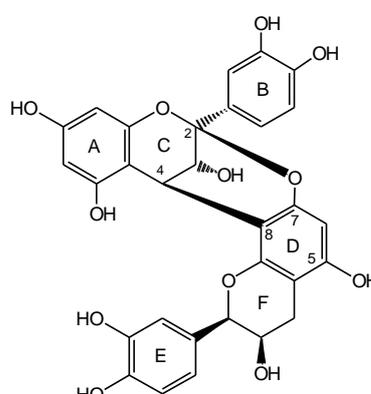
Figura I.11 – Estructuras y nomenclatura de procianidinas dimeras de tipo B.

Como proantocianidinas de tipo A se denomina a los dímeros que poseen sus unidades básicas ligadas por una doble unión interflavánica entre las mismas. Además del enlace C4-C8 o C4-C6, existe un enlace adicional de tipo éter entre el C2 de la unidad superior y el C7 o C5 de la unidad inferior (figura I.13). Las procianidinas de tipo D son trímeros con un enlace interflavánico de tipo B y un otro enlace de tipo A.

Figura I.12 – Estructuras de algunas procianidinas trómeras de tipo C.



A₁: epicatequina-(2 β → 7, 4 β → 8)-catequina



A₂: epicatequina-(2 β → 7, 4 β → 8)-epicatequina

Figura I.13 – Estructuras de proantocianidinas dómeras de tipo A.

4.2 – REACTIVIDAD Y PROPIEDADES

4.2.1 - HIDRÓLISIS

La reacción más característica de las proantocianidinas es la ruptura en medio ácido de los enlaces interflavánicos, para dar lugar, por una parte, a las subunidades inferiores en su forma libre y, por otra, a los carbocationes correspondientes a las unidades de extensión, los cuales pueden reaccionar con sustancias nucleofílicas existentes en el medio de reacción o bien, oxidarse, produciendo los antocianos correspondientes (figura I.14). Esta conversión parcial en antocianos en medios fuertemente ácidos es lo que les da el nombre de proantocianidinas.

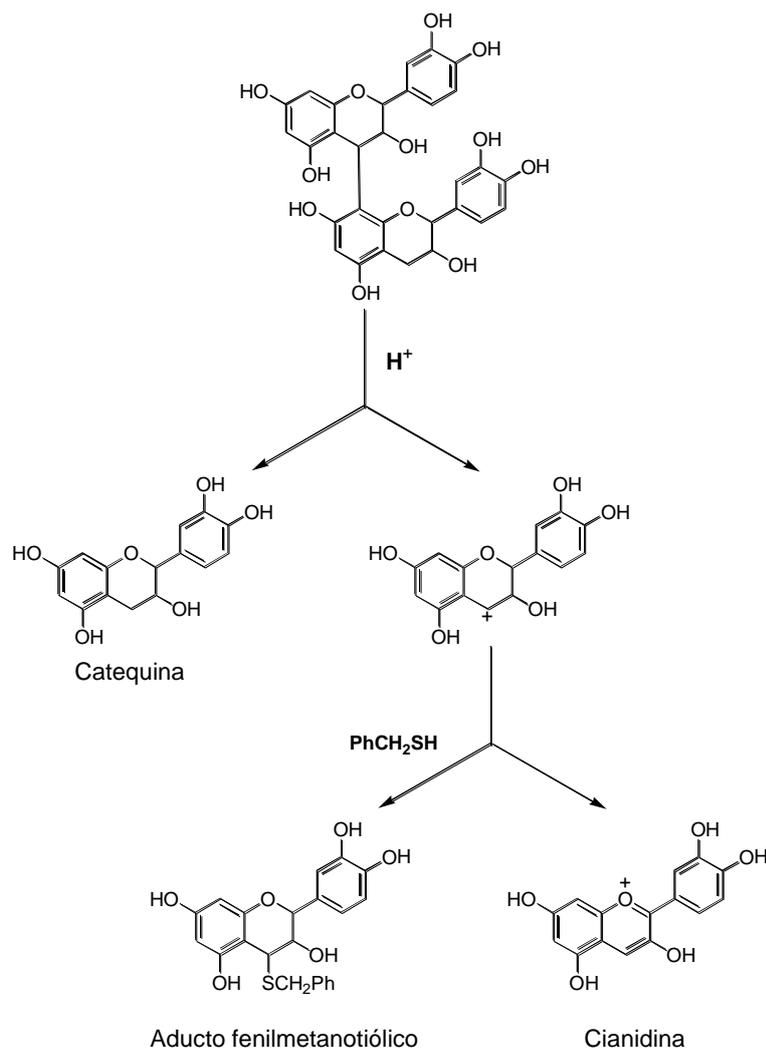


Figura I.14 - Hidrólisis ácida de una proantocianidina (Haslam, 1989).

4.2.2.- REACCIONES CON ALDEHÍDOS

Los flavanoles en medio ácido pueden fácilmente experimentar reacciones de sustitución electrofílica con aldehídos sobre las posiciones 6 y 8 de su anillo floroglucinol, por tener estas posiciones fuerte carácter electronegativo. Cuando este tipo de reacción tiene lugar con formaldehído se forman productos polímeros insolubles en medio acuoso (Hillis y Urbach, 1959), mientras que cuando la reacción tiene lugar con aldehídos aromáticos los productos de la reacción son solubles y coloreados, característica que ha sido aprovechada para el análisis espectrofotométrico de flavanoles.

Una reacción de especial interés es la que tiene lugar entre flavanoles y acetaldehído, debido a su influencia en los algunos de los cambios organolépticos que

se producen en productos de origen vegetal. El mecanismo de reacción requiere la protonación previa del acetaldehído, que se une al flavanol y, por pérdida de una molécula de agua, origina un nuevo catión capaz de reaccionar con otro núcleo floroglucinol, dando lugar a un producto de condensación a través de un puente etilo (figura I.15). Esta reacción provoca la formación de dímeros flavanol-etil-flavanol unidos a través de las posiciones C8 o C6, que pueden continuar el proceso de polimerización por las posiciones reactivas aún no ocupadas. De esta forma, se producen complejos cada vez más grandes que acaban por precipitar (Saucier *et al.*, 1997a). Este tipo de reacción también tiene lugar con antocianos generando productos de tipo flavanol-etil-antociano (Rivas-Gonzalo *et al.*, 1995).

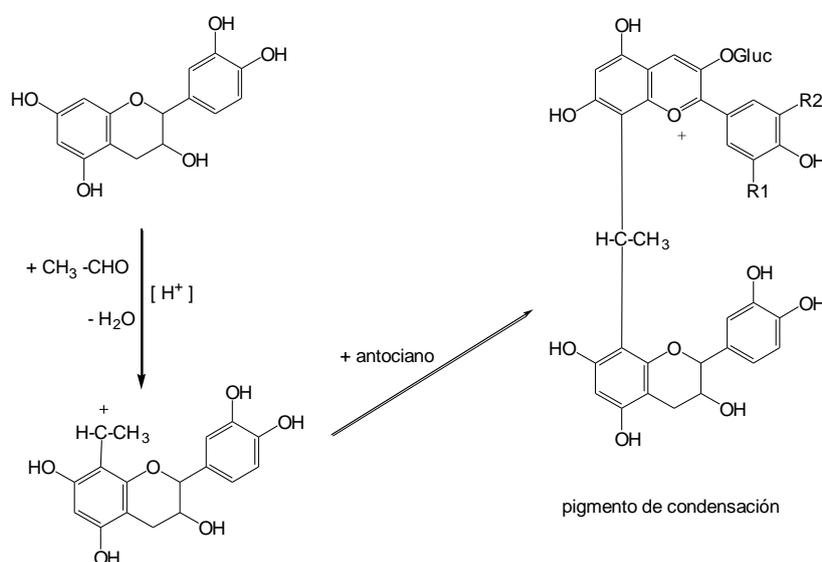


Figura I.15 - Condensación entre antocianos y flavanoles mediada por acetaldehído (Timberlake y Bridle, 1976).

4.2.3 - INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS

La afinidad por proteínas es una característica de los taninos responsable del carácter astringente de algunas frutas y productos derivados. Una parte de los efectos fisiológicos que se han atribuido a los taninos condensados de la dieta, ya sean beneficiosos o nocivos, están también muy relacionados con su capacidad para unirse a proteínas.

Las interacciones proteína-tanino han sido estudiadas en profundidad y revisadas por Haslam, quien resumió sus características generales en los siguientes aspectos (Haslam, 1996):

(i) La interacción tanino-proteína es fundamentalmente un fenómeno de superficie, que es máximo en o cerca del punto isoeléctrico de la proteína. A no ser que se produzcan reacciones secundarias de tipo químico/bioquímico estas interacciones son generalmente de carácter reversible.

(ii) La flexibilidad conformacional, tanto en los polifenoles como en las proteínas, es un factor importante que conduce a interacciones más fuertes. Las proteínas de pequeño tamaño y con estructuras secundaria y terciaria rígidas tienen poca afinidad por los polifenoles. Por el contrario, las proteínas ricas en prolina (como la gelatina o las proteínas salivares), que poseen una estructura más abierta, tienen gran afinidad por las sustancias polifenólicas.

(iii) Los polifenoles actúan como ligandos multidentados en la superficie de la proteína gracias a sus anillos aromáticos y a los grupos fenólicos. Por ello es importante el tamaño molecular de los polifenoles.

(iv) Las principales fuerzas que rigen estas asociaciones son de tipo hidrofóbico y están favorecidas por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos fenólicos y ciertos puntos de las proteínas, en particular, los grupos carbonilo.

La asociación tanino-proteína fue representada por Spencer *et al.* (1988) mediante un modelo en el cual las concentraciones relativas de ambos sustratos influyen en el tipo de interacción que se establece. Cuando existen concentraciones bajas de proteínas los polifenoles se asocian a la superficie de éstas formando una estructura monolaminar, menos hidrofílica que la proteína por sí sola y, por tanto, se produce la agregación y precipitación [figura I.16(a)]. Cuando la concentración de proteínas es alta, esa capa relativamente hidrofóbica se forma por unión de los polifenoles a las proteínas y por enlaces cruzados entre distintas proteínas a través de los polifenoles [figura I.16(b)], produciéndose también en este caso la precipitación. Esto explicaría que se requiera una mayor cantidad relativa de polifenoles para producir la precipitación en disoluciones diluidas de proteínas.

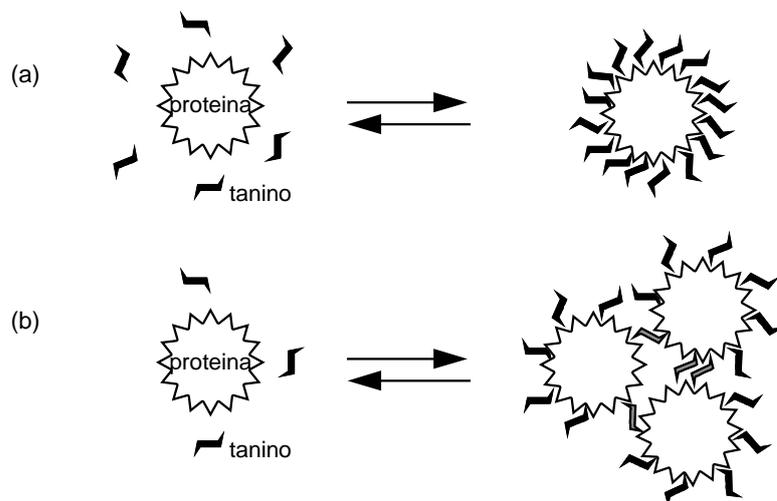


Figura I.16 - Esquema de la interacción tanino-proteína para concentraciones de proteína relativamente bajas (a) y altas (b) (Spencer *et al.*, 1988).

4.2.4 - ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CAPTADORA DE RADICALES LIBRES

Algunas especies derivadas del oxígeno, como los radicales superóxido e hidroxilo, juegan un papel muy importante en los deterioros oxidativos, ya sean fisiológicos o patológicos, que se producen en los organismos vivos y también influyen en la calidad y conservación de algunos alimentos. Se sabe, por ensayos *in vitro*, que los flavanoles y particularmente las catequinas y procianidinas tienen actividad antioxidante, que parece estar relacionada con su capacidad auto-oxidante y para actuar como captadores de radicales oxigenados activos y/o agentes quelantes (Santos-Buelga y Scalbert, 2000). La presencia de grupos hidroxilo en el anillo B parece ser esencial para que exista actividad captadora de radicales libres y, además, la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 3 del heterociclo aumenta esta actividad (Sichel *et al.*, 1991). Por otra parte, la presencia de varios grupos hidroxilos en el anillo B es también determinante para el efecto quelante y la capacidad de auto-oxidarse de los polifenoles (Singleton, 1987).

En los últimos años se ha publicado un gran número de trabajos que relacionan los efectos antioxidante y captador de radicales libres con la posible actividad protectora de las proantocianidinas, presentes en plantas medicinales y en la dieta, frente a algunas enfermedades y, en particular, las de tipo cardiovascular (Haslam, 1996). Estos trabajos se iniciaron fundamentalmente a raíz de la constatación epidemiológica realizada por St. Leger *et al.* (1979) de la existencia de una correlación negativa entre

el consumo de vino tinto y la incidencia de enfermedades cardiovasculares, que posteriormente fue relacionada con el contenido de flavanoles en el mismo (Masquelier *et al.*, 1988) y conocida con el nombre de “paradoja francesa” (Renaud y de Lorgeril, 1992). En diversos estudios modelo se ha comprobado que las catequinas y procianidinas tienen un efecto inhibitor de la oxidación de lípidos y los daños asociados a la misma, lo que ha llevado a pensar que podrían tener una actividad protectora frente a la oxidación del LDL y por lo tanto un efecto antiaterogénico (Teissedre *et al.*, 1996, Frankel *et al.*, 1993; Kinsella *et al.*, 1993; Tebib *et al.*, 1994).

4.2.5.- COMPLEJACIÓN DE IONES METÁLICOS

Los flavanoles que poseen grupos *O*-dihidroxifenol en su estructura (p.ej., catequinas y procianidinas) actúan como agentes quelantes de metales como el hierro, manganeso, vanadio, cobre o cobalto. La naturaleza de compuestos formados por varias unidades de catecol de las proantocianidinas condensadas las hace más apropiadas para este tipo de complejaciones que otros fenoles de menor tamaño, estando así favorecida la reticulación y formación de precipitados de los taninos unidos a los iones metálicos (Scalbert, 1991). La importancia de algunos de estos metales en numerosos procesos biológicos, especialmente como cofactores en diversos sistemas enzimáticos, hace suponer que su interacción con los polifenoles podría influir en la actividad asociada a dichos sistemas enzimáticos (Haslam, 1996). Por otra parte, se ha indicado que los taninos de la dieta pueden reducir la biodisponibilidad de algunos metales al inhibir su absorción gastrointestinal (Siegenberg *et al.*, 1991).

4.3 – ANÁLISIS

4.3.1 - EXTRACCIÓN

La extractabilidad de los flavanoles no depende únicamente de su estructura química, sino que está también influida por factores intrínsecos a la propia muestra, las condiciones de secado, almacenamiento y el método utilizado para la extracción. Por ello, no existe un único protocolo de extracción que pueda ser considerado óptimo para todos los tipos de muestra, lo que ha llevado a emplear diferentes disolventes, entre los cuales los más comúnmente utilizados son: metanol, acetona, etanol, acetato de etilo y agua.

El metanol es uno de los disolventes más empleados para la extracción de proantocianidinas a partir de tejidos vegetales. Para su purificación, el extracto metanólico puede ser concentrado y redisolto en agua, que se lava con un disolvente apolar para eliminar sustancias liposolubles (como lipoides y clorofilas); finalmente las proantocianidinas pueden ser extraídas con acetato de etilo (Foo y Karchesy, 1989; Haslam, 1980; de Pascual-Teresa *et al.*, 1998). Otros disolventes comúnmente utilizados son la acetona (Broadhurst y Jones, 1978; Jerumanis, 1985; Kashiwada *et al.*, 1990) y el etanol (Alonso *et al.*, 1991). Se han hecho estudios comparando distintos medios de extracción con el fin de determinar su eficacia. En semilla de uva se comparó la capacidad para extraer flavan-3-oles de: agua, etanol absoluto, etanol al 75%, acetona, acetona al 70%, metanol, *n*-butanol, dietil éter, acetato de etilo y mezclas de estos dos últimos, concluyendo que el metanol era el mejor disolvente para extraer catequinas, mientras que la acetona al 70% tenía mayor rendimiento para la extracción de procianidinas y polifenoles totales (Kallithraka *et al.*, 1995).

4.3.2 - DETERMINACIÓN

El análisis de flavanoles es difícil debido a la gran cantidad de compuestos que se incluyen en este grupo, con diferente reactividad y extinción molar. Existen distintos tipos de métodos con diferente fundamento y especificidad, aunque en general se considera que ninguno de ellos ofrece resultados realmente fiables. Por otra parte, al estar cada uno de ellos basado en distintas propiedades, dan lugar a resultados normalmente no comparables.

Los flavanoles son ricos en grupos fenólicos, y, en principio, cualquier método de determinación de fenoles podría ser empleado para su determinación. Por ello, se han utilizado y se siguen utilizando, por falta de métodos más específicos, la reacción del azul de Prusia ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) (Price y Butler, 1977; Graham, 1992) y el procedimiento de Folin (Swain y Hillis, 1959), consistente en oxidar los compuestos fenólicos por el reactivo específico, mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, el cual se reduce para dar una mezcla de óxidos de tungsteno y de molibdeno de color azul con máximo de absorción a 750 nm. Este tipo de métodos no son específicos de flavanoles, ya que determinan también taninos hidrolizables, así como otros fenoles o compuestos fácilmente oxidables, como el ácido ascórbico (Hagerman y Butler, 1991).

Para la determinación específica de flavanoles (monómeros y condensados) se han utilizado métodos basados en su reacción con aldehídos, para dar lugar a la formación

de compuestos coloreados; en particular, se han empleado vainillinaldehído (Broadhurst y Jones, 1978; Deshpande *et al.*, 1986) y *p*-dimetilaminocinamaldehído - DMACA - (Treutter, 1989). El principal inconveniente de estas reacciones deriva de la diferente reactividad de los distintos flavanoles, lo cual hace imposible comparar los resultados obtenidos para muestras de distinto perfil flavanólico, especialmente si el grado de polimerización es diferente. Para la determinación de taninos condensados se puede también recurrir a métodos basados en sus reacciones características, como su capacidad para formar antocianidinas al ser tratados en medios ácidos (Bate-Smith, 1977) o la formación de aductos al ser hidrolizados en medio ácido y en presencia de nucleófilos, como floroglucinol o fenilmetanotiol (Matthews *et al.*, 1997). En cualquiera de estos métodos, los resultados se expresan generalmente con respecto a una sustancia de referencia, normalmente catequina, epicatequina, ácido gálico o a una mezcla de taninos, como ácido tánico o taninos de semilla de uva.

Existen también métodos basados en la capacidad de los taninos para precipitar proteínas. La cantidad de taninos en el precipitado puede cuantificarse mediante métodos colorimétricos por reacción con iones férricos o por la reacción del azul de Prusia (Makkar, 1989; Hagerman y Butler, 1991). El principal inconveniente de estos métodos es su falta de especificidad, ya que se trata de una reacción característica de todos los taninos, sean condensados o hidrolizables, y, además, no todos los compuestos presentan la misma afinidad por el ligando utilizado, de manera que la cantidad de complejo formado va a depender de las características de las sustancias implicadas en la reacción, así como de las condiciones en que se realice.

4.3.3 – CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

La introducción de la cromatografía líquida de alta eficacia para el análisis de flavanoles fue realizada por Lea *et al.* (1979) y pronto se extendió su uso, tanto con fines analíticos como preparativos. Las columnas más comúnmente utilizadas son las de fase reversa C18, empleando para la elución gradientes entre disolventes orgánicos y ácidos diluidos (normalmente fórmico o acético), ya que éstos evitan la ionización de los grupos fenólicos y, por lo tanto, mejoran la separación obteniéndose picos más agudos en los cromatogramas (Boukharta *et al.*, 1988; Escribano-Bailón *et al.*, 1992; Ricardo-da-Silva *et al.*, 1991; Treutter, 1989; Vande Castele *et al.*, 1983; Wilson, 1981). El sistema de detección más frecuentemente usado es la espectroscopía en el UV-visible. En este sentido, los detectores de fotodiodos ofrecen

indudables ventajas, ya que permiten establecer la pureza de los picos y diferenciar los flavanoles de otros fenoles presentes en el medio a partir del espectro UV, aunque tienen menor utilidad para la identificación flavanoles particulares por presentar todos ellos espectros similares con máximos de absorción en torno a 270-280 nm.

La poca especificidad de la detección en el UV, unida a la baja concentración en que pueden aparecer las catequinas y proantocianidinas en los extractos, hacen necesaria la existencia de una buena purificación previa, con el fin de evitar posibles interferencias en su análisis. El problema es que la mayoría de los métodos de purificación que se han descrito, ya sea por cromatografía en columna, SPE u otras técnicas, suelen conllevar una pérdida importante de proantocianidinas. Con el fin de evitar el problema de inespecificidad y la necesidad de utilizar un método de purificación previo al análisis, algunos autores han recurrido a diferentes estrategias. Treutter (1989) puso a punto un método de HPLC con derivatización postcolumna con DMACA, que permite la detección específica de flavanoles en extractos crudos, evitando las interferencias con otros fenoles presentes en la muestra. En esta técnica, después de la separación cromatográfica por HPLC, se lleva a cabo una primera detección en el UV a 280 nm, y después de la reacción de derivatización con DMACA hay una segunda detección en el visible a 640 nm. Este autor demostró que, siempre que el método se lleve a cabo en idénticas condiciones, existe una relación entre el cociente de áreas de los picos medidos a 640 y 280 nm y la estructura del flavan-3-ol, lo que unido al tiempo de retención puede servir como criterio de identificación del compuesto. Este método ha sido objeto de adaptaciones posteriores (Treutter *et al.*, 1994; de Pascual-Teresa *et al.*, 1998) y más recientemente se ha optimizado en nuestro laboratorio para su aplicación con fines cuantitativos para la determinación de flavanoles en alimentos (de Pascual-Teresa *et al.*, 2000).

5 – EL COLOR DE LA FRESA Y DE SUS DERIVADOS

5.1 – EL COLOR DE LA FRESA

Los colores de las frutas y hortalizas se deben a tres grandes grupos de compuestos: clorofilas, carotenoides y flavonoides (Britton, 1983). Casi todos los polifenoles muestran una fuerte absorción en la región del ultravioleta, pero los antocianos son el único subgrupo significativo de polifenoles que es visible al ojo humano. Los antocianos aparecen gradualmente en los frutos, flores y otros tejidos vegetales cuando las clorofilas empiezan a decaer (Brouillard *et al.*, 1997). Durante su desarrollo, la fresa experimenta una fase inicial de crecimiento seguida por una fase de maduración; su color, inicialmente verde, evoluciona al madurar hacia un rojo brillante, característico del fruto maduro y debido a la acumulación de antocianos (Montero *et al.*, 1996).

La composición antociánica de la fresa ha sido objeto de varios estudios. En todos ellos, independientemente de la variedad, se encuentra como antociano mayoritario pelargonidina 3-glucósido (Pg 3-gluc), en proporciones que oscilan, generalmente, entre 75% y 98%. Asimismo, en menores cantidades, la presencia de cianidina 3-glucósido (Cy 3-gluc) es constante en todas las variedades y pelargonidina 3-rutinósido (Pg 3-rut) es también comúnmente detectada (Hong y Wrolstad, 1990b; Bakker *et al.*, 1994; Zafrilla, 1999). Con relación a otros antocianos, en las variedades *Sanga sangana* y *El santa*, Goiffon *et al.* (1999) identifican tentativamente pelargonidina 3-arabinósido como tercer pigmento mayoritario, junto a Pg 3-gluc y Cy 3-gluc. Hong y Wrolstad (1990b) detectan dos antocianos minoritarios derivados de pelargonidina, proponiendo que uno de ellos se encuentra acilado con ácido acético, mientras que Bakker *et al.* (1994) identifican por FAB-MS la presencia de los 3-succinilglucósidos de cianidina y pelargonidina. Otro antociano acilado, Pg 3-(6"-malonilglucósido), es también citado por Tamura *et al.* (1995) en la variedad japonesa *Nyoho*. De manera general, el Pg 3-gluc, como antociano ampliamente mayoritario, es el pigmento que más contribuye al color de la fresa y de sus derivados, mientras que las diferencias entre cultivares se basan en las expresiones cuantitativas y en el perfil de los pigmentos minoritarios.

El perfil antociánico de los zumos y de las confituras de frutas rojas coincide con el característico de la especie a partir de la cual son elaborados; así, el análisis de

antocianos por HPLC es indicado para establecer el origen frutal de un producto y detectar la adición o sustitución de frutas en la elaboración de zumos, confituras o mermeladas (Zafrilla, 1999; García-Viguera *et al.*, 1997). El perfil antociánico también ha sido propuesto como indicador de condiciones inadecuadas de procesado; de acuerdo con Delgado-Vargas *et al.* (2000) niveles elevados de color polimérico con relación a los antocianos monómeros clasifican un producto como de baja calidad e indican un mal procesado.

5.2 – EL COLOR EN LOS PRODUCTOS PROCESADOS DE LA FRESA

5.2.1 – INFLUENCIA DE LA MATERIA PRIMA Y DE LOS PROCESOS DE RECOLECCIÓN Y *POST* RECOLECCIÓN

La fresa es uno de los frutos más perecederos. Es susceptible a daños mecánicos, al deterioro fisiológico y a la podredumbre por la acción de hongos, casi siempre putrefacción de color gris por *Botrytis cinerea* (Castro *et al.*, 2002; Schouten *et al.*, 2002; Rwabahizi y Wrolstad, 1988; Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

La calidad básica del fruto depende de la interacción de muchos factores, incluyendo clima, suelo, control de patógenos, momento de recolección, calidad de recolección (por ejemplo integridad del fruto, presencia de tallo, corte) y tratamientos pre-almacenamiento. Con relación a los factores pre-recolección, al parecer, la mayor parte de los parámetros de calidad son dependientes de la genética, por eso la selección genética es importante cuando se requieren características específicas (Castro *et al.*, 2002).

Respecto a la calidad *post*-recolección de la fresa, la disminución de la temperatura de refrigeración limita el deterioro del fruto al reducir la actividad metabólica, pero no suprime la misma, por lo que el producto continúa experimentando transformaciones que conducen a la senescencia, con alteraciones irreversibles. Las heridas causadas por los cortes estimulan la actividad respiratoria y la producción de etileno, lo que induce la biosíntesis de enzimas asociadas con un aumento de la velocidad de las reacciones bioquímicas responsables del cambio de color, aroma, textura y valor nutritivo, propias de la maduración y la senescencia. Además, los cortes de los tejidos provocan también la descompartimentación celular, lo que permite la entrada en contacto de enzimas de localización citoplasmática con sustratos de

localización vacuolar. Una de las modificaciones más indeseables a que lleva este proceso es el pardeamiento enzimático, que consiste, básicamente, en la oxidación de sustratos fenólicos a O-quinonas, muy reactivas y que condensan rápidamente, combinándose con grupos amino o sulfhidrilo de las proteínas y con azúcares reductores, dando lugar a polímeros pardos, rojizos o negros, de elevada masa molecular. La formación de O-quinonas es una reacción reversible en presencia de agentes reductores como el ácido ascórbico, mientras que la polimerización posterior es irreversible (Artés *et al.*, 1998).

Las enzimas fúngicas parecen ejercer también un papel determinante en la degradación de pigmentos y en las reacciones de polimerización y pardeamiento (Rwabahizi y Wrolstad, 1988; Delgado-Vargas *et al.*, 2000), por lo que otro factor importante para preservar el color durante el almacenamiento del fruto fresco es la eliminación de la contaminación por hongos, cuyos efectos deletéreos sobre la calidad del color son especialmente evidentes en zumos y concentrados de fresa. Para maximizar la retención de pigmentos, Wrolstad *et al.* (1990) recomiendan minimizar la contaminación de la fresa por hongos, la inactivación enzimática y la congelación rápida.

Por su parte, como aspectos más relevantes para obtener y mantener una buena calidad de la fresa, Kader (1992) indicó los siguientes (citado por Zafrilla, 1999):

- la recolección de la fruta se debe efectuar en el estado óptimo de madurez, presentar más de $\frac{3}{4}$ partes de la superficie de color rojo y evitar el daño físico durante todos los pasos de su manipulación;
- si es posible se debe refrigerar inmediatamente el producto;
- se deben mantener una temperatura y humedad apropiadas (0°C y 90-95% de humedad relativa) durante el almacenamiento y transporte hasta llegar a su destino final.

En un estudio reciente se verificó que hasta 72 horas después de la recolección, bajo condiciones de refrigeración, no hay deterioro de los principales parámetros físico-químicos de la fresa fresca, sea entera o troceada (Castro *et al.*, 2002). La influencia de otros factores *post* recolección en la estabilidad del color, como la composición de la atmósfera de almacenamiento, el empleo de ozono en el ambiente de conservación o el tipo de envase, han sido también objeto de estudios por Gil *et al.* (1997) y Holcroft y Kader (1999).

Uno de los tratamientos más ensayados para mantener la apariencia atractiva en fresas frescas es la modificación de la atmósfera con distintos niveles de dióxido de carbono (CO₂). De manera general, este tipo de tratamiento influye de una forma positiva sobre el color exterior del fruto, pero provoca una disminución en el color interno, donde los contenidos de antocianos son, además, más bajos. Se ha sugerido que este comportamiento opuesto entre el interior y el exterior de la fresa podría ser debido a la existencia de perfiles antociánicos distintos, al encontrarse mayores cantidades de cianidina 3-glucósido (mayor estabilidad) en los tejidos externos, mientras que en el interior predominan los glicósidos de pelargonidina. Además, la acumulación de otros compuestos fenólicos, como los flavonoles, que pueden actuar como copigmentos, ejerciendo un papel protector sobre los antocianos, es también mayor en los tejidos externos (Gil *et al.*, 1997; Delgado-Vargas, 2000).

En el proceso de elaboración de mermeladas comerciales es habitual la utilización de fresas congeladas. Es importante que el proceso de congelación sea rápido para conseguir que no haya difusión del agua hacia el exterior celular y, de esta forma, impedir que durante la descongelación futura se produzca una lixiviación de solutos y, entre ellos, de antocianos (Castro *et al.*, 2002). Según Zafrilla (1999), la fruta no debería permanecer congelada por un periodo superior a 6 meses si va a ser empleada posteriormente en la elaboración de confitura, ya que disminuiría la calidad del producto final. Comparando las variedades *Camarosa* y *Selva*, Castro *et al.* (2002) encontraron que esta última variedad presentaba características más favorables de resistencia a la descongelación, mayores contenidos de fenoles totales, y de ácido ascórbico y que para este último era más ventajoso el mantenimiento del tallo cuando se utilizan frutos congelados.

Suutarinen *et al.* (2000) verificaron que el proceso de congelación influía en la calidad final del fruto y de la mermelada hecha con él, registrando mejor evaluación sensorial del color la mermelada hecha con fresas sometidas a un tratamiento con cloruro cálcico (CaCl₂) y sacarosa antes de la congelación. La existencia de una estabilización en el contenido en pigmentos y reducción en las reacciones de pardeamiento como consecuencia de la adición a fresas de diferentes niveles de sacarosa previa a su congelación rápida ha sido también observado por otros investigadores (Wrolstad *et al.*, 1990). Este efecto protector ha sido atribuido a la inhibición de enzimas degradativos (β -glucosidasa y polifenoloxidasas) y a una interferencia estérica de la sacarosa sobre potenciales reacciones de condensación (condensación antociano-fenoles, reacción de Maillard, interacción antociano-ácido

ascórbico) o como barrera parcial frente al oxígeno (Wrolstad *et al.*, 1990). Estas observaciones llevaron a que la adición de azúcar a los depósitos de fresas (en proporción de una parte de azúcar por cada cuatro o cinco partes de fruto) antes de su congelación para posterior procesado, con el objeto de mejorar la preservación el color y reforzar la duración de vida del producto, llegara a ser un procedimiento relativamente frecuente en algunos países hace algunos años.

Torreggiani *et al.* (1999), en zumos de fresa congelados a -10°C , también registraron una significativa mayor retención de pigmentos cuando se añadían los azúcares maltosa (20% p/p), sorbitol (20% p/p) y mezcla glucosa:fructosa:sacarosa (2:2:0.5, al 20% p/p), con respecto a los zumos sin azúcar añadido. Tras 4 meses de almacenamiento, la maltosa y el sorbitol conferían una protección superior a la de la mezcla de azúcares, mientras que a los 8 meses el sorbitol proporcionaba la mayor retención de pigmento. Una posible explicación para ello es que el sorbitol pueda alterar el poder nucleofílico del agua o tener un papel protector específico, por su naturaleza química, sobre los procesos de degradación enzimática de los antocianos.

5.2.2 – INFLUENCIA DEL PROCESADO Y ALMACENAMIENTO

Los pigmentos antociánicos son fácilmente destruidos durante el procesado de frutos y vegetales y posterior conservación. La totalidad de cambios en el color puede ser debido a numerosos factores, como la degradación del pigmento, su polimerización, reacciones con otros componentes de la formulación, procesos de pardeamiento no enzimático, oxidación de taninos, etc. (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Debido a la complejidad del conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en los sistemas alimentarios, como los zumos, concentrados, confituras y mermeladas, no es posible aislar un único factor que explique los cambios en los antocianos. La evaluación de un parámetro particular requiere su estudio en sistemas modelo para permitir un mejor control de la composición y factores que influyen en la estabilidad del pigmento.

Como se ha revisado anteriormente, entre los factores que afectan al color y a la estabilidad de los antocianos se encuentran el pH y la exposición a la luz. Aunque la expresión de color de los antocianos es dependiente del pH, los estudios hechos en mermeladas y confituras de fresa no han sido del todo concluyentes con respecto a esa correlación. No obstante, hay que tener en cuenta que en estos productos la posible influencia del pH siempre tendría una importancia relativa, ya que sus valores suelen oscilar en intervalos estrechos (3,2-3,5) durante el proceso de fabricación y se

mantiene prácticamente inalterables durante el almacenamiento (Zafrilla, 1999). Otro aspecto a tener en cuenta en relación con la expresión de color de los antocianos en las mermeladas es la copigmentación, ya que las fresas tienen concentraciones relevantes de posibles copigmentos, como flavonoles (Zafrilla, 1999). La luz tiene, en general, un efecto deletéreo sobre la estabilidad de los antocianos, debiendo evitarse la exposición a la misma de bebidas coloreadas naturales, como los zumos (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Según Zafrilla (1999) el efecto de la luz sobre el color de las confituras es, sin embargo, muy pequeño, por lo que resulta irrelevante recomendar su conservación en oscuridad.

Otro aspecto importante a considerar en relación con el color de los productos procesados de la fresa son las reacciones de pardeamiento enzimático. Aunque la Pg 3-gluc, antociano mayoritario de la fresa, no es sustrato para las PPO, se ha comprobado que se puede, por ejemplo, degradar cuando en el medio existe ácido clorogénico, debido a su reacción con la quinona generada en la oxidación de este último por las PPO (Kader *et al.*, 1999). Tanto PPO como peroxidasa son capaces de oxidar catequina, uno de los sustratos fenólicos más importantes en la fresa, dando lugar a productos con grado de polimerización diversos y algunos de ellos con tonalidades pardas. Se ha indicado que la formación de polímeros pardos resultantes de la oxidación de catequina en la fresa es debida fundamentalmente a la acción de PPO (López-Serrano y Barceló, 2002). Tanto PPO como catequinas se encuentran en la fresa en elevada concentración (López-Serrano y Barceló, 1995; Zafrilla, 1999). Este tipo de reacciones es posible que no se produzcan en las mermeladas y confituras, debido a la inactivación de las enzimas por la alta temperatura a que se someten en el proceso tecnológico, pero sí puede suceder que las PPO reaccionen con sus sustratos antes y durante el procesado para dar lugar a quinonas que son capaces de interactuar posteriormente con los antocianos, con la consiguiente alteración del color (Wesche-Ebeling y Montgomery, 1990). De hecho, se ha señalado que los eventuales efectos beneficiosos del escaldado sobre el color de zumos y concentrados de fresa atribuibles a la inactivación enzimática son neutralizados, en cierto grado, por las reacciones degradativas aceleradas por el calentamiento (Rwabahizi y Wrolstad, 1988). Por otra parte, López-Serrano y Barceló (1995) constataron que la inestabilidad de color en jarabes de fresa enlatados está, en parte, asociada a la acción oxidativa de una isoenzima peroxidasa que permanece activa incluso tras la apertización y que es capaz de provocar la oxidación de catequina aún a bajas concentraciones de H₂O₂ (de orden µM).

Se ha sugerido que el escaldado en microondas podría ser una alternativa eficaz para mejorar la estabilidad del color en zumos y concentrados (Wrolstad *et al.*, 1980). De Ancos *et al.* (1999) observaron que este tratamiento provoca modificaciones pequeñas en la composición cuali- y cuantitativa de antocianos y puede ser efectivo para la inactivación enzimática en purés de fresa previo a su almacenamiento o procesado industrial. La ultrafiltración, utilizada para la esterilización en frío y la clarificación de zumos por remoción de coloides, partículas en suspensión, carbohidratos de elevada masa molecular, y proteínas, también puede ser un tratamiento efectivo para la eliminación de enzimas degradativas como las polifenoxidasas. Sin embargo, este tipo de proceso no parece beneficioso para el mantenimiento del color, ya que, aparentemente, la disminución de constituyentes de elevada masa molecular por la ultrafiltración desestabiliza los antocianos (Rwabahizi y Wrolstad, 1988).

La disponibilidad de oxígeno y la temperatura de procesado y de almacenamiento son otros de los factores que afectan a los antocianos. Bakker *et al.* (1992) estudiaron la estabilidad del color en zumo y puré de fresa, almacenados a +20°C y -20°C en condiciones aeróbicas y anaerobias (aire vs nitrógeno). Observaron que la clarificación antes del almacenamiento causaba una pérdida considerable en la concentración inicial de antocianos y llegaron a la conclusión de que la máxima preservación del color se conseguía bajo nitrógeno y a -20°C. Sin embargo, encontraron que, para cada una de las temperaturas ensayadas, la exclusión del oxígeno no influía ni en la velocidad de pérdida de antocianos durante el almacenamiento, ni en la formación de pigmentos poliméricos. En las muestras conservadas a -20°C no se producían pérdidas de antocianos ni un aumento de polímeros, mientras que en las almacenadas a +20°C se apreciaba la existencia de polimerización, especialmente en las muestras sometidas a clarificación.

García-Viguera *et al.* (1999) verificaron que la estabilidad del color en mermeladas de fresas es dependiente de la variedad y de la temperatura de almacenamiento del producto final. Igualmente, constataron que la temperatura y el tiempo de cocción de las confituras tenían una marcada influencia en el color final del producto. De manera general, confirmaron que la concentración de pigmentos monoméricos disminuye durante el almacenamiento, siendo esta disminución mayor cuanto más elevada es la temperatura a la que se almacenen. El descenso de antocianos se acompaña de un aumento en los niveles de pigmentos poliméricos, de modo que la velocidad de pérdida de color es mucho menor que la de pérdida de

antocianos. Entre las variedades estudiadas por ellos, las confituras elaboradas con fresa de la variedad *Oso Grande* fueron las que mostraron peor pigmentación y menor estabilidad del color durante el procesado y almacenamiento.

Otro factor con influencia sobre la estabilidad antociánica es la sulfitación. El SO₂ decolora reversiblemente los antocianos, pero también los protege de las reacciones de polimerización, por lo que, unido a la inhibición de las PPO que produce, disminuye su velocidad de pérdida (Bakker y Bridle, 1992). La adición de SO₂ durante la producción de puré de fresa y almacenamiento inmediato a -18°C, para posterior producción de mermelada, mejora la estabilidad del color del puré y lleva a mermeladas cuyo color es mejor valorado sensorial e instrumentalmente (Sistrunk *et al.*, 1982).

Además de los anteriores, hay otros aspectos que han sido considerados para preservar y/o mejorar el color de los derivados de la fresa. La influencia del estado de madurez de las fresas sobre la estabilidad del color en las confituras fue revisada por Spayd y Morris (1981), quienes indican que la fabricación de mermeladas con un 50% de fruta inmadura no aumenta la inestabilidad del color durante el almacenamiento y establecen que la adición de fresas inmaduras no tiene influencia en los cambios de color que sufren las respectivas mermeladas durante el almacenamiento a 2°C, 25°C y 35°C.

Diversos investigadores han propuesto la adición de antocianos o extractos. Garzón y Wrolstad (2002) habían comprobado que el procesado para la obtención de zumo y concentrado de fresa provocaba una acentuada destrucción de antocianos y de ácido ascórbico, que continuaba a lo largo del almacenamiento. La fortificación de zumos (8° Brix) y concentrados (65° Brix) con Pg 3-gluc, Pg 3-soforósido y Pg 3-soforósido-5-glucósido, les permitió confirmar que un aumento en el contenido total de pigmentos reforzaba la estabilidad de los antocianos. Asimismo, comprobaron que la estabilidad de Pg 3-gluc era similar a la de los otros dos derivados de pelargonidina ensayados, cuando su concentración se ajustaba a cantidades equivalentes. Otro aspecto observado por estos autores fue que existía una considerable diferencia entre la estabilidad de los derivados de pelargonidina en sistemas modelo y la que presentaban los mismos pigmentos en los zumos y concentrados de fresa. Así, por ejemplo, el tiempo de media vida aumentaba de 12 días en zumo de fresa (Garzón y Wrolstad, 2002) hasta 934 días en sistemas modelo (Garzón y Wrolstad, 2001). Zafrilla *et al.* (1998) ensayaron la adición de extractos de saúco, empleados tradicionalmente como colorante en la industria conservera, y de zumo de granada a mermeladas de fresa, demostrando que ambas ayudaban a prevenir la pérdida de color y que la

utilización del zumo de granada como estabilizante del color de estas mermeladas era una alternativa válida al extracto de saúco.

La aplicación de presiones hidrostáticas altas (EPH), como alternativa no térmica para la destrucción microbiana y estabilización de los alimentos, fue aplicada en la confección de mermeladas de fresa con cantidades variables de pectina de alto grado de metoxilación por Dervisi *et al.* (2001). Encontraron que la concentración creciente de pectina conducía a un descenso en la intensidad del color en las muestras; los mejores resultados se obtuvieron en las mermeladas elaboradas con 5% (p/p) de pectina; lo que les llevó a sugerir el intervalo 2,5-5% (p/p) de concentración de pectina como el indicado para conseguir las mejores propiedades de textura y de retención de color. Por su parte, Grigelmo-Miguel y Martín-Belloso (1999) observaron que la adición de fibra a mermeladas de fresa, a pesar de no afectar al pH, producía una modificación en el color, que se volvía algo más luminoso, pero, a la vez, se desplazaba hacia tonalidades más amarillas y verdes.



Objetivos y Planteamiento Experimental

El presente trabajo se inscribe en el seno de un proyecto general cuyo objetivo final es el de llegar a elucidar las sustancias y procesos responsables de la inestabilidad del color en productos derivados de la fresa y plantear soluciones para resolver este problema.

Como se ha establecido en los antecedentes bibliográficos, la alteración del color que tiene lugar durante el procesado y almacenamiento en los productos derivados de la fresa es, en gran medida, consecuencia de las propiedades y características de los polifenoles presentes en la misma y, principalmente, de las fracciones antociánica y flavanólica. Hay que tener presente que, aunque los componentes de esta última fracción no aportan color directamente, su contribución al mismo es muy importante, a través de las interacciones que establecen con los antocianos, así como por ser sustratos en reacciones de pardeamiento. De este modo, el objeto principal del trabajo planteado para esta Tesis Doctoral era el de profundizar en el conocimiento de esas familias fenólicas en la fresa y estudiar las reacciones de las mismas y su influencia sobre el color. A través de este conocimiento se esperaba adquirir el suficiente criterio científico para, en una etapa posterior, programar ensayos de intervención tecnológica encaminados a mejorar la estabilidad del color en mermeladas y otros productos derivados de la fresa.

Para cumplir con estos objetivos, se planteó un estudio que comprendía las tres etapas siguientes:

1) Análisis de la composición en antocianos y flavanoles de la fresa.

Con esta primera etapa se trataba de obtener un conocimiento detallado de los compuestos de estas dos familias fenólicas presentes en la fresa. Aunque existían diversos trabajos previos sobre las mismas, sus constituyentes no estaban aún suficientemente descritos, especialmente en lo relativo a los flavanoles y a los componentes no mayoritarios de la fracción antociánica.

Para la realización de estos estudios, descritos en los Capítulos IV y V de la presente memoria, fue necesaria una optimización previa de los métodos de análisis para su adaptación a las características de composición de la matriz considerada. Tanto para el análisis de antocianos como de flavanoles se recurrió a la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), aunque utilizando sistemas de detección diferentes. Así, se pusieron a punto unas nuevas condiciones para la separación cromatográfica de los antocianos de la fresa, compatibles con las exigencias del detector de espectrometría de masas. El método desarrollado fue luego aplicado al análisis de la composición antociánica cualitativa y cuantitativa en cinco variedades de fresa. Los distintos compuestos fueron caracterizados a partir de los datos suministrados por los dos sistemas de detección empleados (fotometría de diodos y espectrometría de masas), es decir los espectros UV-visible y de masas y patrón de fragmentación (MS^n), así como teniendo en cuenta los datos bibliográficos disponibles y el conocimiento previamente adquirido en el estudio de los antocianos en otros sistemas alimentarios.

Para el análisis de flavanoles (catequinas y proantocianidinas) se recurrió también al análisis por HPLC, empleando en este caso la detección tras reacción química con *p*-dimetilaminocinamaldehído (DMACA), según el método puesto a punto en nuestro laboratorio (de Pascual-Teresa *et al.*, 1998, 2000). Se trata de una técnica sensible y selectiva para este tipo de sustancias, que evita las interferencias de otros compuestos fenólicos y que fue aplicada tanto con fines cualitativos como cuantitativos al análisis de la composición flavanólica en las cinco mismas variedades de fresas.

Para la cuantificación de sustancias era necesario disponer de patrones de referencia, para el calibrado de las técnicas. Algunas de los compuestos fenólicos objeto de estudio no están disponibles comercialmente, como las proantocianidinas, o son de precio elevado, como ocurre con los antocianos. Por ello, con el fin de obtener patrones, se procedió a su obtención a partir de fuentes vegetales apropiadas (la propia fresa, hollejo y semilla de uva, fruto de almendra o piel de manzana). El aislamiento se hizo por técnicas de cromatografía líquida de baja y alta presión, utilizando diversas

fases estacionarias, según el tipo de compuestos a separar. La obtención de antocianos y flavanoles fue, además, necesaria para su utilización en los ensayos que comporta el objetivo siguiente.

2) Ensayos de estabilidad y reactividad del principal antociano de la fresa en sistemas modelo.

Mediante estos ensayos se pretendía estudiar los procesos con influencia sobre la estabilidad del pelargonidin 3-glucósido, antociano ampliamente mayoritario de la fresa y principal responsable del color en sus productos derivados. Para poder realizar un mejor control y seguimiento del mismo, el estudio se realizó en disoluciones modelo, utilizando condiciones determinadas de acidez y temperatura y haciendo variar la composición en cuanto a presencia de oxígeno, azúcares y flavanoles, factores que se suponía que podían mostrar mayor influencia sobre el comportamiento del antociano. En todos los casos se hizo un seguimiento de la evolución de las disoluciones por espectrofotometría UV-visible y HPLC con detección por espectrofotometría de diodos y espectrometría de masas, utilizando el método puesto a punto en la etapa anterior. Se pretendía, así, obtener conclusiones sobre los cambios de color y las modificaciones producidas en la composición química de las disoluciones, con especial atención a las transformaciones experimentadas por el antocianos y la detección de nuevos productos formados, que pudieran contribuir posteriormente a explicar los cambios que se producen durante el procesado y conservación en los productos derivados de la fresa.

Estos ensayos se encuentran recogidos en los Capítulos VI y VII y para su realización fue necesario disponer previamente de cantidades suficientes de los compuestos a utilizar (antociano y flavanoles) en la preparación de los sistemas modelo, para lo que se recurrió a su aislamiento o semisíntesis. Los estudios de estabilidad se rea

3) Ensayos de estabilidad de la materia colorante en mermeladas de fresa.

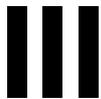
Se realizó también un seguimiento del color y de la composición de la materia colorante durante el procesado y almacenamiento en mermelada de fresa obtenida a escala de laboratorio. Este estudio tenía por objeto complementar los ensayos anteriores, a través

de una aproximación más real y disponiendo ya de un conocimiento previo sobre la estabilidad y transformaciones de los antocianos.

Asimismo, de manera alternativa y basándose en los conocimientos adquiridos sobre reactividad de antocianos, se realizaron ensayos preliminares de intervención tecnológica en mermeladas, procediendo a la incorporación a las mismas, durante su elaboración, de ácido pirúvico o acetaldehído. Con estos ensayos se pretendía comprobar si la adición de esos compuestos era capaz de inducir la formación de nuevos pigmentos derivados de antocianos, operando en un medio semisólido, como es la mermelada, y con características particulares de elaboración, y, de ser así, cómo ello influía sobre la definición y estabilidad del color.

Los ensayos que comporta este objetivo se encuentran descritos en el Capítulo VIII y para los mismos se dispuso del asesoramiento y de materias primas suministradas por la empresa colaboradora para la elaboración de las mermeladas de fresa.

Un aspecto clave, tanto en este objetivo como en el anterior, era la identificación de productos formados en el curso de los procesos estudiados (especialmente nuevos pigmentos), la cual fue realizada de manera tentativa a partir de sus espectros UV-visible y de masas y patrón de fragmentación (MS^n), suministrados por los detectores acoplados a HPLC. En estos estudios se realizó un seguimiento de las mermeladas por análisis cromático en el espacio CIELAB, con el fin de disponer de una mejor caracterización de la evolución del color.



Instrumental y Productos

- 1 – Aparatos y material**
- 2 – Disolventes, reactivos y sustancias patrón**
- 3 – Fases estacionarias para cromatografía**

1 – APARATOS Y MATERIAL

- Agitador de tubos
- Agitador magnético *Agimatic P-Selecta*
- Balanza analítica *Mettler Toledo AG245*
- Balanza electrónica *AND FY-300, Giralte*
- Baño de agua termostatzado *Precistern P-Selecta*
- Baño de bloque metálico para tubos “Multiplaces” *P-Selecta*
- Baño de ultrasonidos *Branson 5510*
- Bomba isocrática *Shimadzu LC-10AS*
- Bomba peristáltica *Minipuls2, Gilson*
- Capsuladora y descapsuladora para viales, *Supelco*
- Centrífuga *Kokusan*, modelo H-103N, con rotor RF-110 (f.c._{máx} = 2.100 g)
- Colorímetro tristímulo *Minolta CR-300*, con procesador de datos *DP-301*
- Columnas de vidrio para cromatografía *Econo-Column® 1,5 x 30 cm y 2,5 x 50 cm, Bio-Rad*
- Congeladores (-18°C y -36°C)
- Conjunto de filtración para muestras *Millipore*, compuesto por jeringa, prefiltros y filtros de 10 mm de diámetro y 0,45 µm de diámetro de poro
- Cubetas de vidrio para cromatografía en capa fina
- Detector UV-Vis *Shimadzu SPD-10AVvp*
- Equipo de agua ultrapura *Direct-Q3, Millipore*, con filtros *Millipak®40 (0,22 µm)* y con cartucho *Quantum EX* y módulo de pretratamiento *Progard 2*.
- Equipo de filtración para disolventes y reactivos *Millipore*, compuesto por bomba de vacío eléctrica, *kitasato*, embudo, placa filtrante y filtros de 47 mm de diámetro y 0,45 µm de diámetro de poro (fases inorgánicas) y 0,5 µm (fases orgánicas)
- Espectrofotómetro UV-Vis *HP8453 Hewlett-Packard* acoplado a una estación de control y tratamiento de datos *UV-Visible ChemStation (Rev. A.07.01) Hewlett-Packard*
- Espectrómetro de masas *Finnigan*, modelo *LCQ™ – ThermoQuest*, dotado de fuente de ionización a presión atmosférica (API), con interfase de ionización por “electrospray” (ESI), y acoplado a una estación de tratamiento de datos *X-calibur™* (versión 1.2)
- Estufa de cultivo (25°C)

- Evaporador rotatorio *Rotavapor Büchi* (modelo R-124), con baño de agua termostatzado (modelo B-480), y bomba de vacío (modelo Vac® V-500), con controlador (modelo B-721) acoplado a un recirculador con fluido refrigerante
- Filtros de jeringa desechables Millex® HV de 0,45 µm, *Millipore*
- Frigorífico (2-5°C)
- Homogeneizador *Polytron* (Kinematica), modelo PT 10-35
- Liofilizador *Telstar*, modelo Cryodos-80
- Material usual de laboratorio
- Micro jeringa de 250 µL, *Hamilton*
- pHmetro *Crison* Micro pH 2000
- Refractómetro *Shibuya*
- Sistema de cromatografía de gases compuesto por cromatógrafo de gases *Konik 3000-HRGC* equipado con un detector de ionización de llama, usando como gas portador helio (Alphagaz2 de *AirLiquide*) y con un integrador *Konik SP 4290*.
- Sistema de cromatografía líquida de alta eficacia con bomba *Waters 600E*, inyector automático termostatzado *Waters™717 plus*, sistema de termostatzación de columnas (*Waters*), conectado a un detector de diodos en circuito integrado *Hewlett-Packard 1040M series II*, y acoplado a una estación de control y tratamiento de datos *HP ChemStation* para cromatografía líquida (Rev. A.06.01) de *Hewlett-Packard*. Este sistema es el que se empleará en el análisis de flavanoles, siendo la bomba isocrática de HPLC *Shimadzu LC-10AS* y el detector UV-Vis *Shimadzu SPD-10AVvp* ya mencionados, los que realizan, respectivamente, el bombeo del reactivo DMACA y la detección tras derivatización.
- Sistema de cromatografía líquida de alta eficacia *Hewlett-Packard 1100*, compuesto por una bomba cuaternaria, inyector automático, sistema de termostatzación de columnas y detector de diodos en circuito integrado dotado de célula de flujo para altas presiones, acoplado a una estación de control y tratamiento de datos *HP ChemStation* para cromatografía líquida (Rev. A.05.04), de *Hewlett-Packard*. Este equipo es el que se acoplará al equipo de masas cuando se emplee HPLC-MS.
- Sistema de cromatografía líquida de alta eficacia *Hewlett-Packard 1050*, compuesto por bomba cuaternaria y inyector manual, con módulo de termostatzación (*Waters*) y detector de diodos UV-Vis *Shimadzu S-PDM10Avp*, acoplado a una estación de tratamiento de datos para cromatografía líquida *Class-M10A* de *Shimadzu* (versión 1.60). Este sistema es el que se empleará para:
 - poner a punto el método HPLC para análisis de los antocianos de fresa;
 - analizar el perfil antociánico de las muestras de fresa y mermelada;
 - comprobar el grado de pureza de los antocianos aislados;

- cuantificar los antocianos;
- monitorizar la evolución de los ensayos de estabilidad de Pg 3-gluc, de las interacciones entre Pg 3-gluc y flavan-3-oles, y la formación de nuevos pigmentos en mermeladas de fresa.
- Sistema de cromatografía líquida de alta eficacia semipreparativa compuesta por bomba *Waters*TM600 e inyector manual, módulo de compresión radial para cartuchos Prep LC 25 mm (*Waters*) y detector de diodos *Waters*TM486, acoplado a una estación de control y tratamiento de datos *Millennium*³² (versión 3.05.01) de *Waters* y a un colector de fracciones (*Waters*)
- Ultracentrífuga refrigerada Sorvall RC-5B, *Giralt*, con rotor GSA (ángulo fijo de 28°; f.c.máx = 27 485 g; $r_{\text{máx}} = 14,56$ cm, $r_{\text{min}} = 3,77$ cm)
- Viales de vidrio (10 mL) con tapones de goma y sellos de aluminio rizado (*Supelco*)
- Vortex

2 – DISOLVENTES, REACTIVOS Y SUSTANCIAS PATRÓN

- Acetaldehído (*Panreac Síntesis*)
- Acetato de etilo
- Acetonitrilo calidad HPLC (*Merck*)
- Ácido 2,4-dihidroxibenzoico al 97% (*Aldrich*)
- Ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico al 90% (*Aldrich*)
- Ácido acético
- Ácido acético glacial
- Ácido cítrico (*Sigma*)
- Ácido clorhídrico
- Ácido fórmico
- Ácido pirúvico
- Ácido sulfúrico
- Ácido trifluoroacético
- Alcohol *n*-amílico
- Anhídrido acético
- L(+)-Arabinosa (*Sigma*)
- Borohidruro sódico (*Aldrich*)
- Cloruro cálcico
- (+)-catequina (*Sigma*)
- Diclorometano
- *p*-dimetilaminocinamaldehído (*Acros Organics*)
- (-)-epicatequina (*Sigma*)
- (-)-epicatequina-3, O-galato (*Extrasynthèse*)
- Etanol
- Etanol absoluto (*Panreac*)
- D(-)-Fructosa (*Sigma*)
- D(+)-Galactosa (*Sigma*)
- D(+)-Glucosa (*Sigma*)
- Hidróxido amónico
- *myo*-Inositol (*Merck*)
- Jarabe de glucosa al 76%
- D(+)-Manosa (*Sigma*)
- Metanol

- Metanol calidad HPLC (*Merck*)
- Metil-imidazol (*Sigma*)
- Pectina de bajo metóxilo LM: tipo LA – 410 (*Danisco Cultor España S.A.*)
- L(+)-Rhamnosa (*Sigma*)
- Sacarosa
- Sorbato potásico
- (±)-taxifolina (*Sigma*)
- 2,4,6-trihidroxibenzaldehído (*Aldrich*)
- 1,3,5-trihidroxibenzeno (floroglucinol) (*Fluka*)
- D(+)-Xilosa (*Sigma*)

Todos los reactivos y disolventes de los que no se especifica la marca fueron de calidad P. A. o purísimos, según los casos.

3 – FASES ESTACIONARIAS PARA CROMATOGRAFÍA

- Cartuchos de compresión radial con fase reversa Prep Nova-Pak® HR C18, 6 µm, 60 Å (25 x 100 mm) de *Waters*
- Cartuchos para extracción en fase sólida Sep-Pak® de *Waters*, de 3 cm³ (500 mg) de fase reversa C18
- Columnas para cromatografía líquida de alta eficacia analítica Spherisorb® S3 ODS-2 C18, 3 µm (4,6 x 150 mm) de *Waters*
- Columna para cromatografía líquida de alta eficacia analítica AQUA de Phenomenex®, 5 µm, de fase reversa C18 (150 x 4,60 mm)
- Columna para cromatografía gaseosa ECNSS (1/4" de diámetro externo x 2 mm de diámetro interno x 2 m de largo) con 3% Gas Chrom P, de *Teknokroma*
- Cromatoplasmas HPTLC 10 x 10 cm, sílica gel 60 (*Merck*)
- Sephadex® LH-20 (*Fluka*)
- Placas de vidrio con sílica gel de 10 x10 cm (*Merck*)
- Resina mixta (Bourzeix *et al.*, 1982): se mezclan 20 g de Polyclar AT (*Serva Electrophoresis*), 10 g de Sílica gel G para cromatografía de capa fina (*Merck*) y 70 g de Sílica gel 60 para cromatografía de columna (*Merck*). Se somete la mezcla a ebullición a reflujo en exceso de HCl concentrado (al 37%) durante 30 minutos, y posteriormente se lava con agua bidestilada hasta obtener un pH aproximado de 5.

IV

Estudio de Antocianos en Fresa

1 – Introducción

2 – Metodología

2.1 – Material vegetal

2.2 – Extracción

2.3 – Fraccionamiento de antocianos por cromatografía en columna (CC)

2.4 – Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

2.4.1 – Método de separación

2.4.2 – Detección por espectrometría de masas

2.4.3 – Análisis cuantitativo de antocianos

2.5 – Hidrólisis ácida

2.6 – Identificación de azúcares por cromatografía de gases (GLC)

3 – Resultados y Discusión

3.1 – Identificación de antocianos en fresa

3.2 – Análisis cuantitativo de antocianos en fresa

4 – Conclusiones

1 – INTRODUCCIÓN

El primer objetivo de esta Tesis Doctoral era el de caracterizar el perfil antociánico cualitativo y cuantitativo de la fresa, intentando identificar los pigmentos minoritarios que aparecen repetidamente en los extractos de esta fruta.

En el capítulo I, apartado 5.1, se hizo una exposición somera sobre el perfil cualitativo de antocianos en la fresa, en el cual destacan principalmente dos antocianidinas: pelargonidina y cianidina. La pelargonidina 3-glucósido (Pg 3-gluc) constituye el pigmento mayoritario en todas las variedades estudiadas por distintos investigadores, y consecuentemente, es aquél que más condiciona el color del fruto o de sus derivados, pero la identificación precisa de los restantes pigmentos, y especialmente los minoritarios, usando técnicas de identificación que vayan más allá que la secuencia de elución y del espectro de absorción, continuaba abierta.

Hay que indicar que, en general y en nuestra opinión, los estudios sobre composición antociánica de la fresa referidos en el capítulo I, no reflejan de manera adecuada la dificultad de obtención de extractos exentos de otros compuestos como azúcares, pectinas o determinados compuestos fenólicos – todos ellos presentes en el fruto en cantidad elevada - que complican la extracción y el fraccionamiento y pueden posteriormente interferir en el análisis de antocianos. La extracción con disolventes acuosos es desaconsejable con respecto a metanol o acetona, ya que no precipitan las pectinas, lo que da lugar a extractos turbios y de difícil filtración (García-Viguera *et al.*, 1998). Por ello, para el presente estudio, se ha optado por el uso de metanol acidificado con ácido clorhídrico al 1‰, disolvente con gran poder de extracción antociánica pero con una concentración de ácido suficientemente baja para no promover la hidrólisis de los antocianos. La ausencia de antocianidinas en los extractos, que podrían informar sobre la existencia de cierto grado de hidrólisis, fue comprobada desde los primeros análisis de HPLC realizados. En todo caso, la extracción con metanol acidificado no es suficientemente selectiva y otros constituyentes de la planta como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y proteínas y compuestos fenólicos, son co-extraídos conjuntamente con los pigmentos. Algunas de estas “impurezas” pueden acelerar la degradación de los antocianos o causar problemas en las etapas posteriores de análisis, por lo que es recomendable proceder a una purificación de los extractos. Por ello, para el análisis de los perfiles antociánicos de las variedades y su determinación cuantitativa, se recurrió a realizar una extracción en fase sólida (SPE) dado que es un método relativamente simple y que permite, en

una única etapa, eliminar impurezas de naturaleza polar. Se optó por utilizar cartuchos de fase reversa, por los mejores resultados que suelen ofrecer en comparación con otros (Kraemer-Schafhalter *et al.*, 1998).

El análisis cuali- y cuantitativo se basó en la técnica de HPLC, la más comúnmente usada por su capacidad para separar individualmente los pigmentos, rapidez y facilidad para la cuantificación (Jackman y Smith, 1996).

Con relación al material vegetal de partida, Zafrilla (1999) observó que los valores de contenido de antocianos obtenidos a partir de fresas congeladas resultan más repetitivos y precisos (menores desviaciones estándar) que los obtenidos a partir de la fruta fresca, por lo que para el análisis de cuantitativo se partió del producto conservado en congelación.

Con el fin de obtener fracciones más limpias, sencillas y concentradas que facilitasen la identificación de antocianos minoritarios y el aislamiento de los mayoritarios para su empleo posterior como patrones, se procedió al fraccionamiento de extractos brutos de antocianos por cromatografía en columna. La identificación de los pigmentos presentes en las fracciones se llevó a cabo por combinación de los resultados obtenidos con relación al comportamiento de elución cromatográfica y de sus espectros UV-visible y de masas. Además, como apoyo para la identificación, se recurrió a la realización de hidrólisis ácida que, al provocar la ruptura del enlace glicosídico, permite la separación de(l) (los) azúcar(es) y del aglucón, que pueden así, ser posteriormente identificados. La identificación de antocianidinas se realizó por HPLC-DAS y comparación con patrones y la de los azúcares por análisis de cromatografía gaseosa con detector de ionización a la llama. En los antocianos con más de un monosacárido sustituyente, se realizó una hidrólisis ácida, suave para favorecer la separación parcial o secuencial de azúcares que permitiera eventualmente concluir sobre el patrón de glicosilación a través de la identificación de las especies intermediarias (Francis, 1982).

2 – METODOLOGIA

2.1 - MATERIAL VEGETAL

Para la obtención de los extractos antociánicos que fueron utilizados tanto para optimizar el método de HPLC como para el fraccionamiento por cromatografía en columna, se utilizaron fresas enteras de la variedad *Camarosa*, adquiridas en un mercado local.

El estudio cualitativo y cuantitativo de la composición antociánica se llevó a cabo con muestras de cinco variedades de fresas - *Camarosa*, *Carisma*, *Eris*, *Oso Grande* y *Tudnew* - procedentes de cultivos experimentales seleccionados, correspondientes a las cosechas de 2001 y 2002, y suministradas por el Dr. Luis Carlos Sanz Martínez, Investigador Científico del Instituto de la Grasa - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) - de Sevilla. Dichas muestras, que se encontraban todas en su grado óptimo de madurez para el consumo cuando fueron recogidas, se recibieron en nuestro laboratorio congeladas, desrabadas y troceadas, y se mantuvieron en congelación a -35°C hasta el momento de su análisis.

2.2 – EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

Las fresas congeladas (40-50 g) exentas de pedúnculo eran maceradas en 100 mL de metanol que contenía 0,1% de HCl y mantenidas durante la noche (~ 14 horas) en refrigeración ($3-5^{\circ}\text{C}$). Al cabo de este tiempo, eran trituradas con un homogeneizador y centrifugadas durante 15 min a $4000\times g$ a una temperatura de 2°C . El sobrenadante era filtrado a vacío a través de un embudo de Büchner y el residuo sólido era re-extraído en las mismas condiciones el número de veces necesario (generalmente 2 – 3 extracciones adicionales) para asegurar la extracción total de los antocianos. Las fases hidroalcohólicas obtenidas se reunían y se añadía una pequeña cantidad de agua ultrapura antes de proceder a concentrar el extracto, en evaporador rotatorio a 30°C , hasta eliminar todo el metanol. El extracto acuoso resultante era transferido a un matraz aforado y enrasado con agua ultrapura hasta 50 mL, obteniéndose así un extracto bruto de antocianos, que era conservado en congelador (-18°C) el mínimo tiempo posible hasta la realización de los análisis. Todas estas etapas eran realizadas con especial cuidado, asegurando un buen lavado del material utilizado

para la extracción (kitasato, embudos, tubos y balones) con el fin de asegurar una recuperación cuantitativa de antocianos.

La purificación de extractos se realizaba justo antes de su inyección en HPLC, haciendo pasar los extractos brutos (2 mL) por cartuchos Sep-Pak® de fase reversa C18 para extracción en fase sólida (SPE), a fin de eliminar fundamentalmente ácidos y azúcares.

La extracción SPE consta generalmente de cuatro etapas: acondicionamiento (los grupos funcionales del material adsorbente son solvatados para que puedan interactuar con el extracto), retención (los antocianos se adsorben al relleno), lavado selectivo (remoción de las especies indeseables) y elución (los antocianos son desorbidos y recuperados para el análisis). En nuestro caso, el extracto bruto de antocianos de fresa, adsorbido en el cartucho, era lavado con agua ultrapura, y los antocianos que quedaban retenidos, eran eluidos con una disolución de metanol:ácido trifluoroacético 0,1% (95:5) y recogidos en un matraz de rotavapor, donde se añadía agua ultrapura antes de proceder a la concentración (30°C). El extracto acuoso resultante era enrasado a un volumen de 10 mL con agua ultrapura, tras lo cual se filtraba (0,45 µm) y se analizaba por HPLC.

Para cada variedad de fresa y para cada año de cosecha, se obtuvieron 3 extractos independientes, que eran purificados y analizados por separado.

2.3 – FRACCIONAMIENTO DE ANTOCIANOS POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA (CC)

Se procedió al fraccionamiento por cromatografía en columna de un extracto bruto de fresa (500 g), obtenido como se indica en el apartado anterior. El objeto era obtener fracciones más limpias, concentradas en pigmentos y de composición más sencilla. Algunas de estas fracciones se utilizaron para abordar la identificación de los antocianos minoritarios, y otras como fuente para la obtención de antocianos mayoritarios, para su empleo posterior como patrones. La fase estacionaria utilizada fue una resina mixta de gel de sílice y polivinilpirrolidona (PVP) que ha sido frecuentemente utilizada en nuestro laboratorio para el fraccionamiento de distintos extractos antociánicos (Hebrero *et al.*, 1988), cuya preparación se recoge en el apartado 3 del Capítulo III.

La fase estacionaria se empaquetó en una columna de vidrio (50 x 2,5 cm diámetro interno) hasta unos 30 cm de altura y se activó haciendo pasar una solución MeOH: HCl 0,1% (20:80, v/v). El extracto acuoso de fresa fue depositado cuidadosamente sobre la fase estacionaria y lavado con agua. El fraccionamiento posterior fue llevado a cabo por elución con mezclas etanol (EtOH):agua conteniendo 0,1% de HCl 1N, estableciendo un gradiente de EtOH desde el 20% hasta el 95%. Se recogieron tres fracciones (A, B y C), de acuerdo con la composición antocianica monitorizada por HPTLC en cromatoplasmas de silicagel 60, usando como fase móvil una disolución de alcohol *n*-amílico:ácido acético:agua (4:15:1, v/v). Estas tres fracciones fueron posteriormente concentradas en evaporador rotativo y recuperadas en agua, sometiéndose luego, según los casos, a su análisis por HPLC-DAS-MS, según se describe a continuación, o a posterior purificación por HPLC a escala semipreparativa, utilizando el método recogido en el apartado 2.1 del capítulo VI de la presente memoria de Tesis.

2.4 – CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

2.4.1 – MÉTODO DE SEPARACIÓN

Inicialmente se ensayaron las condiciones cromatográficas utilizadas en nuestro laboratorio para el análisis de antocianos de la uva, encontrando que éstas no conseguían una resolución satisfactoria de los pigmentos de la fresa. Particularmente, no permitían la separación de los picos correspondientes a los dos antocianos mayoritarios, Pg 3-gluc y Pg 3-rut, lo que se hacía necesario para poder cuantificarlos de forma más precisa. Por ello, se procedió a optimizar un método de separación. Además, se atendió a que el mismo fuese compatible con el empleo del detector de masas.

Se ensayaron diversas columnas de fase reversa y condiciones de elución cromatográfica – distintos ácidos y a diferentes concentraciones, variaciones en el gradiente, flujo y temperatura de elución. Los mejores resultados fueron obtenidos empleando una columna C18 de fase reversa con recubrimiento con un reactivo hidrofílico (*polar endcapping*), que permite una mayor selectividad en la separación de los compuestos más polares, en condiciones de elución con elevados porcentajes de fase móvil acuosa, como las exigidas para la separación del glucósido y el rutinósido de pelargonidina.

Los sistemas de elución utilizados en la cromatografía en fase reversa recurren normalmente al uso de mezclas binarias de un disolvente orgánico poco polar (muy habitualmente acetonitrilo o metanol) y un disolvente acuoso polar, que, para la separación de los compuestos fenólicos, debe poseer un carácter ácido, con el objeto de suprimir la ionización de los grupos fenólicos y minimizar la formación de “colas”. En el caso particular de los antocianos debe, además, aportar un pH lo suficientemente bajo para producir su desplazamiento hacia las formas flavilio, con el objeto de obtener picos más estrechos y facilitar la detección fotométrica en el visible. En nuestro caso, se optó por el acetonitrilo, como eluyente menos polar, y el ácido trifluoracético (TFA), como modificador ácido. El uso de metanol daba lugar a picos más anchos y, en ocasiones, “desdoblados”. Por su parte, entre los ácidos ensayados, tanto TFA como fórmico conseguían separaciones aceptables, aunque no así el acético. La perspectiva de utilización del acoplamiento HPLC-MS nos llevó a rechazar el ácido fórmico, ya que su uso (especialmente a concentraciones relativamente altas como las que facilitan las mejores separaciones) plantea problemas de corrosión y afecta al detector de masas. En este sentido, el TFA al 0,1% resultaba una buena opción, ya que aportaba un pH lo suficientemente bajo (pH ~ 1,9) y, además, presenta elevada volatilidad, lo que facilita su eliminación cuando se recurre a HPLC con fines semipreparativos. Con estas premisas se consiguió poner a punto un gradiente de elución que conseguía una resolución cromatográfica satisfactoria de los antocianos de fresa a un flujo suficientemente bajo (0,5 mL.min⁻¹), compatible con las exigencias del detector de masas. Las condiciones optimizadas se resumen a continuación:

Fase estacionaria: Columna para cromatografía líquida de alta eficacia AQUA de Phenomenex®, 5 µm, de fase reversa C18 (150 x 4,60 mm)

Fase móvil: Eluyente A → mezcla [ácido trifluoracético:agua] (0,1:99,9) (v/v)

Eluyente B → Acetonitrilo (100%)

Gradiente:

Tiempo (min.)	A (%)	B (%)
0	90	10
5	90	10
20	85	15
25	85	15
30	82	18
50	65	35
60	90	10

Temperatura de la columna: 35°C (termostatación mediante módulo de horno)

Flujo: 0,5 mL.min⁻¹

Para el análisis cuantitativo se procedía a la detección fotométrica en el visible a 520 nm, mientras que con fines de identificación se realizaba una doble detección en línea mediante espectrofotometría de diodos y espectrometría de masas (HPLC-DAS-MS).

2.4.2 – DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (HPLC-MS)

Los análisis por espectrometría de masas se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas, provisto de fuente de ionización a presión atmosférica (API) y utilizando una interfase de ionización por *electrospray* (ESI) (ver descripción del equipo en el Capítulo III). El sistema HPLC estaba conectado a la fuente del espectrómetro de masas por la salida del detector de fotodiodos. Para la detección de antocianos se utilizaron las condiciones que se indican a continuación, que habían sido optimizadas previamente en nuestro laboratorio:

Temperatura del capilar: 195° C

Voltaje del capilar: 4 V

Flujo del gas envolvente (N₂): 80 (unidades arbitrarias)

Flujo del gas auxiliar (N₂): 20 (unidades arbitrarias)

Gas de colisión: He

Detección: modo positivo, intervalo de masas: $120 \leq m/z \leq 1500$

Energía normalizada de colisión: 45%

El espectrómetro se programaba para realizar tres barridos consecutivos: uno del espectro total de masas (*full scan*), otro correspondiente al espectro total de masas generado tras la ruptura del ion mayoritario del primer barrido por aplicación de una energía de colisión relativa del 45% (MS²), y otro correspondiente al espectro de masas generado tras la ruptura del fragmento mayoritario obtenido en el MS², por aplicación de la misma energía de colisión relativa (MS³).

2.4.3 – ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ANTOCIANOS

La cuantificación de antocianos en las distintas variedades de fresa se llevó a cabo por HPLC-DAS, por comparación de las áreas de los picos cromatográficos de los distintos antocianos registrados a 520 nm con un patrón externo de Pg 3-gluc, previamente aislado del modo que se describe en el apartado 2.1 del Capítulo VI. Los extractos de fresa para el análisis se preparaban como se indica en el apartado 2.2 del presente capítulo y las condiciones de análisis cromatográfico utilizadas fueron las recogidas en el apartado 2.4.2.

La recta de calibrado se obtuvo por dilución de una disolución madre de Pg 3-gluc 10^{-3} M en agua ácida a pH 1,5 hasta 10^{-5} M de concentración. La ecuación obtenida y utilizada para la cuantificación fue la siguiente:

$$\text{Concentración Pg 3-gluc (mg/mL)} = 3,29\text{E}^{-9} * \text{área} - 1,57\text{E}^{-4}$$

$$\text{Coeficiente de regresión (R}^2\text{)} = 1$$

Para cada variedad de fresa se prepararon 3 extractos distintos por temporada de recolección. Cada extracto se diluyó convenientemente de forma que el área de los picos se encontrase dentro del intervalo de valores de la recta de calibrado.

2.5 – HIDRÓLISIS ÁCIDA

Se utilizó para establecer la naturaleza del aglucón y de los azúcares en algunos de los antocianos. El procedimiento empleado se basó en el indicado por Giusti y Wrolstad (1996): 0,5 mg de pigmento se disolvían en 3,5 mL de HCl 2N y la disolución se distribuía en 5 tubos de vidrio, que se purgaban con nitrógeno antes de cerrarlos con tapón de rosca; los tubos se introducían en un baño de agua a 100°C y eran retirados a tiempos diferentes - 2,5, 5, 10, 20 y 40 min – para ser inmediatamente enfriados en hielo picado y luego analizados por HPLC, para identificación de los productos de la hidrólisis.

La recogida de muestras a diferentes intervalos de tiempo permite detectar los intermediarios glicosilados formados en la hidrólisis parcial del glicósido original, hasta la liberación final del aglucón. A partir del perfil de glicósidos intermediarios producidos se puede eventualmente concluir acerca de la naturaleza y número de restos azúcar. Por ejemplo, una antocianidina-3-disacárido dará lugar a un 3-monosacárido como

único producto intermediario, mientras que un antociano con dos monosacáridos en posiciones 3 y 5 del aglucón liberará dos productos intermedios correspondientes respectivamente al 3- monosacárido y al 5-monosacárido; del mismo modo, un derivado 3-di-5-monosacárido daría lugar a cuatro especies intermediarias y así sucesivamente (Strack y Wray, 1989).

La identificación de los productos de la hidrólisis (aglucón y antocianos intermediarios) se realizó a partir de sus características espectroscópicas (espectros UV-Vis y de masas) y de elución. Para apoyar la misma se utilizó, asimismo, la comparación con patrones de algunos antocianos disponibles en el laboratorio, comerciales o previamente aislados y caracterizados, a partir de los cuales se obtuvieron por hidrólisis las antocianidinas mayoritarias de la fresa (Pg y Cy), lo que permitió establecer sus tiempos de retención y espectro de absorción en las condiciones cromatográficas utilizadas.

2.6 – IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES (GLC)

La identificación de algunos de los antocianos aislados fue completada con el reconocimiento de azúcares por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GLC-FID). Para ello, después de su hidrólisis ácida se sometían a derivatización para conversión a sus alditol-acetatos volátiles, según el método de Albersheim *et al.* (1967), con algunas modificaciones, siguiendo el protocolo se expone a continuación:

- A. *Hidrólisis.* Se llevó a cabo con TFA 2N. Se pesaban 0,5-1,0 mg de pigmento y se añadía 1 mL de TFA que contenía inositol ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), para ser usado como estándar interno. La mezcla se introducía en tubos con tapón de rosca, que se purgaban con helio antes de cerrarlos y luego se sometían a calentamiento en estufa a 120°C durante 90 min.
- B. *Remoción de los aglucones.* Ya en frío, se añadía acetato de etilo (1 mL) a cada tubo, inyectándolo con una pipeta de Pasteur en el seno de la muestra. Después de la separación de fases, se recogía la fase acuosa – que contenía los azúcares – y se volvía a lavar dos veces más con acetato de etilo, hasta que perdía el color. La fase acuosa libre del aglucón se llevaba a sequedad, por circulación controlada de aire (con compresor) a $40\text{-}45^{\circ}\text{C}$.

- C. *Reducción con borohidruro sódico.* Los azúcares neutros se reducían a sus derivados alditol añadiendo 0,5 mL de NH_4OH 1N que contenía NaBH_4 en proporción $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. El NH_4OH se utilizaba para garantizar que la reducción se realizara en medio alcalino. La reducción tenía lugar durante 1 h a temperatura ambiente, al cabo de la cual se añadía ácido acético glacial gota a gota hasta cesar la efervescencia, para conseguir que el medio quedara neutro. Las muestras se secaban bajo corriente de aire filtrado a $40\text{-}50^\circ\text{C}$ hasta obtener una consistencia de jarabe. Se añadía entonces 1 mL de MeOH y se continuaba la desecación con corriente de aire después de cada adición hasta conseguir muestras totalmente secas (5-7 veces).
- D. *Acetilación de las muestras.* A las muestras totalmente secas se añadían 40 μL de metilimidazol (como catalizador de la acetilación) y 200 μL de anhídrido acético, acetilando durante 15 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se incorporaban 2 mL de agua con el objeto de detener la acetilación y 1 mL de diclorometano. Se centrifugaba para eliminar el agua y la partición fase orgánica frente a agua se repetía 3 veces más con objeto de limpiar las muestras. Finalmente la fase orgánica se recogía y secaba completamente.

Una vez convertidos los azúcares en sus alditol-acetatos, las muestras se inyectaban disueltas en acetona en el cromatógrafo de gases. En el Capítulo III, apartado 1, se hizo ya referencia al sistema cromatográfico utilizado, en el cual se operó en las condiciones siguientes:

Gradiente de temperatura: constante 250°C

Temperatura del detector: 280°C

Temperatura del inyector: 260°C

Detector: ionización de llama (FID)

Gas portador: nitrógeno

Volumen inyectado: 2 μL

Bajo estas condiciones, mediante inyección de patrones de referencia, se pudo comprobar que los principales azúcares que pueden encontrarse formando parte de los antocianos eran bien separados y mostraban el siguiente orden de elución: ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa e inositol. Los azúcares de las muestras fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con los de los azúcares patrón.

3 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 – ANÁLISIS CUALITATIVO DE ANTOCIANOS EN FRESA

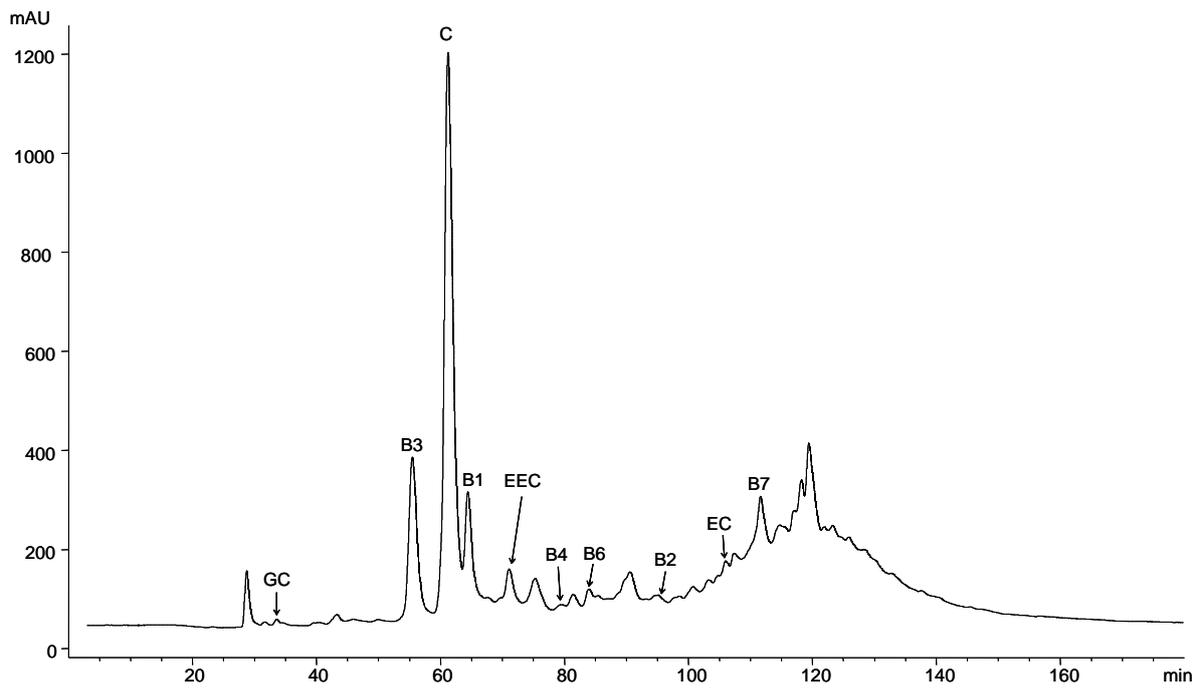
Las condiciones HPLC puestas a punto conseguían una resolución cromatográfica de los antocianos de fresa bastante satisfactoria, con la ventaja añadida de operar con un flujo bajo ($0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), compatible con las exigencias del detector de masas.

La figura IV.1 [(a), (b), (c), (d) y (e)] presenta los cromatogramas, registrados a 520 nm, con los perfiles antociánicos de las cinco variedades de fresa analizadas. La características de cada pico (tiempo de retención, máximos espectrales y principales señales en los espectros de masas) y la identidad asignada a los mismos se resumen en la tabla IV.1.

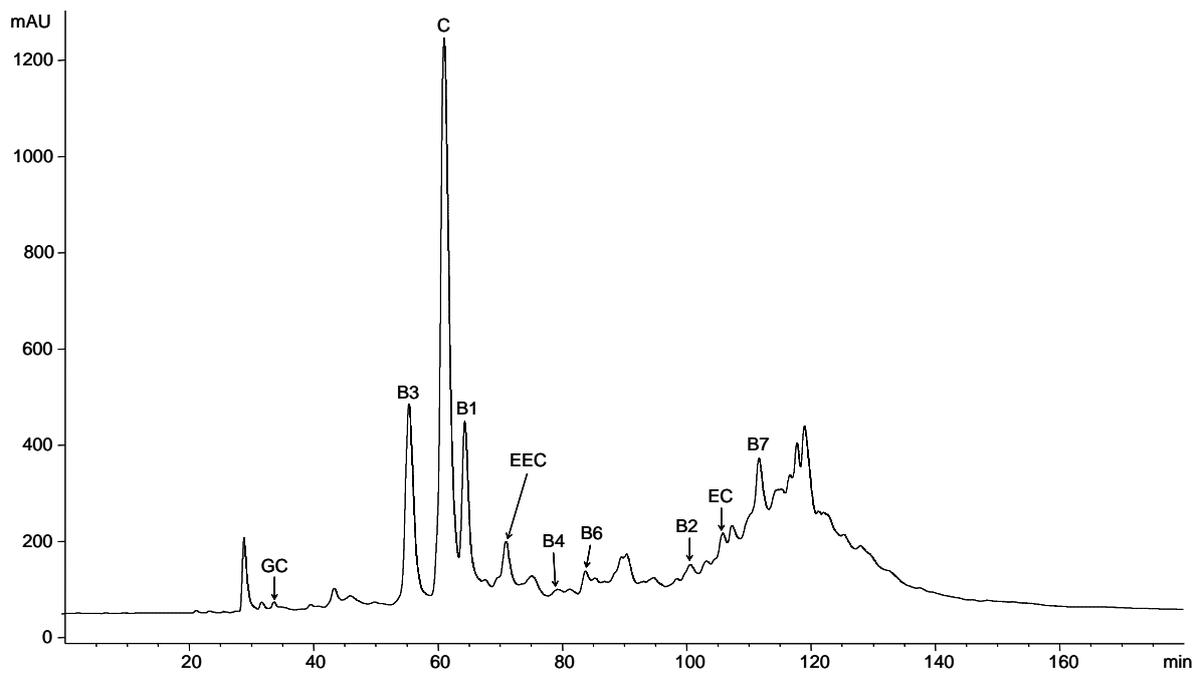
Los picos 5 y 10 fueron asignados a cianidina 3-glucósido y pelargonidina 3-glucósido, respectivamente, en base a su orden relativo de elución y espectro de absorción obtenido con el detector de diodos, comparados con los espectros de nuestra base de datos y los datos recogidos en la literatura (Hong y Wrolstad, 1990; Bakker *et al.*, 1994; Bridle y García-Viguera, 1997). Los análisis ESI-MS y MS-MS posteriores, apoyaron esta identificación (tabla IV.1). Igualmente la identidad de glucosa como azúcar sustituyente fue establecida inequívocamente por CLG-FID, tras aislamiento de los mismos por HPLC semipreparativa.

El pigmento 12 presentaba, en modo positivo, un ion molecular $[M^+]$ de m/z 579.0, con fragmentos MS-MS de m/z 271.3 (pelargonidina) y 432.9 (pérdida de un residuo de ramnosa). Este patrón de fragmentación era consistente con el indicado por Giusti *et al.* (1999) para antocianos 3-rutinósido. De manera general, la fragmentación MS-MS de los antocianos produce la separación de los enlaces glicosídicos entre la antocianidina y los azúcares directamente unidos a la misma; de este modo, un antociano 3,5-diglicosilado daría lugar junto al aglicón a los fragmentos correspondientes a los productos sustituidos en las posiciones 3 y 5, pero en el caso de que esos mismos azúcares se encontraran formando un oligosacárido en posición 3 del antociano se produciría sólo el fragmento correspondiente al aglicón. Sin embargo, según observaron Giusti *et al.* (1999), esto no ocurre así en el caso de los 3-rutinósidos, ya que el enlace 1-6 entre ramnosa y glucosa puede rotar libremente y es más

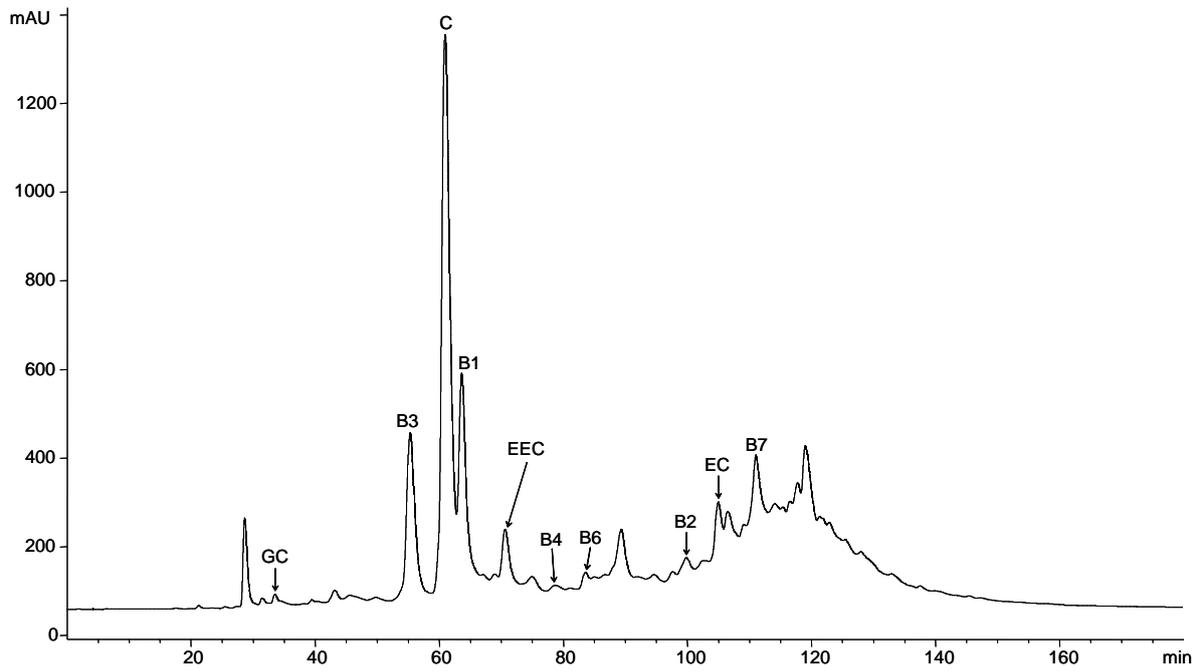
(a) *Camarosa*



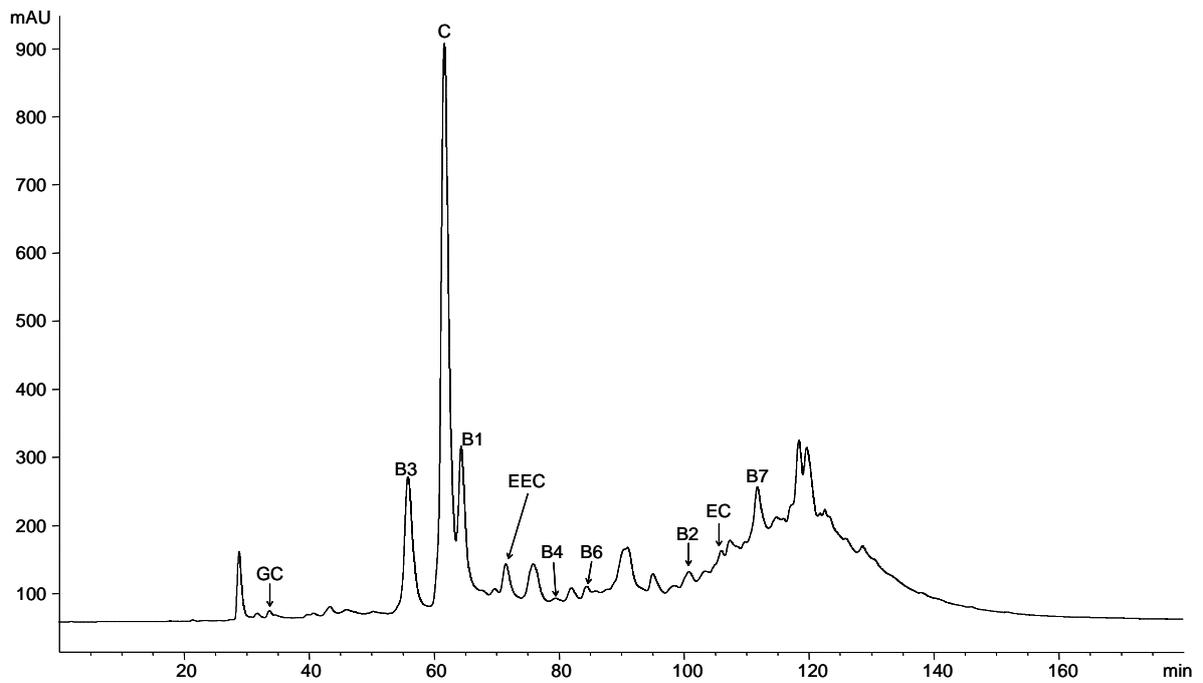
(b) *Carisma*



(c) *Eris*



(d) *Oso Grande*



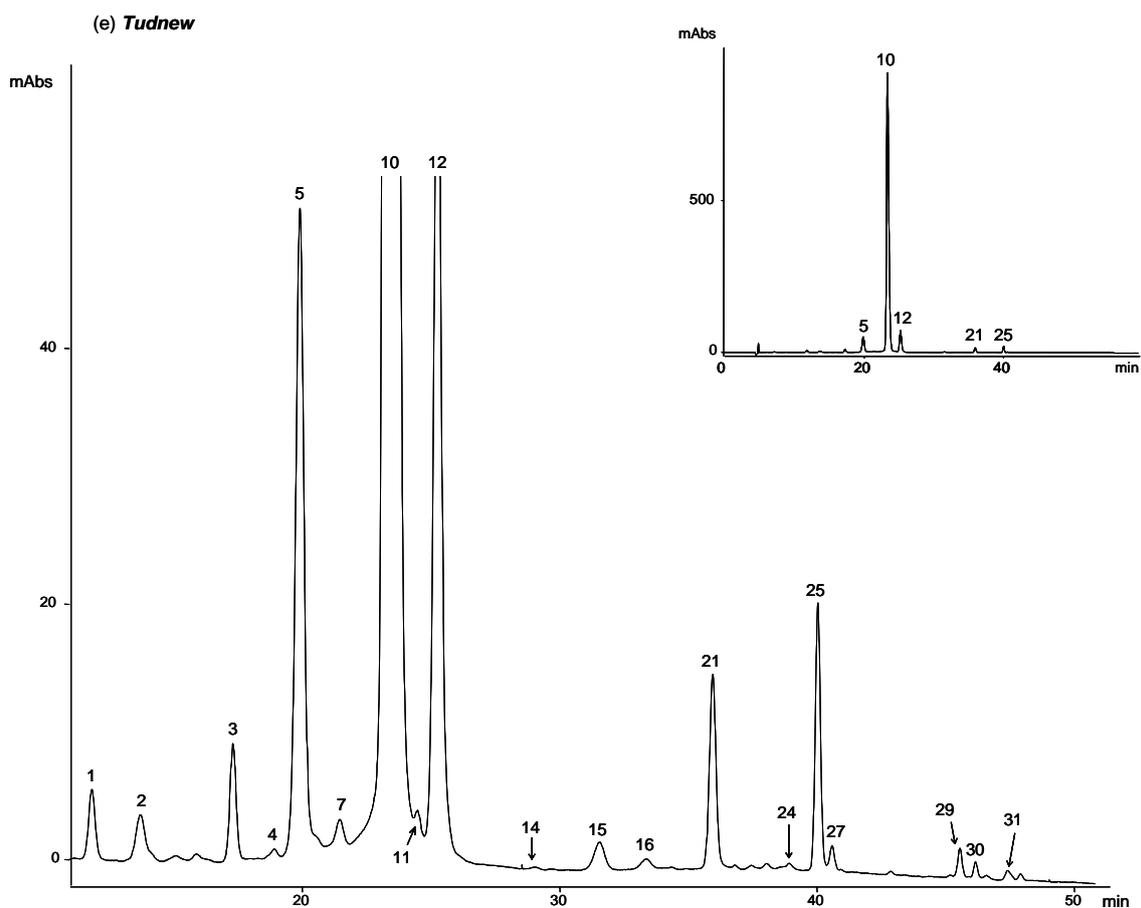


Figura IV.1 – Cromatogramas de HPLC registrados a 520 nm, relativos al perfil de antocianos de extractos de fresa de las variedades: (a) *Camarosa*; (b) *Carisma*; (c) *Eris*; (d) *Oso Grande* y (e) *Tudnew*. La figura presenta una ampliación del cromatograma para poder apreciar mejor los picos minoritarios; en la ventana pequeña de la parte superior derecha se muestra el cromatograma completo. La numeración de los picos es la misma en las cinco variedades y su identificación figura en la tabla IV.1.

sensible a la fragmentación que el de otros disacáridos, cuyos enlaces glicosídicos son más rígidos. De este modo, en la fragmentación de antocianidinas 3-rutinósido, en condiciones adecuadas, se observa la formación de los iones moleculares correspondientes a la pérdida sucesiva de los dos restos de azúcar: $[M^+ - 146]$ (pérdida de ramnosa) y $[M^+ - 146 - 162]$ (aglicón). En todo caso, a fin de obtener información adicional que pudiese confirmar esta identidad, el pigmento se aisló por HPLC semipreparativa y fue posteriormente sometido a hidrólisis ácida parcial. El análisis de los hidrolizados por HPLC mostró que a medida que se producía la desaparición del pico original emergían en los cromatogramas los picos del aglucón y del Pg 3-gluc, sin que en ningún momento de la hidrólisis se detectara la formación de otro producto adicional. Esto permitió descartar la posibilidad teórica de que los residuos de glucosa y de ramnosa pudieran estar localizados en distintas posiciones de la estructura de la antocianidina (es decir, dando lugar a un 3,5 ó 3,7-diglicósido), confirmando que ambos

azúcares se encontraban formando un disacárido. La identidad del pico 12 fue, por tanto, establecida como pelargonidina 3-rutinósido. Su ubicación en el cromatograma, inmediatamente después de Pg 3-gluc está de acuerdo con esta estructura (los rutinósidos eluyen después de sus correspondientes glucósidos). La identificación de Pg 3-rutinósido como uno de los antocianos mayoritarios de la fresa está, asimismo, en acuerdo con las observaciones hechas por otros autores (Hong y Wrolstad, 1990; Bakker *et al.*, 1994; Bridle y García-Viguera, 1997).

Algunos autores (Fiorini, 1995; Goiffon *et al.*, 1999) habían señalado la presencia de Pg 3-arabinósido como uno de los tres pigmentos mayoritarios de la fresa. En nuestro caso, esto no ha sido así en ninguna de las variedades estudiadas, aunque el pico 18, cuya área era sólo destacable en la variedad *Carisma*, poseía una masa correspondiente a pentósido de pelargonidina (m/z 403). Este pico no se pudo aislar en cantidad suficiente para la identificación del azúcar por cromatografía de gases, aunque teniendo en cuenta la identificación realizada por los autores anteriores se ha asignado tentativamente a Pg 3-arabinósido.

A partir de los espectros de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$ en la región del visible) que se pudieron registrar de forma aceptable, se pudo establecer que la mayoría de los restantes antocianos minoritarios de la fresa derivaban de pelargonidina y cianidina. Con relación a la $\lambda_{\text{máx}}$ hay que indicar que a medida que aumenta el tiempo de retención de los antocianos en los cromatogramas se observaba un cierto desplazamiento de la misma en la región del visible, explicable por el incremento en el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil, circunstancia que ya había sido denotada por Hebrero *et al.* (1988). Por otra parte, el espectro de pelargonidina es fácilmente identificable por la presencia del máximo adicional en torno a 430 nm. Los resultados del análisis por espectrometría de masas permitieron confirmar la identidad del aglucón y también establecer la misma en los picos para los cuales no había podido obtenerse un buen espectro UV-Vis; ello permitió también detectar la presencia de algunos antocianos minoritarios derivados de delphinidina (picos 20 y 26) y de malvidina (picos 11 y 15).

Con el fin de obtener información adicional sobre los pigmentos minoritarios, el extracto bruto fue fraccionado por CC, recogándose tres fracciones más simples y concentradas en antocianos, que permitieron así un mejor análisis por HPLC-DAS-MS. En la primera fracción – fracción A (20-40% etanol) – se encontraban los pigmentos 6, 7, 9 y 12; en la segunda – fracción B (hasta 80% de etanol) – eluyeron los pigmentos 5, 14 y 25; y en la tercera – fracción C (80-95% etanol) – los pigmentos 16 y 17. El

antociano mayoritario, Pg 3-glucósido, estaba presente en las tres fracciones, aunque alcanzara mayor concentración en la fracción B. Los restantes antocianos (1-5, 8, 10, 15, 18-24, 26-31) no pudieron ser recuperados en cantidad relevante en ninguna de las fracciones, por lo que su identidad se concluyó básicamente a partir de los datos obtenidos del análisis de los cromatogramas de los extractos completos.

Los pigmentos 6 y 7 mostraron idéntico ion molecular de m/z 595, pero sus patrones de fragmentación fueron distintos, pudiendo comprobarse que derivaban, respectivamente, de pelargonidina y de cianidina (figura IV.2), lo que fue corroborado por sus espectros UV-visible (tabla IV.1). El pigmento 7 fue asignado a cianidina 3-rutinósido de acuerdo con su patrón de ruptura (figura IV.2a), consistente con el indicado por Giusti *et al.* (1999) para antocianos 3-rutinósido, al dar lugar a un fragmento de m/z 449 (pérdida del resto ramnosa) y otro correspondiente al aglucón (m/z 287). Esta identidad es también coherente con su localización en el cromatograma y con la proporción que mantiene con relación a cianidina 3-glucósido (pico 5), similar a la registrada entre pelargonidina 3-rutinósido (pico 12) y pelargonidina 3-glucósido (pico 10).

El espectro MS-MS del pigmento 6 (figura IV.2b) indicaba que correspondía a un derivado de pelargonidina con dos sustituyentes hexosa. La detección de un fragmento de m/z 433 (pérdida de una glucosa) sugiere que cada uno de los azúcares se encuentra como tal monosacárido sobre posiciones distintas en la estructura de la antocianidina; en el caso de que las dos hexosas estuviesen formando parte de un disacárido en posición 3 de la Pg, se habría encontrado un único pico correspondiente al aglucón después de la fragmentación MS-MS (Giusti *et al.*, 1999). Su mayor polaridad con relación a pelargonidina 3-glucósido también apoya esta naturaleza diglicosídica, así como algunas diferencias observadas en su espectro UV-visible cuando es comparado con el de derivados de pelargonidina con sustitución en C3 (figura IV.3). Una, es la ausencia del doble pico achatado a 270-280 nm, y la otra es la existencia de un hombro en lugar de un pico definido a 330 nm. De acuerdo con Bakker *et al.* (1994), ambas características serían típicas de un diglucósido. Así, el compuesto se ha asignado tentativamente a pelargonidina 3,5-diglucósido, aunque tampoco puede descartarse que se trate de pelargonidina 3,7-diglucósido o que uno o los dos de los restos hexosa puedan ser diferentes a glucosa.

El espectro UV-visible del pigmento 14 era similar al de Pg 3-gluc, pero poseía una absorbancia aumentada a 280 nm (figura IV.4). Su espectro MS reveló un ion molecular de m/z 549, que podría coincidir con un derivado de pelargonidina 3-

glucósido acilado con ácido málico. Una masa molecular idéntica había sido obtenida por Bakker *et al.* (1994) para un antociano aislado de fresas e identificado provisionalmente como cianidina 3-succinilglucósido. Esta identificación está totalmente

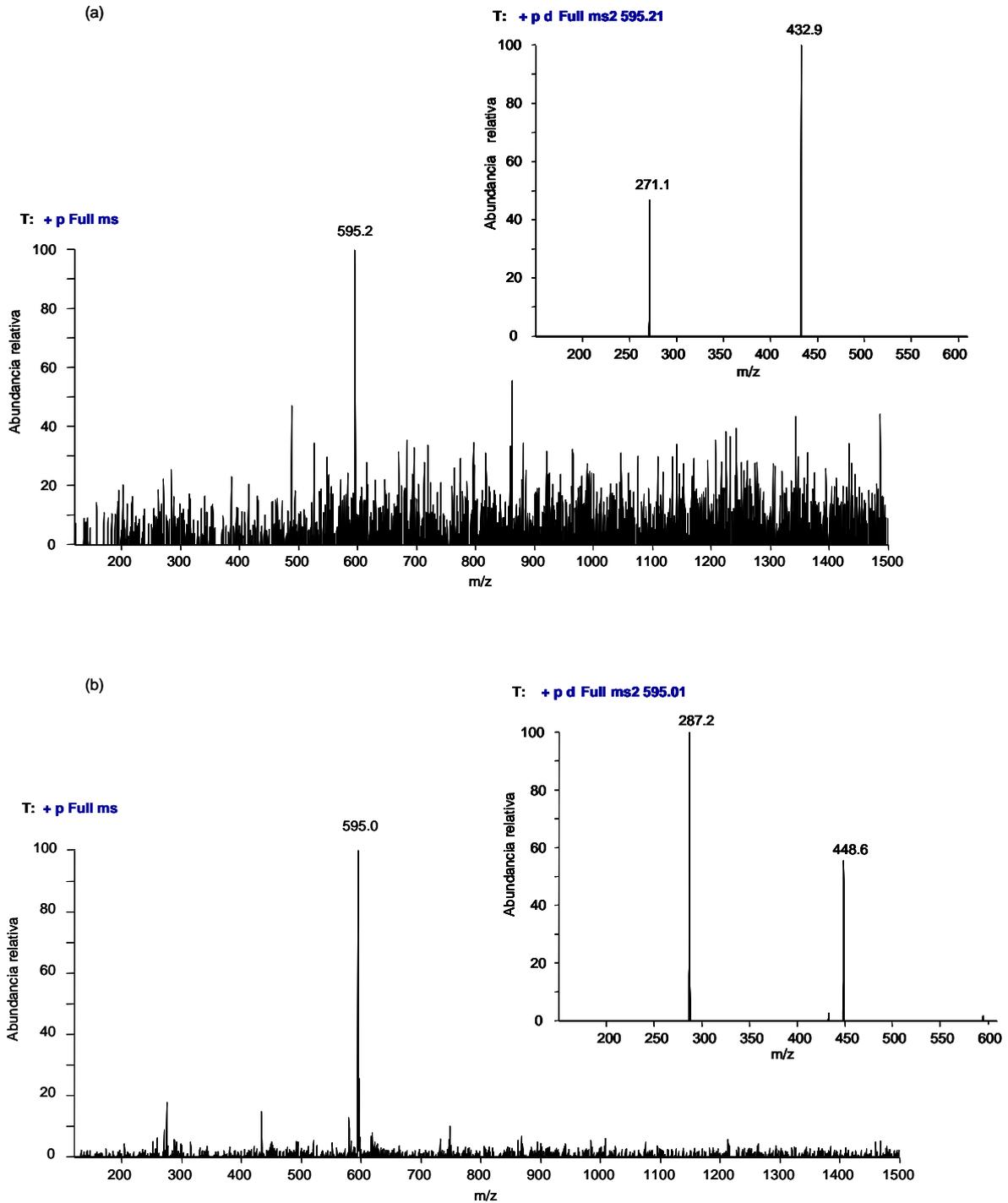


Figura IV.2 – Espectros de masas (MS) y MS-MS obtenidos en modo positivo para: (a) el pico 6, asignado a pelargonidina 3,5-diglucósido, y (b) pico 7, asignado a cianidina 3-rutinósido.

descartada en nuestro caso, dado que la masa y el espectro de absorción del pigmento lo asignan claramente como un derivado de pelargonidina. De acuerdo con Giusti *et al.* (1999), los antocianos acilados sustituidos en C3 dan lugar en su fragmentación MS-MS a un único fragmento correspondiente al aglucón, aspecto encontrado para el pico 14. Por otra parte, es también conocido que los derivados acilados tienen una pérdida de polaridad con relación a sus correspondientes no acilados lo que hace que eluyan a mayores tiempos de retención. Todas estas características estarían de acuerdo con la identidad que se ha asignado tentativamente al pico 14 como pelargonidina 3-malilglucósido. La presencia del resto de ácido málico también podría explicar el incremento en la absorbancia a 280 nm comparada con la de Pg 3-glucósido. La existencia de este antociano en la naturaleza está descrita por Mazza y Miniati (1993), pero de acuerdo con nuestros datos, es la primera vez que se detecta en fresa. Argumentos similares a los usados para establecer la identidad del pico 14 fueron también aplicados para la identificación del pigmento 25, cuyas características de elución y espectros de absorción y de masas (Tabla IV.1) son coherentes con pelargonidina 3-acetilglucósido. Este compuesto ya había sido tentativamente identificado en fresas por Hong y Wrolstad (1990b).

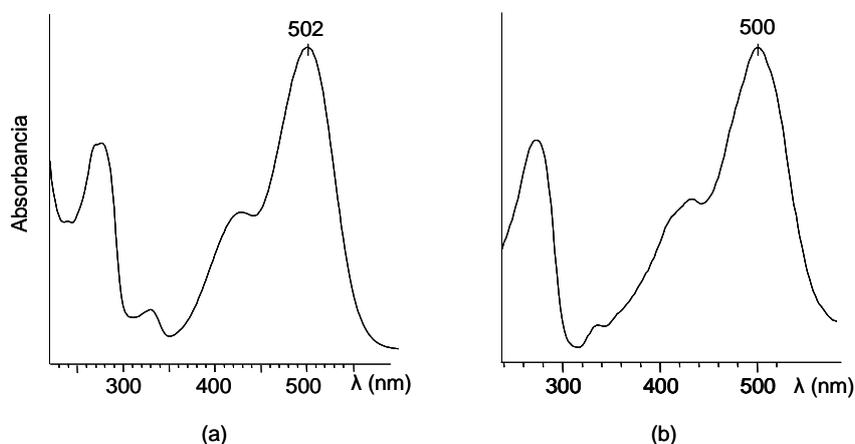
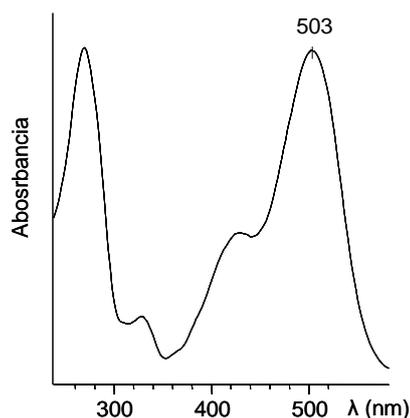


Figura IV.3 – Espectros UV-visible de: (a) pico 10, asignado a pelargonidina 3-glucósido, y (b) pico 6, asignado a pelargonidina 3,5- diglucósido.

Figura IV.4 – Espectro UV-visible del pico 14, asignado a pelargonidina 3-malilglucósido.



Los pigmentos 16 y 17 presentaron idénticos iones moleculares con m/z 607 y ambos liberaban en sus espectros MS-MS un único fragmento, correspondiente al aglicón (Tabla IV.1), lo que apunta a antocianos sustituidos en C3. Una posibilidad que encaja con su masa molecular es que se trate de derivados de sustitución de pelargonidina con un disacárido hexosa+pentosa acilado con ácido acético. La detección de dos compuestos puede ser explicada por la presencia de diferentes azúcares sustituyentes o, más probablemente, por la existencia de un enlace distinto entre los residuos de pentosa y de hexosa en cada uno de los pigmentos. La existencia de pelargonidina 3-sambubiósido (esto es, *O*- α -L-xilosil-(1 \rightarrow 2)-glucósido), de otro 3-xilosilglucósido no caracterizado y de 3-glucosilxilósido ha sido descrita en diversos frutos (Mazza y Miniati, 1993; Strack y Wray, 1994; Hrazdina, 1982; Harborne y Grayer, 1988). Los datos disponibles no nos permiten optar por alguno de estos disacáridos en concreto, ninguno de los cuales ha sido citado en fresas, según nuestros conocimientos, ni se han reportado derivados acilados de los mismos con ácido acético.

El pigmento 9 era detectado en los extractos de fresa como un hombro sobre la base del pico de Pg 3-glucósido, aunque pudo obtenerse como un pico definido en los cromatogramas de la fracción A, con calidad suficiente para registrar su espectro de absorción (figura IV.5) y de masas, que lo asignan claramente como un derivado de cianidina. El ion molecular obtenido (m/z 697) encaja con el de un derivado dihexósido de cianidina acilado con ácido malónico, lo que también está de acuerdo con los fragmentos observados en el espectro MS-MS (figura IV.6), los cuales podrían corresponder a cianidina malonilhexósido (m/z 535), cianidina hexósido (m/z 449) y cianidina (m/z 287). Conforme a este patrón de fragmentación, los restos de hexosas deberían estar ubicados en distintas posiciones en la estructura de la antocianidina, lo que hace que se haya provisionalmente asignado como cianidina 3-malonilglucósido-5-glucosa. Si esta identificación se confirma, también se podría esperar que existiese en la fresa el correspondiente precursor no acilado: cianidina 3,5-diglucósido. Este diglucósido debería eluir a un tiempo de retención más corto que cianidina 3-glucósido y, por lo tanto, puede corresponder a alguno de los picos muy pequeños que se aprecian en los cromatogramas en torno a los 14-18 min, acerca de los cuales no se pudo obtener ninguna información fiable sobre espectros de absorción o de masas. Tampoco se ha encontrado referencia en la literatura sobre existencia de una cianidina malonildiglucósido ni en fresas ni en otras plantas.

El pico 25 presentaba un ion molecular de m/z 475, que rompe en MS^2 exclusivamente a un fragmento m/z 271. Se trata, por tanto, un derivado de pelargonidina, lo que también se confirmó por su espectro de absorción en el visible. Su masa y ubicación retrasada en el cromatograma, junto a otros antocianos acilados, apoyan que podría corresponder a Pg 3-acetilglucósido, cuya presencia en fresa había ya sido propuesta por Hong y Wrolstad (1990) basándose en el espectro UV-Vis y características de elución.

Figura IV.5 – Espectro UV-visible del pico 9, asociado a Cy 3-malonilglucósido-5-glucosa.

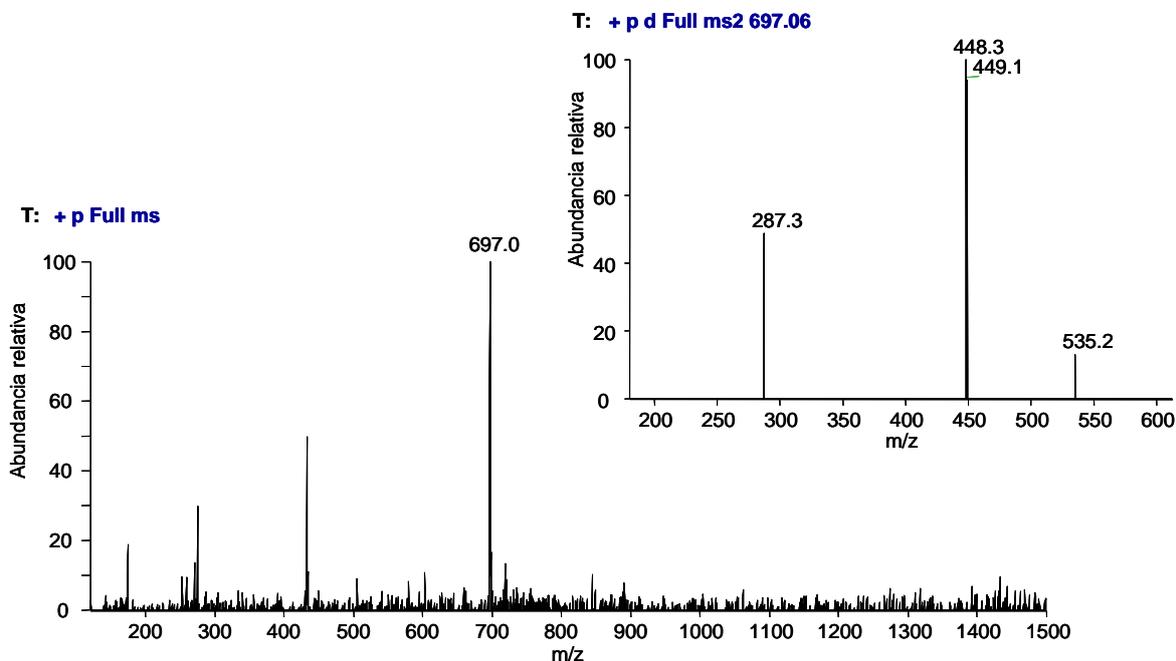
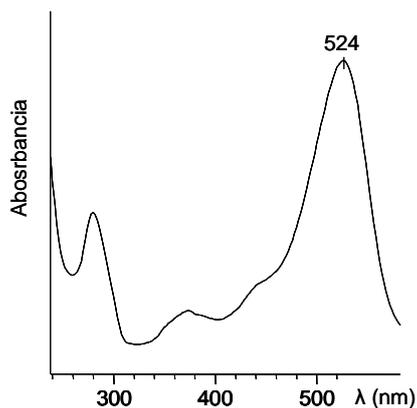


Figura IV.6 – Espectros de masas (*full scan* y *MS-MS*) obtenidos en modo positivo para el pico 9.

Un aspecto particularmente interesante fue la detección en los cromatogramas de diversos pigmentos (picos 1, 2, 3 y 4) con espectros UV-visible que recordaban al de

pelargonidina en cuanto al máximo a 430 nm, pero con $\lambda_{\text{máx}}$ a longitudes de onda más elevadas (515-518 nm, figura IV.8) y cuyos espectros de masas (iones moleculares y patrones de fragmentación) de estos picos resultaban coherentes con dímeros de condensación directa flavanol-antociano. La presencia de pigmentos de este tipo en vinos tintos había sido sugerida por Somers (1971), siendo detectados por primera vez por espectrometría de masas por Vivar-Quintana *et al.* (1999) y su estructura recientemente confirmada (Remy-Tanneau *et al.*, 2003; Salas *et al.*, 2004; Andersen *et al.*, 2004). En el caso del vino, se trataría de compuestos formados durante el proceso de vinificación y/o envejecimiento, como resultado de la reacción entre un carbocatión procedente de la despolimerización de una proantocianidina y un antociano, para dar lugar a un derivado de estructura flavanol-(4→8)-antociano, en el cual el antociano se encontraría en forma flavilio. De confirmarse que se trata de este tipo de pigmentos se debe asumir que los mismos se encuentran también de forma natural en vegetales y no sólo se forman como consecuencia del procesado. Esto se encuentra apoyado por la reciente detección en nuestro laboratorio de la presencia de pigmento similares en cuanto a masa y espectro de absorción en diversas variedades de alubias y también en maíz morado.

El pico 1 presentaba un ion molecular de m/z 721, cuyo patrón de fragmentación estaba caracterizado por la liberación de dos fragmentos de m/z 559 y 407 (figura IV.7), que se atribuyen a la pérdida de una molécula de glucosa y de un fragmento de 152 unidades, correspondiente a la ruptura retro Diels-Alder (RDA) de una unidad catequina; ese tipo de ruptura es característica de los flavanoles y en el caso de los oligómeros suele tener lugar, preferentemente, sobre la unidad superior (de Pascual-Teresa *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2000), lo que avalaría la existencia de la catequina en esa posición. Este mismo patrón de fragmentación se observaba para los picos 2, 3 y 4; como ejemplo, en la figura IV.10 se recogen los espectros de masas y de fragmentación del pico 4.

De acuerdo con el conjunto de observaciones realizadas, se ha asignado provisionalmente a estos pigmentos una estructura de tipo flavanol-(4→8)-antociano, como se propone en la figura IV.9. El hecho de que los picos 1 y 2 presenten la misma masa nos lleva a sugerir que puede tratarse de compuestos similares que difieren en el resto flavanol, que podría ser respectivamente catequina (C -2R, 3S-) y epicatequina (EC -2R, 3R-), teniendo en cuenta sus características de retención cromatográfica

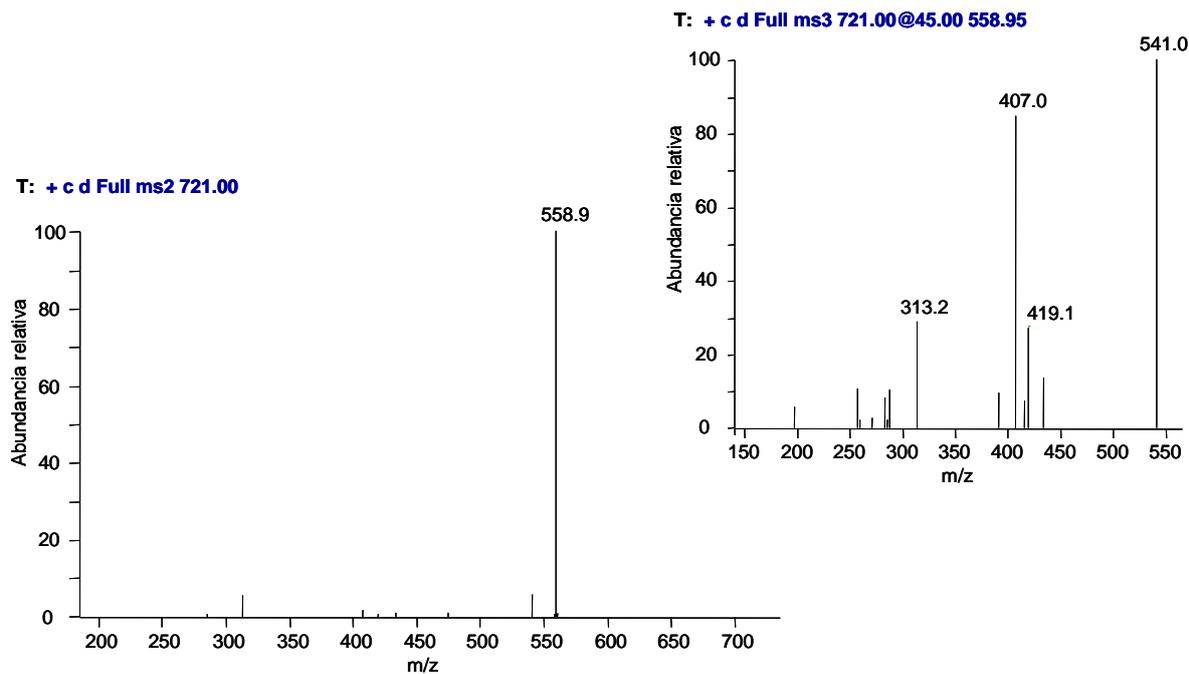


Figura IV.7 – Espectros de masas (MS-MS y MS³) obtenidos en modo positivo para el pico 1, tentativamente identificado como un dímero catequina-Pg 3-glucósido (estructura en figura IV.9).

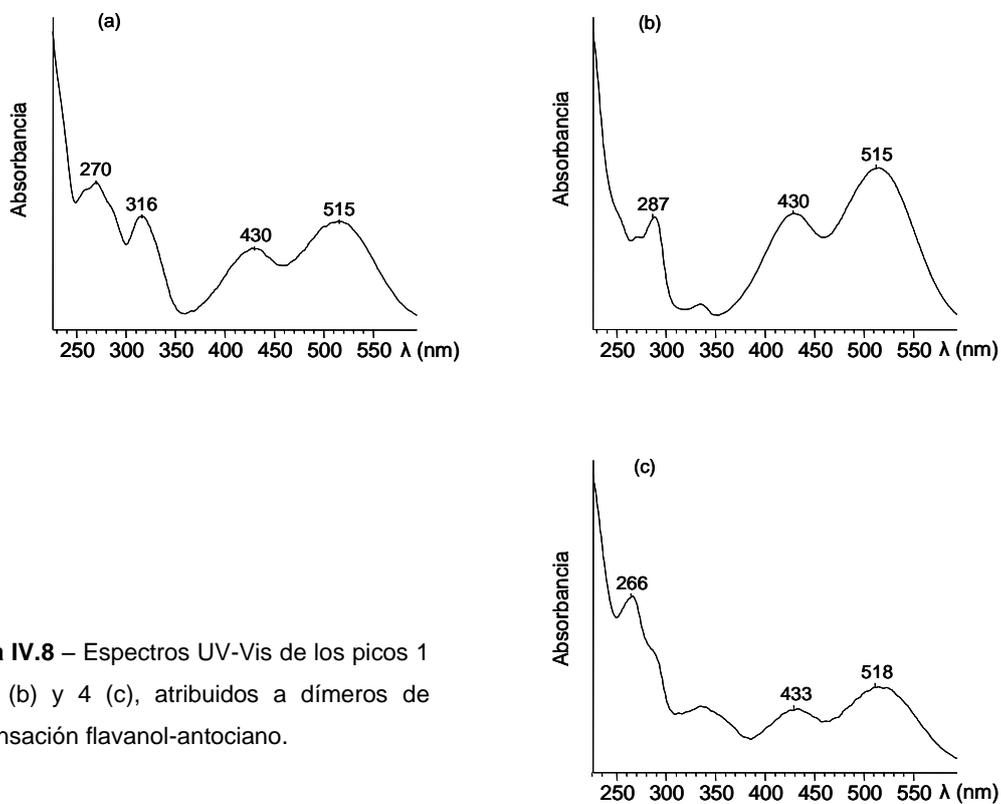
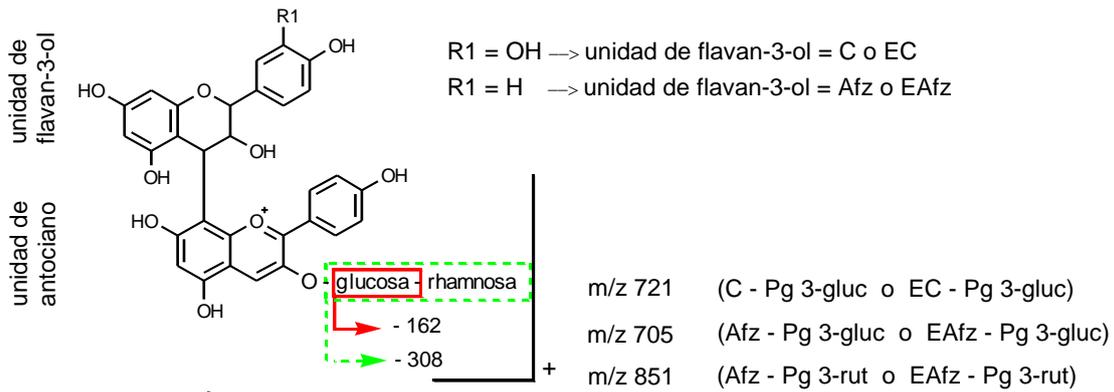
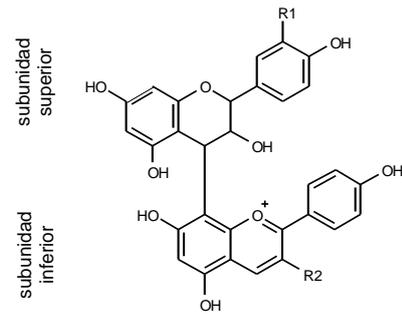
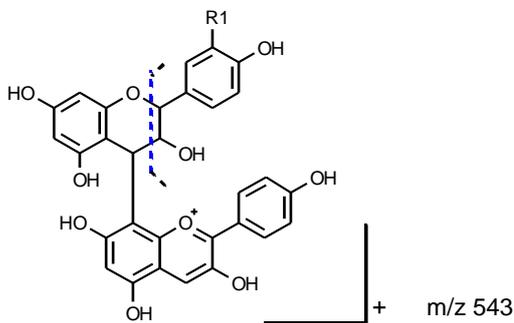


Figura IV.8 – Espectros UV-Vis de los picos 1 (a), 3 (b) y 4 (c), atribuidos a dímeros de condensación flavanol-antociano.

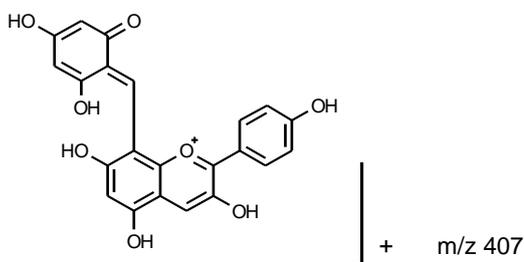
Dímero	Patrón de sustitución*	
	R1	R2
C – Pg 3-gluc	OH	O-glucosa
EC – Pg 3-gluc	OH	O-glucosa
Afz – Pg 3-gluc	H	O-glucosa
Afz – Pg 3-rut	H	O-rutinoso



pérdida del residuo de azúcar



fisión RetroDiels-Alder
en C o EC → -152
Afz o EAfz → -136



pérdida del anillo B de la unidad de antociano

m/z 313

Figura IV.9 – Propuestas para las estructuras de los picos 1 a 4 y respectivos mecanismos de fragmentación en MS.

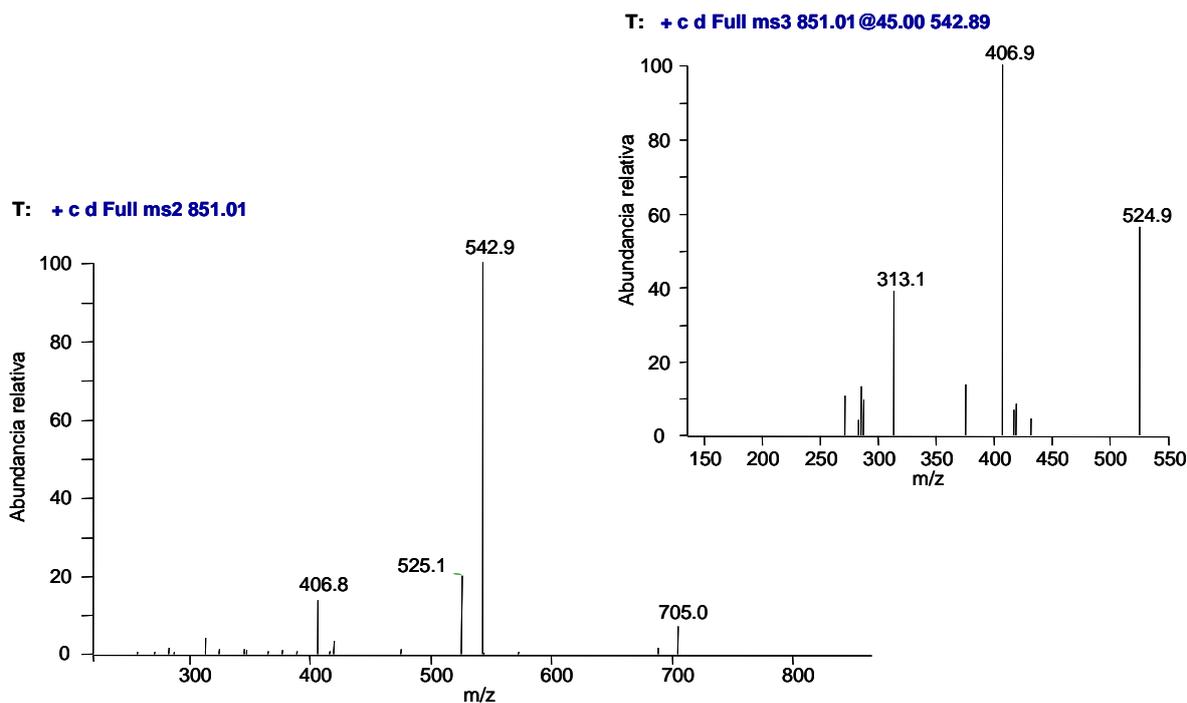


Figura IV.10 – Espectros de masas (MS-MS y MS³) obtenidos en modo positivo para el pico 4, tentativamente identificado como un dímero (epi)afzelequina-Pg 3-rutinósido.

(C eluye antes que EC en fases reversas C18). Los pigmentos 3 y 4 tendrían (epi)afzelequina como resto flavanol y diferirían también en cuanto al antociano, que sería Pg 3-glucósido y Pg 3-rutinósido respectivamente. El orden de elución que mantienen entre ellos es también consistente con esta posible identidad, ya que (epi)afzelequina debe ser menos polar que (epi)catequina, lo que explica el tiempo de retención más alto del pico 3 con respecto a 1 y 2, y Pg 3-rut también eluye después de Pg 3-gluc (pico 3 < pico 4). Se debe indicar que una vez concluida la redacción de esta memoria, ha aparecido una publicación de Fossen *et al.* (2004) confirmando la identificación de este tipo de pigmentos en fresas por RMN mono y bidimensional. Los pigmentos identificados por Fossen y colaboradores son catequina-Pg 3-glucósido, epicatequina-Pg 3-glucósido, afzelequina-Pg 3-glucósido, y epiafzelequina-Pg 3-glucósido, aunque no se indica nada acerca del (epi)afzelequina-Pg 3-rutinósido detectado por nosotros.

La calidad de los espectros de absorción y/o de masas de los restantes picos observados en los cromatogramas de las distintas variedades de fresas eran sólo suficientes para asignarlos como derivados de pelargonidina (pico 13 con $\lambda_{\text{máx}}$ a 502 nm y pico 22 con fragmento MS² de m/z 271), de cianidina (picos 24 y 28, con fragmentos MS² de m/z 287), de delphinidina (picos 20 y 26, con fragmentos MS² de m/z 303) y de malvidina (picos 11 y 15, con fragmentos MS² de m/z 331). Según nuestros

conocimientos la posible presencia en fresa de derivados de malvidina es puesta de manifiesto aquí por primera vez, mientras que la delphinidina ha sido recientemente mencionada por Franke *et al.* (2004) como una de las antocianidinas que constituirían los antocianos de la fresa. Por otra parte, de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, aparentemente, no existen en la fresa antocianos acilados con ácidos hidroxicinámicos (p.ej., ácidos cafeico, cumárico, ferúlico o sinápico), pues no se han detectado en los espectros de absorción la existencia de hombros o máximos en torno a 310-330 nm, característicos de este tipo de derivados.

De modo general, entre las cinco variedades analizadas se han podido detectar 31 antocianos como picos definidos en los cromatogramas de los que 19 era derivados de pelargonidina, 8 de cianidina, 2 de delphinidina y 2 de malvidina, lo que revela el predominio de la primera antocianidina en la fresa. En todos los extractos obtenidos, independientemente de la variedad, los pigmentos cuantitativamente más importantes eran siempre los mismos, con Pg 3-gluc como antociano ampliamente mayoritario, seguido de Pg 3-rut y de Cy 3-glu. Este orden de importancia cambiaba en la variedad *Eris*, en donde Cy 3-glu aparecía como el segundo pigmento con mayor expresión cuantitativa en vez de Pg 3-rut. Existían, sin embargo, diferencias entre variedades con respecto a la proporción entre estos 3 pigmentos (ver apartado siguiente), así como en cuanto a la diversidad y tipos de antocianos minoritarios. Así, la variedad *Carisma* era la que presentaba menor número de antocianos, mientras que *Camrosa* y *Tudnew* poseían la variedad más amplia. De hecho, la identificación de antocianos presentada en la tabla IV.1 se ha conseguido fundamentalmente a partir de los extractos de estas dos últimas variedades.

No se ha detectado en ninguno de los extractos la presencia del pigmento recientemente descrito en extractos de fresa: 5-carboxipiranopelargonidina 3-O- β -glucopiranósido (Andersen *et al.*, 2004). Este compuesto presenta un anillo piránico adicional entre las posiciones C4 e hidroxilo en C5 de Pg 3-gluc y posee una estructura similar a la de los pigmentos de tipo piranoantociano que se forman en vinos tintos, a los que se atribuyen parte de los cambios de color observados durante su maduración y el envejecimiento.

Tabla IV.1 – Tiempo de retención en las condiciones de análisis cromatográfico utilizadas, longitud de onda de máxima absorción en el visible ($\lambda_{\text{máx}}$) establecida con el detector de fotiodos, ion molecular, patrón de fragmentación e identidad asignada a los antocianos detectados en los extractos de fresa.

Pico	t. r. (min.)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ion molecular [M ⁺] (m/z)	MS ² de [M ⁺] (m/z)	Identidad probable*
1	12.3	515	721	559; 407; 313	Catequina-(4→8)-Pg 3-glucósido
2	14.0		721	559; 407; 313	Epicatequina-(4→8)-Pg 3-glucósido
3	17.7	515	705	543; 407; 313	Afzelequina-(4→8)-Pg 3-glucósido
4	19.3	518	851	543; 407	Afzelequina-(4→8)-Pg 3-rutinósido
5	20.3	515	449	287	Cy 3-glucósido
6	21.5	500	595	433; 271	Pg 3,5-diglucósido
7	21.8	515	595	449; 287	Cy 3-rutinósido
8	22.6		433	271	Pg-hexósido
9	23.0	524	697	535; 449; 287	Cy 3-malonilglucósido-5-glucosa
10	23.8	502	433	271	Pg 3-glucósido
11	24.8		422	331	derivado de Mv
12	25.5	503	579	433; 271	Pg 3-rutinósido
13	26.1	502	n.d.		derivado de Pg
14	29.3	503	549	271	Pg 3-malilglucósido
15	31.6		422	331	derivado de Mv
16	32.6	503	607	271	Pg-disacárido (hexosa+pentosa) + ácido acético
17	32.9	503	607	271	Pg-disacárido (hexosa+pentosa) + ácido acético
18	33.3		403	271	Pg –pentósido (Pg 3-arabinósido?)
19	33.5		535	287; 517	Cy 3-malonilglucósido
20	34.5		479	303	derivado de Dp
21	35.5	504	519	271	Pg 3-malonilglucósido
22	37.7	504	563	271	derivado de Pg
23	38.4		449	287; 384	Cy-hexósido
24	39.7		463	287	derivado de Cy
25	39.9	504	475	271	Pg 3-acetilglucósido
26	40.4		493	303; 427	derivado de Dp
27	40.6		533	271; 433	Pg 3-succinilglucósido
28	44.7		477	287	derivado de Cy (¿Cy dimetilglucósido?)
29	45.3	508	503	271	Pg 3-succinilpentósido o Pg 3-malonilramnósido
30	46.2		549	287; 329; 339; 531	Cy 3-succinilglucósido o Cy 3-malilramnósido
31	47.1		517	271	Pg 3-diacetilglucósido o Pg 3-succinilramnósido

* Pg pelargonidina, Cy cianidina, Dp delfinidina, Mv malvidina, n.d. no disponible.

3.2 – ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ANTOCIANOS EN FRESA

La cuantificación de antocianos se realizó por integración de los picos cromatográficos registrados a 520 nm y comparación con un patrón externo de Pg 3-gluc. Para la determinación del contenido total de antocianos se tuvo en cuenta la suma del total de áreas de todos los picos detectados en un cromatograma, aunque de manera individual se han cuantificado sólo los tres antocianos mayoritarios, cuyos picos eran los únicos apenas perceptibles en los cromatogramas cuando se observaba la representación cromatográfica íntegra (figura IV.1). Sólo en la variedad *Tudnew* (figura IV.1e) destacaban ligeramente los picos de dos de los antocianos minoritarios: 21 y 25, correspondientes respectivamente a Pg 3-malonilglucósido y a Pg 3-acetilglucósido, cuyas áreas constituían aproximadamente el 0,15% y 0,2% de las áreas totales registradas, respectivamente. En general, el Pg 3-acetilglucósido era el cuarto antociano en importancia en la mayoría de los extractos analizados. La tabla IV.2 recoge los contenidos determinados para los tres antocianos mayoritarios y el contenido antociánico total en las cinco variedades para las dos cosechas analizadas.

Tabla IV.2 – Contenidos en antocianos en las variedades de fresa estudiadas en las temporadas 2001 y 2002. Los resultados (media \pm desviación estándar, d.e.; n = 3) se expresan como mg Pg 3-gluc.kg⁻¹ fresa congelada. Entre paréntesis se indica el porcentaje de contribución del antociano al contenido total.

	Cy 3-glucósido	Pg 3-glucósido	Pg 3-rutinósido	Antocianos Totales
2001				
<i>Camarosa</i>	22 \pm 6 (6,5%)	261 \pm 36 (77,1%)	43 \pm 7 (12,6%)	339 \pm 43
<i>Carisma</i>	8 \pm 2 (2,9%)	242 \pm 49 (88,3%)	15 \pm 5 (5,5%)	275 \pm 56
<i>Eris</i>	23 \pm 7 (10%)	185 \pm 66 (80%)	13 \pm 5 (5,6%)	231 \pm 81
<i>Oso Grande</i>	20 \pm 2 (5,7%)	289 \pm 34 (82,3%)	29 \pm 2 (8,2%)	351 \pm 38
<i>Tudnew</i>	20 \pm 7 (3,7%)	468 \pm 124 (85%)	33 \pm 13 (6,1%)	547 \pm 146
2002				
<i>Camarosa</i>	41 \pm 11 (8,2%)	384 \pm 88 (78,7%)	55 \pm 9 (11,4%)	479 \pm 109
<i>Carisma</i>	12 \pm 4 (3,4%)	314 \pm 112 (88,7%)	24 \pm 4 (7,3%)	352 \pm 120
<i>Eris</i>	21 \pm 4 (10,4%)	163 \pm 22 (81,5%)	14 \pm 3 (7,2%)	200 \pm 29
<i>Oso Grande</i>	10 \pm 1 (5,2%)	162 \pm 6 (84,5%)	16 \pm 2 (8,2%)	192 \pm 5
<i>Tudnew</i>	26 \pm 4 (5,6%)	401 \pm 47 (85,8%)	31 \pm 1 (6,7%)	468 \pm 53

Pg 3-gluc es el pigmento ampliamente mayoritario en las cinco variedades de fresas analizadas, representando entre el 77 y el 90% del total de antocianos; Pg 3-rut constituye el 6-14% y Cy 3-gluc el 3-10%. Estos tres compuestos aportan en conjunto más de 95% de la composición antociánica de las fresas. Porcentajes de Cy 3-gluc (4-11%) y Pg 3-gluc (89-95%) del mismo orden fueron señalados por Goiffon *et al.* (1999) en un estudio realizado sobre cinco variedades de fresa

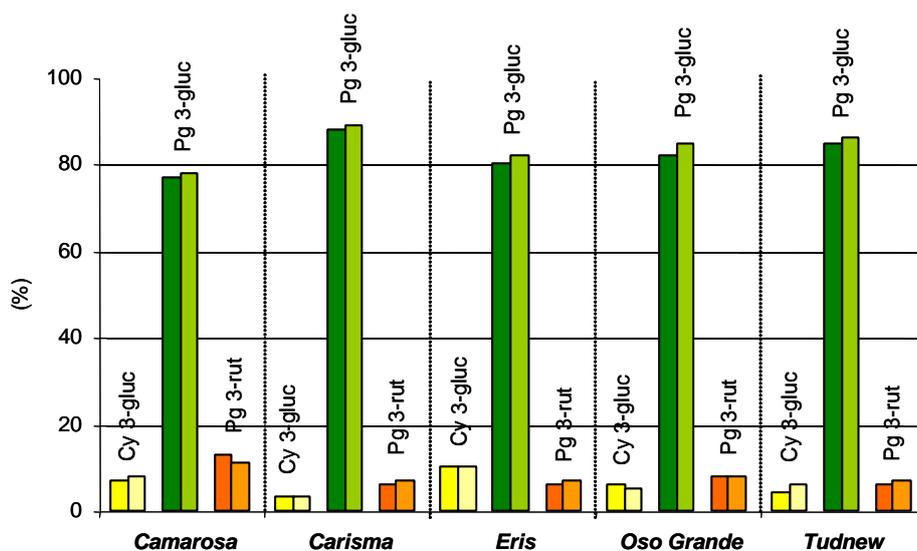


Figura IV.11 - Porcentajes de los tres antocianos mayoritarios en las cinco variedades de fresa analizadas en las cosechas de 2001 (barra izquierda) y 2002 (barra derecha).

Desde un punto de vista cualitativo, las proporciones entre los tres antocianos mayoritarios se mantienen de manera relativamente constante para todas las muestras de una misma variedad independientemente del año de cosecha (figura IV.11). La variedad *Camarosa* se caracteriza por presentar los porcentajes más bajos de Pg 3-gluc (77-78%) y los mayores de Pg 3-rut (11-13%) entre las analizadas, mientras que la variedad *Carisma* posee los más elevados de Pg 3-gluc (88-89%) y los más bajos de Cy 3-gluc (3%). *Eris* es la única variedad en la que se observan proporciones más elevadas de Cy 3-gluc (10%) que de Pg 3-rut (6-7%). Por su parte, la composición de *Oso Grande* y de *Tudnew* es bastante similar en cuanto a las proporciones de sus antocianos mayoritarios, aunque, como ya se ha señalado, *Tudnew* se caracterizaba por presentar porcentajes relativos elevados de los malonil- y acetil-glucósidos de Pg.

Cuantitativamente se observan diferencias acusadas en cuanto al contenido de antocianos, con oscilaciones amplias (figura IV.12) entre las distintas muestras analizadas de cada variedad y año, seguramente muy influidas por las condiciones de

cultivo y momento de recolección. No obstante, parece que podría existir cierta influencia por parte de la variedad sobre el contenido de antocianos; así, las muestras de *Eris* presentaban repetidamente las menores concentraciones, mientras que los extractos de *Tudnew* poseían los mayores contenidos, casi tres veces superiores a los encontrados en *Eris*. *Camarosa* se muestra también como una variedad rica en antocianos, aunque con notables diferencias según el año de cosecha. Las mayores diferencias de acuerdo con relación al año se encontraron en *Oso Grande*, en la cual la concentración media de antocianos totales en las muestras de 2001 duplicaba prácticamente a la determinada en las muestras de 2002 (figura IV.12).

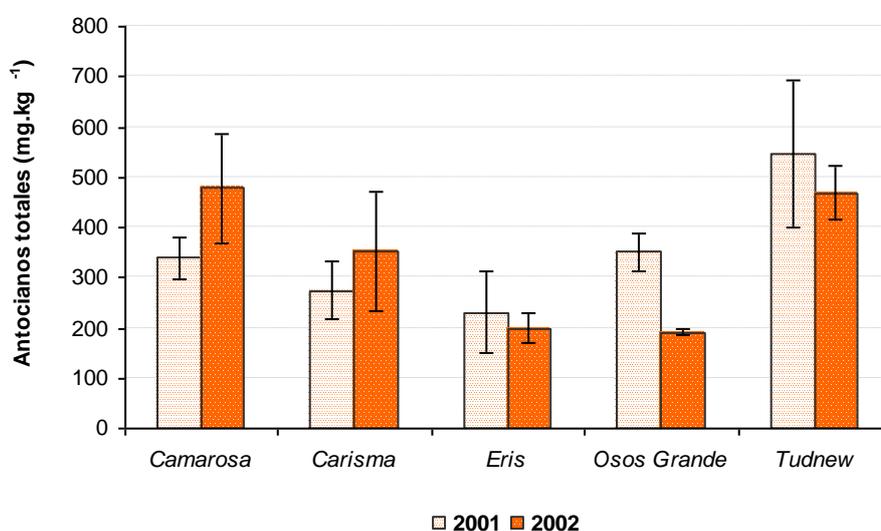


Figura IV.12 - Concentraciones medias de antocianos totales y desviación estándar de las cinco variedades de fresas analizadas en los dos años de cosecha.

De manera general, los contenidos medios de antocianos encontrados en el presente estudio están en consonancia con los citados por otros autores. Así, Clifford (2000), citando otros trabajos, señala contenidos medios de antocianos en fresa del orden 150-350 mg.kg⁻¹, mientras que más recientemente, Meyers *et al.* (2003), en un estudio realizado sobre ocho variedades indica valores medios de 41,4 mg Cy 3-gluc/100 g fruto, con diferencias del orden del doble de concentración entre la variedad más pobre y la más rica en antocianos. García-Viguera *et al.* (1998) cuantificaron los antocianos en cuatro variedades, *Chandler* (326,6 ± 19,3 µg.g⁻¹ fresa), *Oso Grande* (185,0 ± 15,0 µg.g⁻¹ fresa), *Tudla* (217,5 ± 19,4 µg.g⁻¹ fresa) y *Camarosa* (840,2 ± 5,7 µg.g⁻¹ fresa), contenido este último bastante más elevado que el obtenido en el presente trabajo. La mayor concentración de antocianos en *Camarosa* fue justificada por estos autores por una mayor pigmentación en los tejidos internos del fruto con

relación a las demás variedades. En nuestro trabajo, además de en *Camarosa*, también se pudo comprobar la existencia de una fuerte pigmentación interna en la variedad *Tudnew*, en la cual se determinaron las mayores concentraciones. En el citado estudio de García-Viguera *et al.* (1998), la distribución encontrada para los tres antocianos mayoritarios en *Camarosa* y en *Oso Grande* era muy similar a la determinada por nosotros, lo que iría en apoyo de lo anteriormente indicado en el sentido de que la composición cualitativa de antocianos es una característica de la variedad. Castro *et al.* (2002) también analizaron el contenido antociánico de *Camarosa*, encontrando concentraciones de $48,2 \pm 1,4$ mg g⁻¹ fruto, del mismo orden a las cuantificadas en nuestro caso en las muestras de 2001 de esa variedad. No se han encontrado en la bibliografía otras referencias en relación al contenido en antocianos en fresas de las otras variedades analizadas.

En todo caso, resulta aventurado hacer comparaciones entre las concentraciones de antocianos encontradas en este estudio y las presentadas por otros autores, no sólo debido a la influencia que las condiciones de cultivo y conservación pueden ejercer sobre las mismas, sino también por el uso de diferentes métodos de extracción, determinación y de expresión de resultados, como ya denotaron Häkkinen *et al.* (1998) y Kosar *et al.* (2004).

4 – CONCLUSIONES

1. El uso de condiciones de HPLC optimizadas para el análisis de antocianos de fresa con el recurso a la detección por fotodiodos en línea con espectrometría de masas, ha permitido detectar hasta 31 antocianos distintos en la fresa y obtener datos para establecer con cierta seguridad la identidad de la mayoría de ellos, algunos de los cuales no habían sido descritos hasta ahora. Los antocianos encontrados presentan mayoritariamente pelargonidina, como aglicón, aunque también existen algunos importantes derivados de cianidina y se detectan trazas de derivados de delphinidina y de malvidina. Entre los nuevos pigmentos provisionalmente identificados se encuentran el 3-rutinósido de cianidina, un diglucósido de pelargonidina, un diglucósido de cianidina acilado con ácido malónico, dos disacáridos de pelargonidina acilados con ácido acético, cianidina malonilglucósido y pelargonidina acetilglucósido. Un aspecto de particular importancia es la detección por primera vez en fresa de una nueva familia de pigmentos derivados de pelargonidina condensados con flavan-3-oles (catequina y afzelequina), cuya presencia en alimentos y bebidas se asociaba a reacciones que tenían lugar durante el almacenamiento.
2. Las cinco variedades de fresa estudiadas poseen los mismos antocianos mayoritarios: pelargonidina 3-glucósido, pelargonidina 3-rutinósido y cianidina 3-glucósido, aunque con cierta variación en cuanto a las proporciones de los mismos. Pelargonidina 3-glucósido constituye siempre el antociano ampliamente mayoritario (77-90%), siendo habitualmente pelargonidina 3-rutinósido (6-11%) el segundo pigmento en importancia, salvo en el caso de la variedad *Eris*, que se distingue por presentar como segundo pigmento cianidina 3-glucósido, con porcentajes del orden 10%. En su conjunto estos tres antocianos suponen más de 95% del total de antocianos, determinando el color de la fresas y de sus derivados
3. En términos absolutos, los contenidos de antocianos de estas cinco variedades de fresa se sitúan en el intervalo 200–600 mg.kg⁻¹ fresa. Las variedades *Tudnew* y *Camarosa*, son las más pigmentadas y las que presentan, en conjunto con *Carisma*, un perfil cualitativo más diverso.

V

Estudio de Flavan-3-oles en Fresa

1 – Introducción

2 – Metodología

2.1 – Material vegetal

2.2 – Extracción

2.3 – Análisis

3 – Resultados y Discusión

3.1 – Identificación de flavanoles en fresa

3.2 – Determinación de flavanoles en fresa

4 – Conclusiones

1 – INTRODUCCIÓN

El interés del estudio de la composición flavanólica es doble. Por una parte, los flavanoles (catequinas y proantocianidinas) tienen implicación en la definición de propiedades organolépticas, como la astringencia y también, indirectamente, el color. Por otra parte, se les ha atribuido diversas actividades biológicas que, en algunos casos, se han relacionado con efectos beneficiosos para la salud.

En lo que respecta al color, su influencia se puede manifestar bien a través de sus interacciones con los antocianos, como ya se ha expuesto anteriormente, bien por actuar como sustratos o reactivos en reacciones de pardeamiento, que contribuyen al cambio progresivo del color que tiene lugar en los productos procesados a partir de la fresa (purés, disgregados, zumos, mermeladas, confituras, etc). Entre las distintas enzimas habitualmente asociadas al catabolismo de flavonoides, las peroxidasas y las polifenoloxidasas se relacionan con las reacciones de oxidación enzimática de flavanoles, uno de los principales procesos que conducen al pardeamiento de alimentos de origen vegetal (Cheynier *et al.*, 1988; Guyot *et al.*, 1995). En el caso de la fresa, se ha comprobado la existencia de actividad enzimática remanente, especialmente de tipo peroxidasa, incluso tras los tratamientos térmicos o con altas presiones (López-Serrano y Ros-Barceló, 1997; Cano *et al.*, 1997), que debe contribuir al pardeamiento de productos procesados de la misma. En sistemas modelo se han identificado diversos pigmentos con tonalidad amarillenta resultantes de la oxidación (química y enzimática) de catequinas (Guyot *et al.*, 1996, Oszmianski *et al.*, 1996), en la formación de algunos de los cuales se ha demostrado la participación de especies como el ácido glioxílico (Fulcrand *et al.*, 1997).

Una amplia revisión sobre la actividad biológica y efectos para la salud de los flavanoles de la dieta ha sido realizada por Santos-Buelga y Scalbert (2000). Entre las propiedades señaladas destacan las siguientes: antioxidantes y captadores de radicales libres, (Scott *et al.*, 1993; Terao *et al.*, 1994; Haslam, 1996; Teissedre *et al.*, 1996; Plumb *et al.*, 1998; de Gaulejac *et al.*, 1999; Benzie y Szeto, 1999), inhibición de tumores (Gali *et al.*, 1994; Valcic *et al.*, 1996) e inhibidores de la agregación plaquetaria (Chang y Hsu, 1989).

Muchas de las características de los flavanoles guardan relación con su grado de polimerización. Así, Podsedek *et al.* (1998) indican que los oligómeros son captadores de radicales libres más eficaces que los monómeros y que el pardeamiento enzimático

aumenta a medida que disminuye el grado de polimerización, aunque los dímeros se degradan a mayor velocidad que los monómeros. Esto hace que, tanto desde el punto de vista científico como tecnológico, sea importante conocer no sólo la cantidad de flavanoles totales sino también cuáles son y el contenido individual de los mismos.

En los últimos años, la cromatografía líquida de alta eficacia asociada a la detección UV ha sido la técnica de elección para el análisis de catequinas y proantocianidinas dímeras y trímeras. Sin embargo, en extractos de alimentos, los flavanoles están frecuentemente presentes como mezclas complejas acompañadas por otros compuestos fenólicos, que también absorben en el ultravioleta, y que se encuentran en mayor concentración o poseen coeficientes de extinción más elevados que los flavanoles. Esto, unido a la diversidad de flavanoles que pueden existir en un producto, en muchos casos con gran similitud estructural y pequeñas diferencias de polaridad entre los mismos, hacen que su separación cromatográfica y detección resulten complejas y, en ocasiones, imposibles.

Con la finalidad de solucionar algunos de los problemas de resolución y evitar la interferencia de otros compuestos fenólicos, de Pascual-Teresa *et al.* (1998b) pusieron a punto una metodología para el análisis cualitativo y cuantitativo de flavan-3-oles, utilizando la separación por HPLC y detección espectrofotométrica después de reacción química postcolumna con *p*-dimetilaminocinamaldehído (DMACA), que reacciona de manera específica con flavanoles, permitiendo su detección selectiva (Treutter, 1989; Treutter *et al.*, 1994a; Treutter *et al.*, 1994b). Esta metodología ha sido utilizada con éxito para el estudio de la composición flavánica en alimentos y bebidas (de Pascual-Teresa *et al.*, 1998a; de Pascual-Teresa *et al.*, 2000).

En este capítulo, se expone la parte del trabajo correspondiente al estudio de la composición flavanólica cualitativa y cuantitativa de la fresa, utilizando el método de HPLC con detección tras derivatización con DMACA. En un intento de simplificar los extractos brutos y obtener otros más concentrados en flavanoles y con menores niveles de posibles interferentes, que facilitasen su detección, identificación y cuantificación, se ensayaron diversas tentativas de purificación, particularmente por extracción en fase sólida con Sephadex® LH-20 (cromatografía en columna) y con cartuchos Sep Pak®, así como por extracción líquido-líquido con acetato de etilo. Sin embargo, ninguno de estos procedimientos introdujo mejoras importantes en los perfiles cromatográficos obtenidos y, además, provocaban pérdidas, en algunos casos significativas, de flavanoles, por lo que al final se optó por inyectar los extractos brutos y filtrados.

2 – METODOLOGIA

2.1 - MATERIAL VEGETAL

Los ensayos de caracterización flavanólica de la fresa se realizaron sobre muestras de fresas de las mismas variedades (*Camarosa*, *Carisma*, *Eris*, *Oso Grande* y *Tudnew*), temporada de recolección, estado de madurez y con la misma proveniencia que las utilizadas para la caracterización antociánica (Capítulo IV, apartado 2.1). Las muestras llegaron a nuestro laboratorio congeladas, desrabadas y troceadas y fueron mantenidas a -35°C hasta su utilización.

2.2 – EXTRACCIÓN

Las muestras de fresas troceadas (50-60 g) eran maceradas en 100 mL de metanol al 75% (previamente enfriado a -30°C) durante una noche (~14 horas), en congelador. Después de este tiempo, eran trituradas con un homogeneizador e introducidas durante 15 min en baño de ultrasonidos tras lo cual se centrifugaban (4°C) durante 10 min a 4073 x g. El sobrenadante era filtrado a vacío a través de un embudo Büchner con papel de filtro y el residuo sólido era sometido a extracción en condiciones similares a las anteriores dos veces más. Después de combinar las fases hidroalcohólicas, se añadía agua ultrapura y se llevaba a concentrar en evaporador rotatorio a 30°C hasta eliminar todo el metanol. El extracto acuoso obtenido era transferido a un matraz aforado y enrasado con agua ultrapura hasta 20 mL. En todas las etapas se extremaban las condiciones de lavado y la recuperación de líquidos y residuo para limitar posibles pérdidas de flavanoles. Los extractos brutos eran guardados en congelador (-18°C) el mínimo tiempo posible hasta su análisis. Antes de inyectar en el sistema cromatográfico, los extractos eran filtrados (0,45 µm).

Para cada variedad de fresa y año de cosecha, se hicieron 3 extractos brutos independientes, esto es, se partía de tres muestras diferentes, que eran analizadas por separado.

2.3 – ANÁLISIS

Para el análisis cuantitativo e identificación tentativa de flavanoles se utilizó un método de análisis por HPLC con detección tras reacción química *post column* con *p*-dimetilaminocinamaldehído (DMACA), puesto a punto por de Pascual-Teresa *et al.* (1998b, 2000). El sistema de detección está basado en la capacidad de los aldehídos de actuar como especies electrófilas y condensar con anillos aromáticos activados en un medio fuertemente ácido (Delcour y de Varebeke, 1985). El reactivo usado, DMACA, reacciona con los flavanoles de manera prácticamente específica, formando cromóforos que absorben entre 632 y 640 nm (figura V.2), lo que permite su determinación colorimétrica. La especificidad del reactivo evita la interferencia de otros compuestos fenólicos que puedan estar presentes en los extractos, así como la de los antocianos cuya absorción a 640 nm es escasa. Así, en los cromatogramas registrados tras la reacción de derivatización se observan casi exclusivamente picos correspondientes a catequinas y proantocianidinas. Además de su elevada selectividad, la reacción aumenta la sensibilidad respecto a la detección a 280 nm, permitiendo la detección de sustancias presentes en baja concentración.

Las condiciones de análisis cromatográfico empleadas eran las siguientes:

Fase estacionaria: Columna Spherisorb® S3 ODS-2 C18, 3 µm (4,6 x 150 mm) de Waters

Fase móvil: Eluyente A → Agua

Eluyente B → Metanol (100%)

Eluyente C → mezcla [ácido fórmico:agua] (4,5:95,5) (v/v)

Eluyente D → mezcla [metanol:ácido fórmico al 4,5%] (10:90) (v/v)

Gradiente:

<i>Tiempo (min.)</i>	<i>A (%)</i>	<i>B (%)</i>	<i>C (%)</i>	<i>D (%)</i>
0	100	0	0	0
10	0	0	100	0
20	0	0	85	15
30	0	0	85	15
40	0	0	65	35
45	0	0	65	35
60	0	0	55	45
75	0	0	0	100
175	0	50	0	50
180	0	80	0	20

Temperatura de la columna: 30° C

Flujo: 0,5 mL.min⁻¹

Para la detección, tras la separación cromatográfica en la columna, se hacía una primera medida a 280 nm en un espectrofotómetro de diodos, a cuya salida el eluato se hacía reaccionar con una disolución de DMACA al 1% en H₂SO₄ 3N en metanol, tras la cual se realizaba una segunda detección a 640 nm en un fotómetro. Los dos detectores estaban conectados a una estación de control y tratamiento de datos. El procedimiento completo, que se representa esquemáticamente en la figura V.1, incluía pues doble detección. El reactivo de derivatización se introducía en el sistema mediante una segunda bomba HPLC y era mezclado con el eluato (proveniente del sistema HPLC) en una conexión en T, a partir de la cual circulaba a través de un reactor de teflón trenzado (9 m de longitud x 0,5 mm de diámetro interno), dando como resultado un tiempo de reacción de 2,5 min.

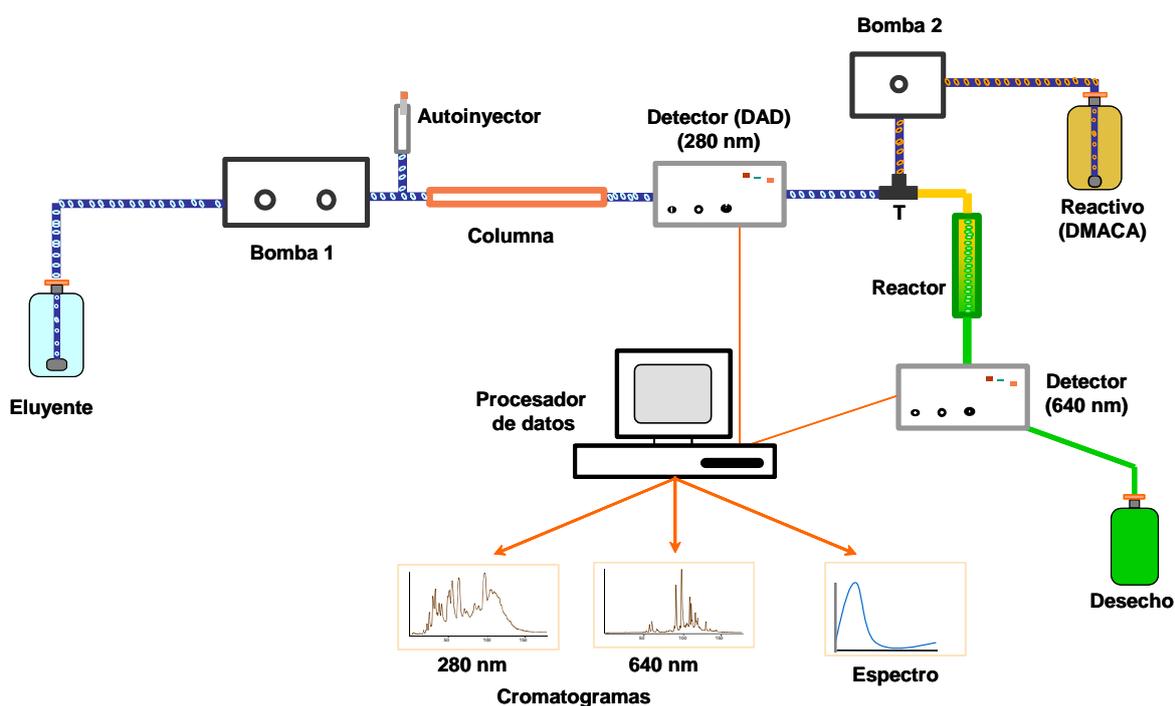


Figura V.1 – Esquema del método de HPLC con detección tras derivatización *post* columna empleado para el análisis de flavanoles.

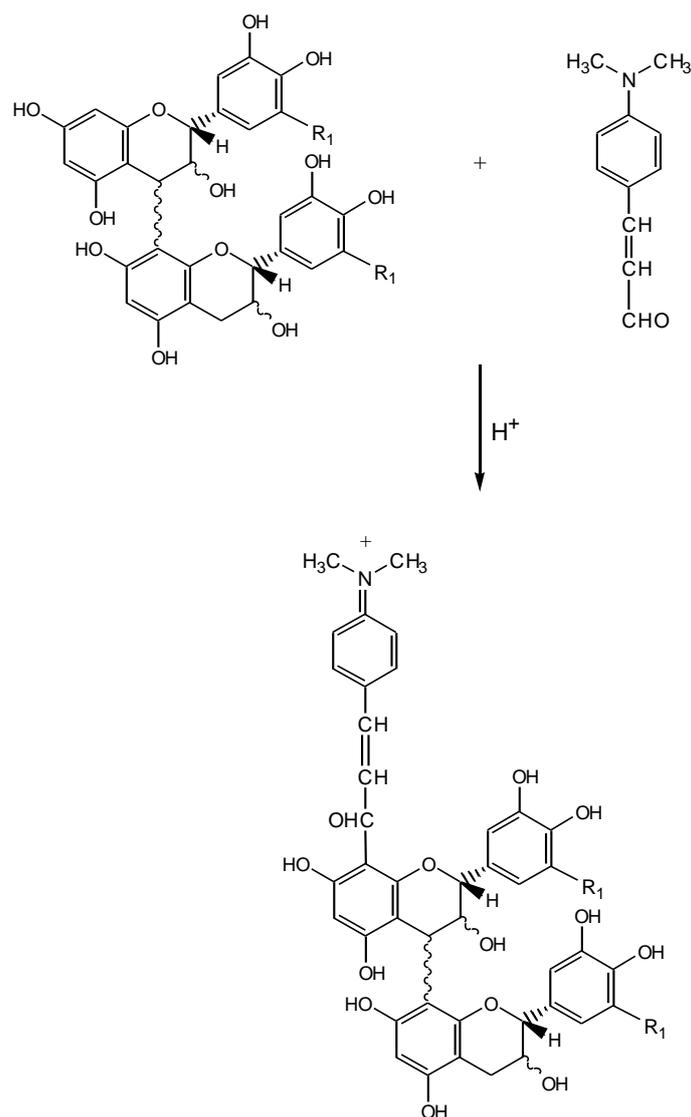


Figura V.2 – Reacción entre flavanoles y DMACA en medio ácido; R1 = H en procianidinas; R1 = OH en delphinidinas (de Pascual-Teresa *et al.*, 1998b).

La identidad de los picos de los cromatogramas registrados a 640 nm fue establecida a partir de sus características de retención en HPLC y por comparación con patrones de catequinas y proantocianidinas previamente caracterizados en nuestro laboratorio a partir de extractos de frutos de almendra inmaduros y de semillas de uva (para la obtención de catequinas y procianidinas), y de hollejos de uva y piel de granada (para galocatequinas y prodelfinidinas). De este modo, se disponía de referencias para (+)-galocatequina [GC], procianidinas dímeras B1, B2, B4, B5 y B7, trímeros C1 [EC-(4,8)-EC-(4,8)-EC] y EC-(4,8)-EC-(4,8)-C [EEC], y prodelfinidinas dímeras GC-(4,8)-C y GC-(4,8)-GC. Además, se obtuvieron también las procianidinas dímeras B3 [C-(4,8)-C] y B6 [C-(4,6)-C] por hemisíntesis según lo descrito en el

Capítulo VII, apartado 2.1, y se tenían también patrones comerciales de (+)-catequina [C], (-)-epicatequina [EC] y (-)-epicatequina-3-O-galato [ECG].

La cuantificación se realizó a partir de las áreas de los picos registrados a 640 nm después de la reacción de derivatización, por comparación con una recta de calibrado obtenida con catequina con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de catequina } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = 1,12\text{E-}3 \cdot \text{área} + 4,0\text{E-}2$$

$$\text{Coeficiente de regresión } (R^2) = 0,999$$

El volumen de muestra inyectado en cada caso era el apropiado para que las áreas de los picos estuvieran incluidas en el intervalo de concentraciones utilizadas en la preparación de la recta de calibración (5 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Previo a la inyección de cada serie de muestras analizadas consecutivamente se inyectaba en el cromatógrafo una mezcla con concentraciones conocidas de distintos patrones, para comprobar que las condiciones de cuantificación eran las mismas en todos los casos. Las concentraciones de los distintos flavanoles en las variedades analizadas eran expresadas en $\mu\text{g catequina}\cdot\text{g}^{-1}$ de fresa.

El contenido de flavanoles totales fue calculado como suma de las áreas de la totalidad de picos registrados a 640 nm después de la reacción de derivatización, a partir de la recta de calibrado obtenida con catequina.

3 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

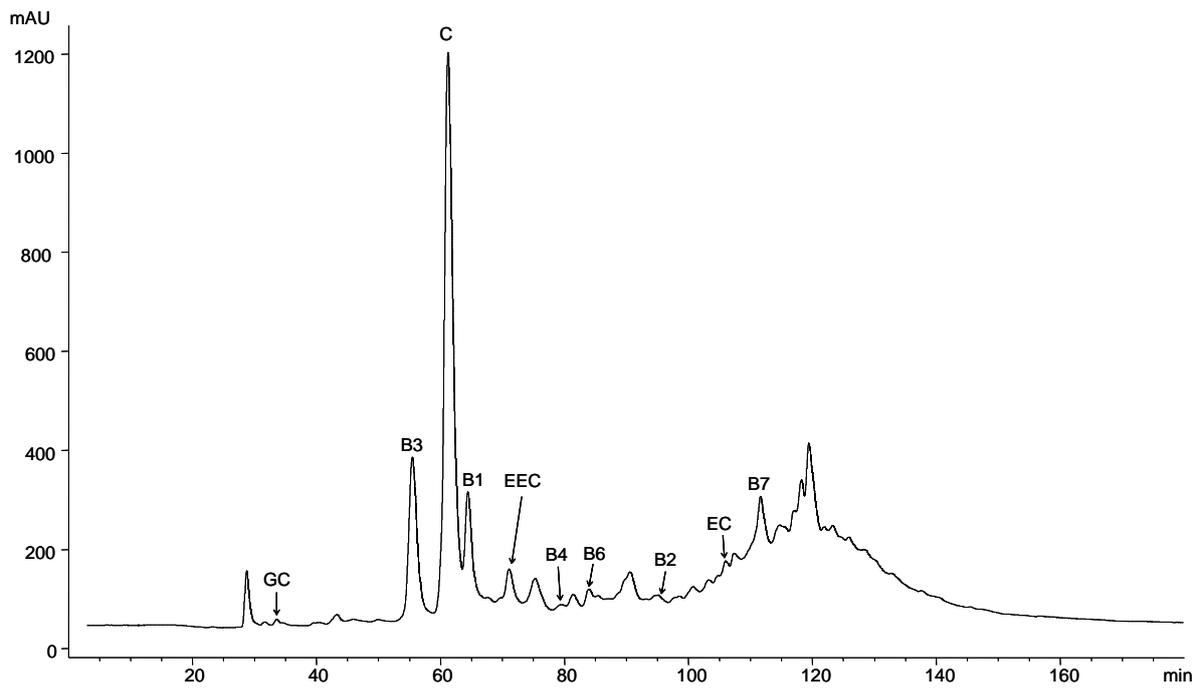
3.1 – IDENTIFICACIÓN DE FLAVANOLES EN FRESA

El análisis de flavanoles se centró en los compuestos de menor grado de polimerización, únicos que son adecuadamente separados por HPLC y pueden ser cuantificados de manera individual. Se considera que este tipo de flavanoles son los que podrían poseer mayor significación desde el punto de vista de la estabilidad del color del producto, a través de sus interacciones con los antocianos y como sustratos de eventuales reacciones de pardeamiento.

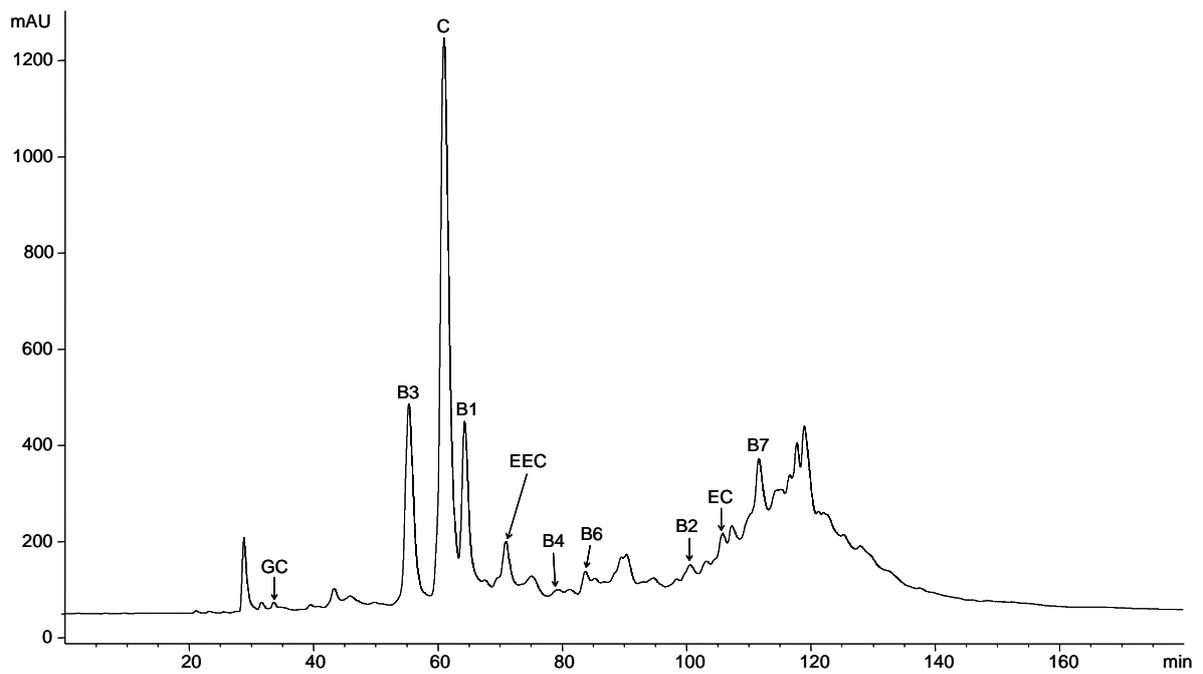
La extracción de las muestras se llevó a cabo con metanol al 75%, que es considerado un buen disolvente para la extracción de flavanoles de bajo grado de polimerización (Kallithraka *et al.*, 1995). En nuestro laboratorio se ha visto (de Pascual-Teresa *et al.*, 2000) que consigue unos porcentajes medios de recuperación del 85% en el caso de los flavanoles monómeros, del 107% en el caso de las proantocianidinas dímeras y del 91% en proantocianidinas trímeras. Otros disolventes, como acetona al 70%, han sido utilizados por otros autores (Heinonen *et al.*, 1998), obteniendo peores rendimientos de extracción que el metanol para el tipo de compuestos considerados.

En la figura V.3 (a, b, c, d y e) se recogen cinco cromatogramas, registrados a 640 nm, donde se muestran los perfiles flavánicos de cada una de las variedades de fresa estudiadas. Todas ellas se caracterizan por la presencia de una serie de flavanoles mayoritarios comunes (C, procianidinas dímeras B1, B3 y B7, y trímero EEC), acompañados de un conjunto diverso de compuestos, algunos de ellos no identificados y presentes, en general, en menor proporción (tabla V.1). Además, en todos los extractos analizados se produce una elevación en la línea base en la parte final de los cromatogramas, indicativa de la presencia de flavanoles no bien resueltos, que se supone que deben corresponder a oligómeros de mayor tamaño o polímeros. En todo caso, el tamaño de estas “montañas” no es excesivo en ninguna de las muestras analizadas, lo que sugiere que la cantidad de este tipo de flavanoles, al menos en los extractos obtenidos, no es demasiado grande.

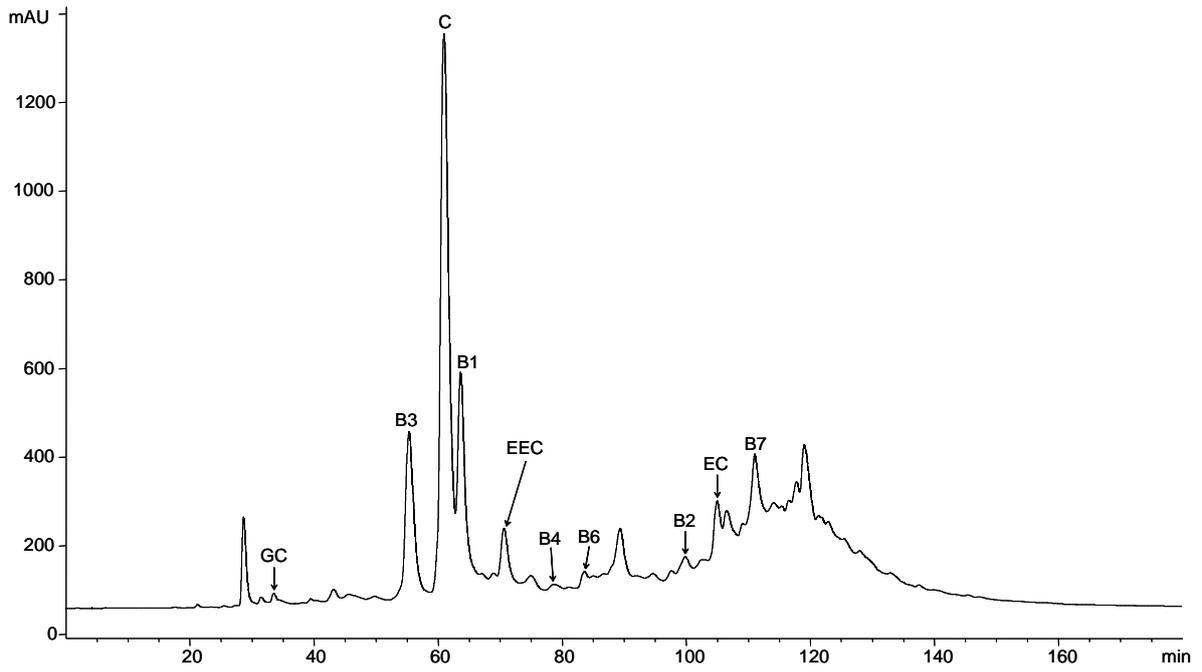
(a) *Camarosa*



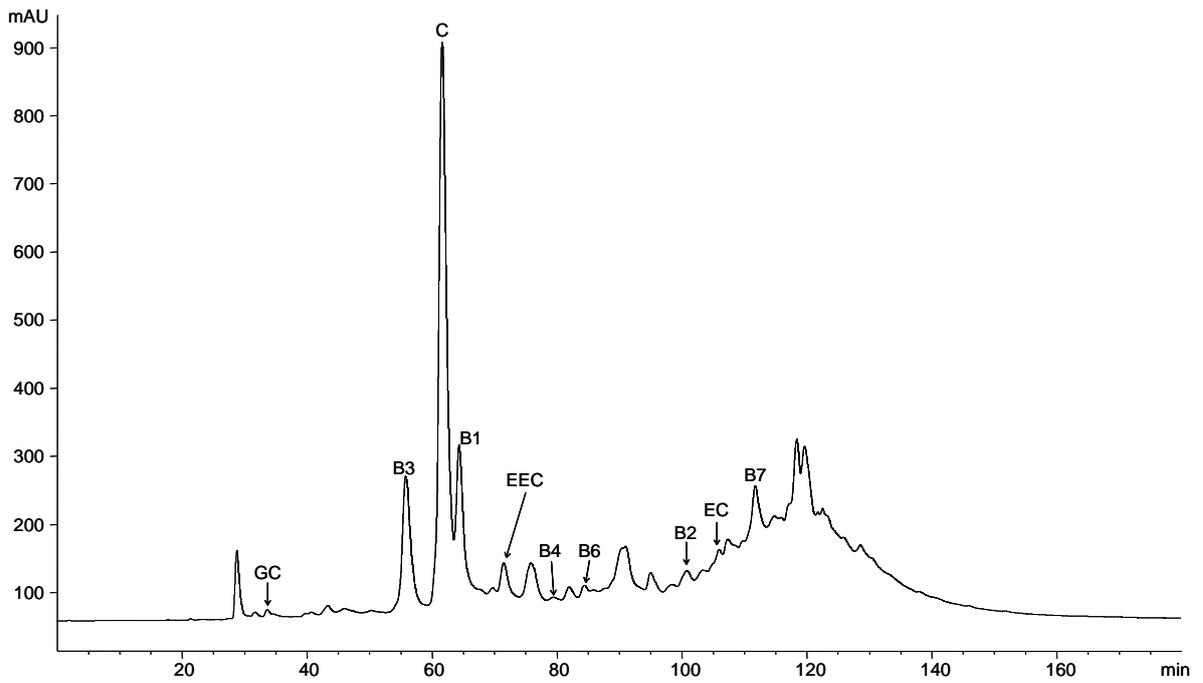
(b) *Carisma*



(c) *Eris*



(d) *Oso Grande*



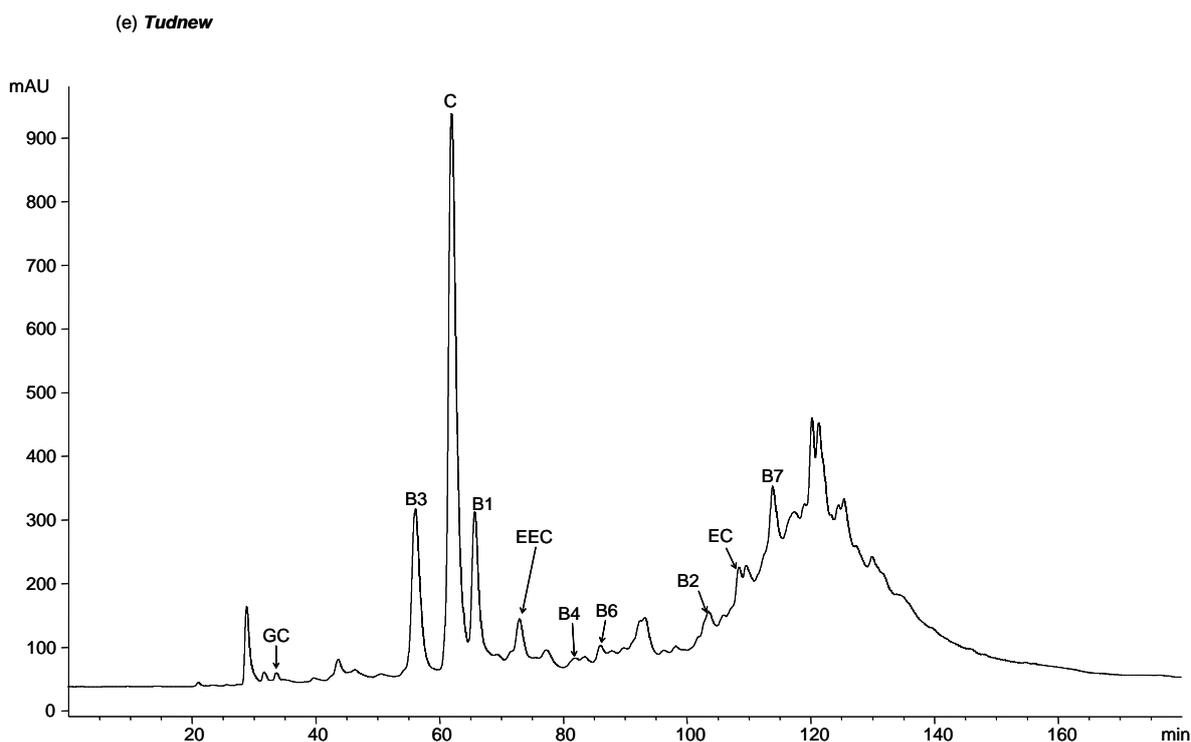


Figura V.3 – Cromatogramas de HPLC registrados a 640 nm tras reacción con DMACA, correspondientes a los perfiles flavanólicos de los extractos de fresa de las variedades: (a) *Camarosa*; (b) *Carisma*; (c) *Eris*; (d) *Oso Grande* y (e) *Tudnew*. Para identificación de los picos consultar la tabla V.1.

Desde el punto de vista cualitativo, la composición flavanólica de la fresa está principalmente caracterizada por la presencia de flavanoles derivados de catequina. Así, en las cinco variedades analizadas y en los dos años de estudio, se identifica la presencia de catequina monómera (C) y de las procianidinas dimeras (B1, B3, B6 y B7) y trímeras (EEC) relacionadas. Estos resultados, están en concordancia con los obtenidos por otros autores que habían también señalado la existencia en fresa, de forma predominante, de catequina y de sus derivados (Thompson *et al.*, 1972; Stöhr y Herrmann, 1975; Hanefeld y Herrmann, 1976; Arts *et al.*, 2000; de Pascual-Teresa *et al.*, 2000). No se ha podido confirmar, sin embargo, la presencia en nuestras muestras de trímero C2 [C-(4,8)-C-(4,8)-C], señalada por Thompson *et al.* (1972) ni del tetrámero EC-(4,8)-EC-(4,8)-EC-(4,8)-C, indicada por de Pascual-Teresa (1999). EC y oligómeros relacionados (B2, C1) son compuestos menos importantes en fresas e incluso no detectados en algunas variedades (Thompson *et al.*, 1972; Hanefeld y Herrmann, 1976; van Gorsel *et al.*, 1992; Arts *et al.*, 2000). En nuestro caso, EC y procianidina B2 han sido encontradas en las cinco variedades analizadas y en los dos años de cosecha. Igualmente, se ha detectado la presencia de galocatequina (GC), también señalada por algunos autores en diversas variedades (Stöhr y Herrmann, 1975; de Pascual-Teresa *et al.*, 2000; Meyers *et al.*, 2003). No se ha llegado a

confirmar la presencia en las muestras de epicatequina-3, O-galato (ECG), reportada en la fresa por algunos autores. Se debe indicar que este flavanol eluye en la zona final del cromatograma donde se produce la elevación de la línea base, por lo que no se descarta que pudieran existir ciertas cantidades de ECG, aunque siempre poco importantes, insuficientes para dar lugar a un pico bien definido.

De acuerdo con los espectros UV que podían obtenerse antes de la reacción con el DMACA para los picos que eluían en la parte final del cromatograma, parece que tampoco existe una presencia importante de procianidinas galoiladas, aunque se debe señalar que en todos los cromatogramas (figura V.3) existen picos en esa zona, algunos bien definidos, cuya identidad no ha podido ser establecida, al carecer de patrones de los mismos, y que por tiempo de retención podrían corresponder tanto a procianidinas galoiladas como a oligómeros de grado de polimerización relativo alto.

Tabla V.1 – Longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia en el espectro UV ($\lambda_{\text{máx}}$ del compuesto antes de reacción con DMACA), tiempo de retención (t.r.) e identidad de flavanoles encontrados en los extractos de fresas.

t.r.* (min.)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Flavan-3-ol
33.7	270	(+)-galocatequina (GC)
55.6	280	C-(4,8)-C (B3)
61.4	280	(+)-catequina (C)
64.6	280	EC-(4,8)-C (B1)
71.2	280	EC-(4,8)-EC-(4,8)-C (EEC)
79.5	280	C-(4,8)-EC (B4)
84.2	280	C-(4,6)-C (B6)
100.9	280	EC-(4,8)-EC (B2)
106.2	280	(-)-Epicatequina (EC)
111.8	280	EC-(4,6)-C (B7)
117.8	280	(-)-Epicatequina-3-O-galato (ECG)

* Tiempo de retención en el cromatograma obtenido tras reacción con DMACA

En general, en las muestras estudiadas, el perfil flavanólico se adapta a unas pautas cualitativas similares, lo que parece indicar que existe un patrón genérico de composición característico de la fresa. Se observan, no obstante, diferencias entre variedades en cuanto a las proporciones relativas de los distintos compuestos detectados, así como en cuanto a presencia o no de algunos de los picos que no han

podido ser identificados. En todo caso, los elementos de juicio de que se dispone no son suficientes para concluir si podría existir una distribución flavanólica característica de la variedad o se trata simplemente de variaciones aleatorias o motivadas por las condiciones de cultivo, madurez o conservación. En este sentido, Meyers *et al.* (2003), en un estudio realizado sobre ocho variedades de fresa observaron que las proporciones relativas de flavanoles cambiaban imprevisiblemente según el estado fisiológico del fruto.

3.2 – DETERMINACIÓN DE FLAVANOLES EN FRESA

En la tabla V.2 se recogen los contenidos de los flavanoles identificados y de flavanoles totales en las cinco variedades de fresa estudiadas, correspondientes a las cosechas de 2001 y 2002, expresados como mg catequina.kg⁻¹ de fresa.

Tabla V.2 – Contenidos de los flavanoles identificados en fresas recolectadas en las temporadas 2001 y 2002. Los resultados (media ± desviación estándar; n = 3) se expresan como mg catequina.kg⁻¹ fresa.

	<i>Camарosa</i>	<i>Carisma</i>	<i>Eris</i>	<i>Oso Grande</i>	<i>Tudnew</i>
2001					
GC	0,2±0,1	0,1±0,0	0,8±1,1	0,1±0,1	0,1±0,0
B3	6,2±1,3	12,2±6,2	9,6±0,5	8,9±2,9	5,9±1,5
C	27,2±3,7	39,9±21,9	37,5±1,8	36,2±7,4	21,5±4,5
B1	1,8±0,4	4,0±2,0	2,7±0,2	2,6±1,3	1,4±0,2
EEC	1,3±0,4	2,3±1,7	2,6±0,2	1,6±1,1	1,0±0,3
B4	0,1±0,1	0,3±0,4	0,2±0,1	0,1±0,0	0,1±0,1
B6	0,8±0,3	1,6±1,0	1,1±0,3	1,1±0,8	0,2±0,1
B2	0,4±0,2	0,8±0,7	0,7±0,1	0,2±0,2	0,5±0,4
EC	1,0±0,2	2,0±1,4	2,3±0,2	0,9±0,7	0,7±0,4
B7	1,1±1,0	2,8±1,5	2,8±0,0	3,4±2,9	1,3±0,3
Total	59,4±9,8	88,9±49,6	80,9±4,0	87,6±26,2	52,6±6,3
2002					
G	0,3±0,0	0,3±0,1	0,3±0,0	0,2±0,1	0,2±0,1
B3	13,4±1,7	10,5±0,8	12,5±3,5	9,0±0,5	8,3±1,5
C	52,2±6,4	31,4±2,6	44,1±12,8	36,8±2,2	27,2±3,5
B1	8,5±1,2	6,4±0,9	11,4±1,5	7,7±1,0	5,2±0,5
EEC	2,4±0,4	1,8±0,5	3,6±1,4	2,0±0,2	1,7±0,2
B4	0,4±0,1	0,3±0,1	0,6±0,1	0,2±0,1	0,4±0,1
B6	1,0±0,2	0,6±0,1	0,6±0,4	0,5±0,0	0,4±0,1
B2	0,8±0,1	0,7±0,1	0,9±0,2	0,7±0,2	0,9±0,0
EC	0,9±0,3	0,7±0,1	1,7±0,3	0,5±0,2	0,9±0,1
B7	3,5±0,8	2,7±0,5	4,5±1,1	2,5±0,6	2,6±0,3
Total	117,9±15,1	77,7±4,8	103,3±25,9	86,0±5,3	71,3±7,9

El contenido de flavanoles totales determinado en las distintas muestras analizadas oscilaba entre 40 y 140 mg.kg⁻¹ de fresa, existiendo una elevada variabilidad entre muestras tanto de una misma variedad como de distintas variedades y años, como se puede observar mejor por los intervalos de variación que se muestran el diagrama de barras de la figura V.4. No obstante, y dadas las dificultades que plantea el análisis cuantitativo de flavanoles, la variabilidad observada debe considerarse aceptable y los resultados tienen suficiente validez a efectos prácticos para hacerse una idea de los intervalos en los que se mueve el contenido de flavanoles de la fresa. Por otra parte, la variabilidad encontrada se debe considerar lógica, ya que es de esperar que existan diferencias en función no sólo de la variedad, sino también del grado de madurez del producto, factores medioambientales y condiciones de cultivo y conservación (Romeyer *et al.*, 1986; Mayr *et al.*, 1995; Amiot *et al.*, 1995; Meyers, *et al.*, 2003). Por esta razón, y teniendo en cuenta además que no se ha realizado un muestreo amplio al que se pueda dar un carácter significativo, no es posible ni adecuado realizar consideraciones acerca de si existe realmente una influencia varietal sobre el contenido flavanólico. La influencia del factor año se puede intuir comparando los contenidos encontrados entre las muestras correspondientes a los años 2001 y 2002 para las variedades *Camarosa* y *Tudnew*, en las que la variación intermuestral no era excesiva. En este sentido, parece intuirse a que en 2002 se alcanzaron concentraciones de flavanoles más elevados que en la de 2001, tendencia que también parece apuntarse para el resto de las variedades.

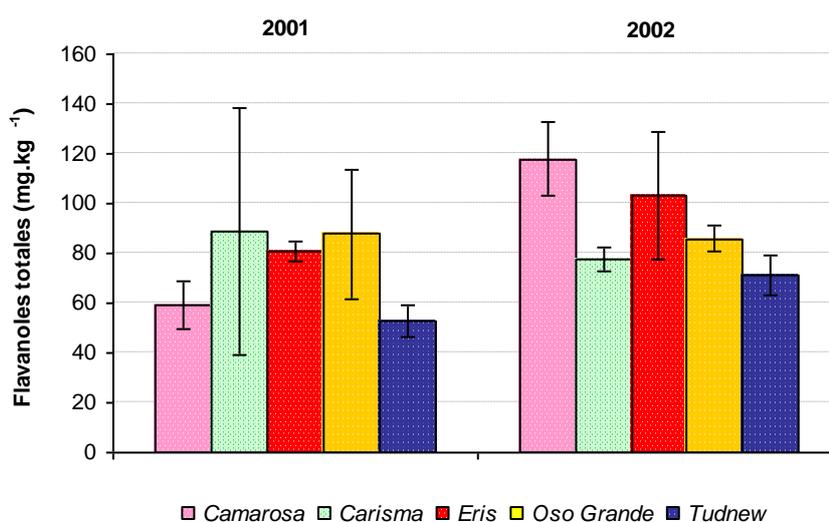


Figura V.4 – Contenidos medios de flavanoles totales (mg catequina.kg⁻¹ fresa) y desviaciones estándar (n=3) correspondientes a las cinco variedades de fresa objeto de estudio, en las cosechas de 2001 y 2002.

El contenido medio obtenido considerando el total de muestras analizadas (82,6 mg.kg⁻¹) es superior al encontrado por de Pascual-Teresa *et al.* (2000) (49,1 mg/kg, con un coeficiente de variación del 23%), aunque ese dato se había obtenido exclusivamente a partir del análisis de tres muestras de variedad no especificada. Contenidos de flavanoles totales del mismo orden fueron también encontrados por Stöhr y Herrmann (1975) y Heinonen *et al.* (1998), mientras que Pilando *et al.* (1985) y Podsedek *et al.* (1998) reportan concentraciones superiores (tabla V.3).

Tabla V.3 - Contenidos en flavanoles totales (expresados en mg catequina.kg⁻¹) citados por diferentes autores.

Contenido en flavanoles totales (mg catequina.kg ⁻¹)	Referencias bibliográficas
550	Pilando <i>et al.</i> (1985)
400	Podsedek <i>et al.</i> (1998)
184	Heinonen <i>et al.</i> (1998)
80	Stöhr y Herrmann (1975)
36-57	de Pascual-Teresa (1999)

De manera general, tanto los valores encontrados en nuestro estudio como los señalados por otros autores son relativamente elevados, si se comparan con los presentes en otras frutas, aunque similares o incluso inferiores a los que existen en mora, frambuesa o bayas, como la grosella, arándano (Heinonen *et al.*, 1998; de Pascual-Teresa *et al.*, 2000). Una posible explicación para este hecho podría ser la presencia en el fruto de semillas, que pueden contener cantidades importantes de flavanoles, al igual que ocurre en el caso de la frambuesa o la mora.

Al igual que se apuntó en el análisis cualitativo de los resultados, también se observa que en todas las variedades analizadas e independientemente del año de recolección, se produce una acumulación preferencial de catequina y de oligómeros relacionados (aquellos que presentan catequina en la subunidad inferior: dímeros B3, B1, B6 y B7, y trímero EEC), mientras que epicatequina y sus derivados están pobremente representados (menos del 2% del total de flavanoles), como se puede observar en la tabla V.4.

En las cinco variedades estudiadas la catequina es el flavanol mayoritario y representa entre el 39 y el 46% del contenido total en flavanoles. Le siguen en porcentaje, las procianidinas dímeras (B3, B1, B6 y B7) y el trímero EEC. Entre los

dímeros, es la procianidina B3, formada por la condensación entre dos unidades catequina la que se encuentra en mayor proporción (tabla V.5). Esto está de acuerdo con lo observado previamente en nuestro laboratorio (Escribano Bailón, 1993; de Pascual-Teresa, 1999). Asimismo, predominan los compuestos con enlaces de tipo C4-C8 (B1, B3, EEC) que los que presentan enlace C4-C6 (B6 y B7) (tabla V.5). En general, este último tipo de derivados es menos abundante en plantas, aunque en la fresa se pueden considerar relativamente bien representados, con porcentajes incluso superiores a los de EC y sus dímeros, aspecto ha sido encontrado en todas las muestras analizadas y que podría considerarse una característica de la fresa.

Tabla V.4 - Porcentajes correspondientes a los monómeros catequina (C) y epicatequina (EC) y de dímeros y trímeros relacionados respecto al contenido total de flavanoles.

	C (%)		Dímeros de C (%)		Trímeros de C (%)		EC (%)		Dímeros de EC (%)	
	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002
<i>Camarosa</i>	46	44	17	22	2,0	2,1	0,1	0,1	0,9	1,0
<i>Carisma</i>	45	40	23	26	2,6	2,3	0,2	0,1	1,2	1,3
<i>Eris</i>	46	43	20	28	3,2	3,5	0,2	0,2	1,1	1,4
<i>Oso Grande</i>	41	43	18	23	1,8	2,4	0,1	0,1	0,2	1,1
<i>Tudnew</i>	41	39	17	23	1,9	2,4	0,1	0,1	1,2	1,7

Tabla V.5 - Porcentajes de los dímeros B3, B1, B6 y B7 en las fresas de las dos cosechas estudiadas.

	B3 (%)		B1 (%)		B6 (%)		B7 (%)	
	2001	2002	2001	2002	2001	2002	2001	2002
<i>Camarosa</i>	10,5	11,4	3,0	7,2	1,3	0,8	1,9	3,0
<i>Carisma</i>	13,7	13,5	4,5	8,2	1,8	0,8	3,2	3,5
<i>Eris</i>	11,9	12,1	3,3	11,0	1,3	0,6	3,5	4,3
<i>Oso Grande</i>	10,1	10,5	3,0	9,0	1,3	0,5	3,9	2,9
<i>Tudnew</i>	11,3	11,6	3,0	7,3	0,5	0,6	2,4	3,6

La presencia de galocatequinas en la fresa es prácticamente testimonial. Únicamente se ha encontrado el monómero galocatequina, en proporción inferior al 1%, y no ha sido detectada la presencia de prodefinidinas oligómeras en ninguno de los extractos analizados.

De manera general, no se han registrado diferencias importantes en la distribución flavanólica de las cinco variedades analizadas que pudieran hacer pensar que existe un perfil de composición característico de la variedad.

4 - CONCLUSIONES

1. El perfil flavanólico de la fresa se caracteriza por la presencia destacada de 3 compuestos. el monómero (+)-catequina y las procianidinas dímeras catequina-(4→8)-catequina (B3) y epicatequina-(4→8)-catequina (B1), siendo la catequina el flavanol ampliamente mayoritario. De los restantes flavanoles que pudieron ser identificados siguen, en orden abundancia, los dímeros C4-C6 equivalentes a los anteriores, es decir, catequina-(4→6)-catequina (B6) y epicatequina-(4→6)-catequina (B7), juntamente con el trímero epicatequina-(4→8)-epicatequina-catequina. (-)-Epicatequina y sus oligómeros derivados representan menos del 2% del total de flavanoles de la fresa y (+)-galocatequina se expresa débilmente en las variedades de fresa estudiadas.
2. De manera general, no se han registrado diferencias importantes en la distribución flavanólica de las cinco variedades analizadas que pudieran hacer pensar que existe un perfil de composición característico de la variedad. Lo mismo se puede decir desde el punto de vista cuantitativo, donde se observa una gran variabilidad, tanto entre variedades como en cuanto a año de producción.

VI

Estabilidad de Pelargonidina 3-glucósido en Disoluciones Modelo

1 – Introducción

2 – Metodología

2.1 – Aislamiento de pelargonidina 3-glucósido

2.2 – Preparación y almacenamiento de las disoluciones modelo

2.3 – Análisis

2.3.1 – Cromatografía líquida de alta eficacia con detección por espectrofotometría de diodos

2.3.2 – Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida de alta eficacia

2.3.3 – Medidas espectrales

3 – Resultados y Discusión

3.1 – Evolución de pelargonidina 3-glucósido en disoluciones modelo

3.2 – Ensayos realizados en presencia de oxígeno

3.2.1 – Formación de nuevos compuestos

3.2.2 – Cambios en el color

3.3 – Ensayos realizados en ausencia de oxígeno

3.4 – Ensayos realizados en presencia de azúcar

4 – Conclusiones

1 – INTRODUCCIÓN

Los cambios de color observados en productos derivados de fresa durante el procesado y almacenamiento, son atribuidos a una serie de reacciones que tienen como consecuencia la progresiva desaparición de los antocianos como compuestos monoméricos, a la vez que aparecen nuevos pigmentos, dando como resultando un matiz más parduzco (Iversen, 1999). Skrede *et al.* (1992) en jarabes de fresa verificaron que la caída en el contenido de antocianos libres durante el almacenamiento no estaba directamente relacionada con la extensión del deterioro del color. En un estudio anterior realizado en conservas de fresa, Abers y Wrolstad (1979) habían observado que un deterioro más rápido del color durante el almacenamiento se asociaba a una tasa más rápida de pardeamiento fenólico, sugiriendo que la presencia de compuestos fenólicos reactivos para formar compuestos poliméricos pardos era un factor determinante en las transformaciones del color. La existencia de actividad peroxidásica residual en productos procesados de la fresa después del tratamiento térmico ha sido constatada por diversos investigadores (López-Serrano y Ros-Barceló, 1996, 1997; Cano *et al.*, 1997) y podría explicar, al menos en parte, el proceso de pardeamiento. Estas observaciones llevan a considerar que la pérdida de antocianos debe asociarse más a reacciones de degradación que a su implicación en la formación de nuevos pigmentos (de Ancos *et al.* 1999a).

Como ya ha sido referido en el Capítulo I, la estabilidad de los antocianos en los alimentos se ve afectada por factores diversos, entre los que se encuentran la estructura química del pigmento, la concentración antociánica total, los valores de pH y de temperatura, sus interacciones con otros componentes (por ejemplo, ácido ascórbico, iones metálicos, azúcares y sus productos de degradación, proteínas, enzimas) y la presencia de dióxido de azufre, luz y oxígeno (Mazza y Miniati, 1993; Henry, 1996; Jackman y Smith, 1996). La interdependencia de estos factores complica notablemente la obtención de conclusiones en estudios realizados directamente en matrices biológicas, como frutos frescos, zumos, purés, concentrados o mermeladas y jaleas, que presentan una complejidad de reacciones que dificulta la evaluación de la influencia de cada factor sobre la estabilidad de los antocianos (Jackman y Smith, 1996). De esta manera, para evaluar el efecto de un parámetro particular resulta útil recurrir a la utilización de sistemas modelo, donde es posible ejercer un mayor control de la composición y de los factores que influyen sobre la estabilidad del pigmento (Garzon y Wrolstad, 2001). Así, uno de los objetivos planteados en el presente trabajo fue el de estudiar el proceso de degradación de pelargonidina 3-glucósido, antociano

ampliamente mayoritario y principal responsable del color rojo en fresa y derivados, en disoluciones modelo en presencia/ausencia de oxígeno y en presencia de una mezcla de azúcares equivalente (cuantitativa y cualitativamente) a la del fruto fresco. Para ello, se procedió a la monitorización de la cinética de degradación del pigmento y la detección de nuevos compuestos formados en el curso de la misma, intentado asimismo su identificación, con el objeto de concluir sobre los mecanismos químicos involucrados en el proceso.

2 – METODOLOGIA

2.1 - AISLAMIENTO DE PELARGONIDINA 3-GLUCÓSIDO

La pelargonidina 3-glucósido se obtuvo a partir de un extracto bruto de antocianos de fresa preparado como se describe en el Capítulo IV, apartado 2.2. Para su aislamiento se utilizó la segunda fracción (fracción B) resultante del fraccionamiento del extracto por cromatografía en columna, por ser la más rica en el antociano; esta fracción fue concentrada y sometida a cromatografía líquida de alta eficacia semipreparativa, utilizando las siguientes condiciones de trabajo:

Fase estacionaria: Módulo de compresión radial *Waters* Prep LC 25 mm con cartucho de fase reversa Prep Nova-Pak® HR C18 (6 µm, 60 Å, 25 x 100 mm) de *Waters*

Fase móvil: Eluyente A → mezcla ácido acético:agua (5:95) (v/v)

Eluyente B → metanol

Gradiente:

<i>Tiempo (min.)</i>	<i>B (%)</i>	<i>A (%)</i>
0	10	90
5	10	90
20	14	85
25	15	85
30	18	82
50	35	65
60	10	90

Flujo: 10 mL.min⁻¹

Detección: 520 nm

Volumen de inyección: 2.000 µL

La fracción que contenía la pelargonidina 3-glucósido era evaporada a presión reducida y baja temperatura (<30°C) y el extracto era liofilizado. La pureza del antociano se comprobaba mediante análisis de HPLC-DAD-MS (figura VI.1). El pigmento liofilizado se conservaba en congelación (-30°C) hasta su utilización en los ensayos modelo o como patrón para la cuantificación.

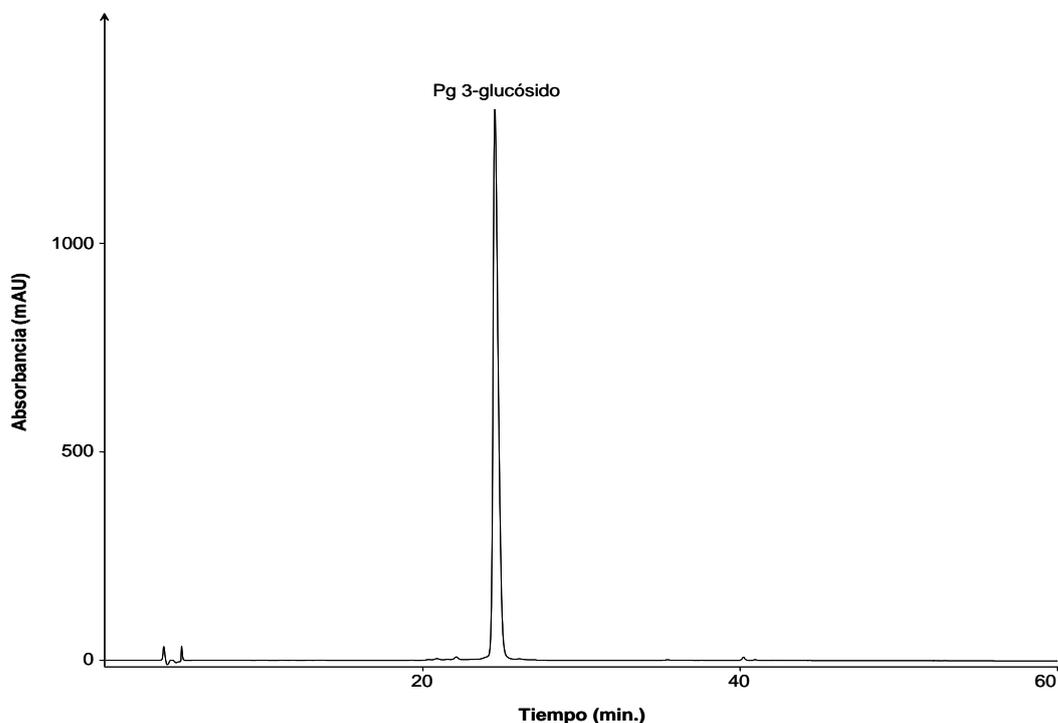


Figura VI.1 – Cromatograma HPLC (520 nm) de Pg 3-glucósido aislado y purificado, obtenido a partir de fresas.

2.2 – PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS DISOLUCIONES MODELO

Los ensayos modelo se realizaron utilizando una concentración de antociano del mismo orden a la citada para fresas de la variedad *Camarosa* (García-Viguera *et al.*, 1998) y un valor de pH similar al fisiológico de la fruta, obtenido por adición de ácido cítrico, principal ácido orgánico de la fresa. De este modo, a partir de la misma disolución madre se prepararon tres disoluciones (10 mL) de pelargonidina 3-glucósido de concentración $1,8 \times 10^{-3}$ M, en tampón citrato 0,1 M a pH 3,5, que fueron introducidas en viales de cristal:

Vial 1 (GOx), que fue cerrado con un *septum* de goma.

Vial 2 (GsinOx), en el cual se evacuó el aire haciendo pasar nitrógeno durante 2 min antes de ser cerrado herméticamente con un *septum* de goma y sellado con cápsula metálica, para simular condiciones de conservación anaerobias.

Vial 3 (GZ), donde se añadió una mezcla glucosa:fructosa:sacarosa en concentración (5,7 g azúcares totales/100 g fresa) y proporción (42:37:21) que

simulaban las existentes en fresa fresca (Belitz y Grosch, 1997); el vial fue cerrado con un *septum* de goma.

Los tres viales fueron almacenados en oscuridad en una cámara termostaticada a 25°C.

2.3 – ANÁLISIS

Se realizó un seguimiento de la evolución de las disoluciones por HPLC con detección por espectrofotometría de diodos (HPLC-DAS) y medida del espectro de absorción UV-vis. Para la identificación de los productos formados se realizaron análisis puntuales por HPLC con doble detección por espectrofotometría de diodos y por espectrometría de masas (HPLC-DAS-MS).

Se realizaron tomas periódicas de muestras a lo largo de 8 meses, recogándose en cada caso el volumen mínimo suficiente para la realización de los análisis. En el vial **GsinOx** la toma de muestra era extraída por punción a través del *septum* para evitar la exposición al oxígeno. La primera muestra (día cero) era recogida 2 horas después de la preparación de las disoluciones.

2.3.1 – CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA CON DETECCIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE DIODOS (HPLC-DAS)

Las condiciones cromatográficas utilizadas corresponden a las optimizadas para el análisis de antocianos de la fresa descritas en el Capítulo IV, apartado 1.3. La cuantificación se realizó a partir de las áreas de los picos obtenidos en los cromatogramas registrados a 520 nm (pigmento) y 280 nm (nuevos compuestos formados). Para la cuantificación del antociano, se ha utilizado la ecuación de calibrado mencionada en el Capítulo IV, apartado 2.5.

2.3.2 – ESPECTROMETRÍA DE MASAS ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC-MS)

Las condiciones cromatográficas son idénticas a las utilizadas en el apartado anterior, excepto en lo que se refiere al equipo, ya detallado en el Capítulo III, apartado 1.

La detección por espectrometría de masas se llevó a cabo utilizando una fuente de ionización a presión atmosférica (API) con una interfase de ionización por *electrospray* (ESI) (Cap. III, apartado 1). El cromatógrafo estaba conectado al espectrómetro de masas a la salida del detector de fotodiodos. Tanto el gas auxiliar como el envolvente eran una mezcla de nitrógeno y helio. Las condiciones empleadas para la obtención de los espectros de masas correspondían a las anteriormente optimizadas en el laboratorio para el análisis de antocianos y eran las siguientes:

Temperatura del capilar: 195°C

Voltaje del capilar: 4 V

Flujo del gas envolvente (N₂): 80 (unidades arbitrarias)

Flujo del gas auxiliar (N₂): 20 (unidades arbitrarias)

Gas de colisión: He

Detección: modo positivo

intervalo de masas: $120 \leq m/z \leq 1500$

Energía normalizada de colisión: 45%

En todos los casos, el espectrómetro se programaba para realizar tres barridos consecutivos: uno del espectro total de masas (*full scan*), otro correspondiente al espectro de masas generado por ruptura del ion mayoritario en el primer barrido, aplicando una energía relativa de colisión del 45% (MS-MS), y un tercero correspondiente al espectro de masas generado tras la ruptura del fragmento mayoritario obtenido en el espectro MS-MS, utilizando la misma energía relativa de colisión (MS³).

2.3.3 – MEDIDAS ESPECTRALES

a. Espectro ultravioleta-visible (UV-Vis)

Se registró el espectro UV-Vis de cada toma de muestra en un espectrofotómetro de diodos, en el intervalo comprendido entre 200 y 700 nm, utilizando una cubeta de cuarzo de 0,1 cm y la solución tampón citrato (pH 3,5) como referencia.

b. Índice de pardeamiento (IP o *Brown Index*)

En numerosos estudios se ha recurrido a la monitorización de compuestos pardos para seguir los cambios de color. En el caso concreto de la mermelada de fresa, Spayd y Morris (1981) propusieron utilizar la expresión A_{520}/A_{430} como estimación de la razón entre pigmentos antociánicos y productos de degradación. Skrede *et al.* (1983) hicieron una comparación estadística de distintos métodos y variables instrumentales para pronosticar la percepción sensorial del pardeamiento empleando como modelo jarabes de grosella, concluyendo que la razón entre absorbancias A_{520}/A_{420} proporcionaba las mejores estimaciones del color, con la ventaja de ser independiente del contenido inicial de pigmento. Con este índice se podían determinar niveles absolutos de aceptabilidad para la evaluación visual del color de estos jarabes. Esta razón de absorbancias es equivalente a la razón $A_{\lambda_{\text{máx}}}/A_{420}$, frecuentemente usada como una medida de la calidad del color en otros productos que contienen antocianos (Rwabahizi y Wrolstad, 1988, Garzón y Wrolstad, 2001, Glories, 1984). Para el presente estudio, como medida del “Índice de Pardeamiento” (o *Brown Index*, según definición realizada por Malien-Aubert *et al.*, 2001) se ha optado por utilizar la relación entre las absorbancias obtenidas a 500 nm (longitud de onda de máxima absorción de Pg-3-gluc) y a 430 nm. Estas longitudes de onda se seleccionaron al haberse observado que son representativas de las áreas del espectro que sufren los mayores cambios de absorbancia en el proceso de modificación del color experimentado en las disoluciones modelo.

3 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 – EVOLUCIÓN DE PELARGONIDINA 3-GLUCÓSIDO EN DISOLUCIONES MODELO

La evolución del antociano en las tres disoluciones modelo estudiadas se representa en la figura VI.2.

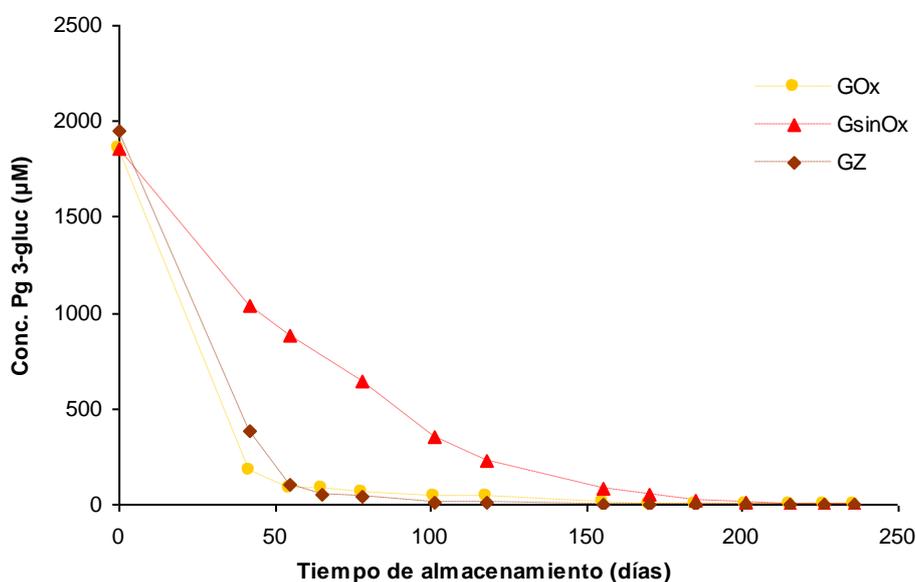


Figura VI.2 – Evolución de la concentración de pelargonidina 3-glucósido en los tres sistemas modelo ensayados.

Apenas se observaron diferencias en la tasa de pérdida del antociano en los viales GOx (con oxígeno) y GZ (oxígeno y azúcares). Esto indica que la presencia de azúcares en proporciones equivalentes a las que existen naturalmente en la fresa no es suficiente para proteger a los pigmentos antociánicos de su degradación cuando se encuentran en disolución acuosa. En todo caso, en los dos primeros meses la velocidad de desaparición aparente es algo menor en presencia de azúcares, lo que podría ser indicativo de un ligero efecto protector sobre el pigmento, aunque, de existir, éste sería mínimo.

Se ha indicado que la adición de azúcar (sacarosa) a fresa fresca antes de la congelación ayuda a preservar su color por retardar el pardeamiento y el desarrollo de

pigmentos poliméricos, que pueden tener origen en reacciones degradativas enzimáticas y/o no enzimáticas (Wrolstad *et al.*, 1990). Este efecto protector debe producirse durante el propio proceso de congelación o la descongelación más que en el almacenamiento, existiendo diversos mecanismos que podrían explicarlo. Por un lado, la existencia de una menor actividad de agua supondría la inhibición de enzimas β -glucosidasa y polifenoloxidasas, que pueden estar implicadas en procesos de degradación antociánica y de pardeamiento fenólico; igualmente se encontrarían más dificultados los procesos químicos de pardeamiento, como las reacciones de Maillard, responsables de la formación de productos pardos y también de sustancias capaces de intervenir en reacciones de condensación fenólica, como el furfural (Es-Safi *et al.*, 2000; Es-Safi *et al.*, 2002b). Por otro lado, la sacarosa podría producir interferencias estéricas en las reacciones de condensación fenólica responsables del pardeamiento, así como sobre la interacción entre antocianos y ácido ascórbico, que también podría estar implicada en la degradación de este tipo de pigmentos (Poei-Langston y Wrolstad, 1981; King *et al.*, 1979). No obstante, este efecto positivo sólo parece producirse en presencia de una concentración elevada de azúcar en el medio ($\geq 20\%$). De esta manera, la proporción de azúcares existente en el sistema modelo GZ (5,7%) sería demasiado baja para ejercer un efecto protector relevante. Algunas investigaciones realizadas en las décadas de 1950 y 1960, citadas por Markakis (1982), sugieren incluso que la presencia de azúcar en baja proporción podría acelerar la degradación de antocianos. Una observación similar fue realizada por (Calvi y Francis, 1978), quienes atribuyen el efecto negativo a la formación de productos de degradación de los azúcares e indican que el mismo podría ejercerse a partir de un nivel umbral de 100 ppm. En este sentido, la posible aparición de productos de degradación de los azúcares podría ser la responsable de la aparente aceleración del proceso de degradación del antociano que se observa a partir del día 55 en la disolución GZ con respecto al sistema sin azúcar GOx, aunque esta observación está matizada por el hecho de que en ambos casos en ese momento existen ya sólo contenidos casi residuales de pigmento. Según lo recogido por Markakis (1982), fructosa, arabinosa, lactosa y sorbosa serían más perjudiciales que sacarosa, glucosa y maltosa.

Como se podía esperar, la degradación de Pg 3-glucósido es bastante más lenta en ausencia de oxígeno (GsinOx) que en su presencia. Al cabo de un mes de almacenamiento a 25°C, la concentración de pigmento presente en las disoluciones es alrededor de un 57% de la inicial en GsinOx y de un 20% en GOx. Después de dos meses, solamente existe un 4,5% de la concentración inicial de Pg 3-glucósido en GOx, mientras que en ausencia de oxígeno se retiene en torno al 48%.

La aceleración del proceso de degradación antocianos en presencia de oxígeno molecular ha sido registrada por diversos autores (Markakis, 1982; Mazza y Miniati, 1993; Henry, 1996), tanto en disoluciones de antocianos purificados (Poei-Langston y Wrolstad, 1981; (Kallio *et al.*, 2000) como en sistemas alimentarios (Clydesdale *et al.*, 1978). El efecto negativo del oxígeno sobre los antocianos parece estar también en relación con otros factores que influyen sobre la estabilidad antociánica, como el pH y la presencia de ácido ascórbico. En general, se asume que la estabilidad de los antocianos en presencia de oxígeno disminuye marcadamente al aumentar el pH (Markakis, 1982). No obstante, Cabrita *et al.* (2000) encontraron que los antocianos que contienen un único grupo hidroxilo libre en el anillo B, como el 3-glucósido de pelargonidina, además de la condición muy estable que adoptan en disoluciones acuosas ácidas relativamente fuertes (pH 1 - 3), también presentan gran estabilidad en la región alcalina, a valores de pH de 8 – 9. La zona de menor estabilidad se situaría en el intervalo de pH entre 5 y 7, siendo mínima en torno a neutralidad. De acuerdo con ello, el pH de las disoluciones modelo empleadas en este estudio (pH = 3,5) se situaría en una zona relativamente segura para el tipo de antociano, aunque hay que tener en cuenta que existen otros factores (concentración, composición del tampón, etc.) que también pueden influir sobre la estabilidad de los antocianos frente al pH en medio acuoso. En todo caso, la concentración de antociano y el pH utilizados son iguales en los tres sistemas, por lo que no explicarían las diferencias de estabilidad observadas entre los mismos.

El proceso de oxidación de ácido ascórbico catalizado por metales de transición como el hierro lleva a la formación de peróxido de hidrógeno, cuya acción decolorante sobre los antocianos está claramente establecida (Markakis, 1982). La pérdida de estabilidad de Pg 3-glucósido por la adición de ácido ascórbico a sistemas modelo ya fue constatada por Poei-Langston y Wrolstad (1981). La ausencia de ácido ascórbico en las disoluciones utilizadas en este estudio hace que se deba también excluir esta vía para explicar la mayor tasa de degradación observada en presencia de oxígeno y lleva a suponer en una acción oxidante directa sobre el antociano.

Labuza y Riboh (1982) señalaron que las tasas de reacciones relacionadas con la calidad se ajustan a reacciones de orden cero o de orden uno, existiendo, en general, diferencias estadísticas insignificantes entre los dos tipos. En nuestro estudio la pérdida de Pg 3-glucósido es aparentemente exponencial en los tres sistemas, lo que indicaría la existencia una reacción de degradación de primer orden. Cinéticas de degradación de primer orden han sido también registradas para el mismo pigmento en zumos (Garzón y

Wrolstad, 2001) y concentrados de fresa (Garzón y Wrolstad, 2002; Özkan *et al.*, 2002), así como en disoluciones de otros antocianos, como los de col roja, uvas (Baublis *et al.*, 1994), guindas (“sour cherry”), granada (Cemeroglu *et al.*, 1994; Özkan, Yemenicioglu *et al.*, 2002; Özkan, 2002), o rábano rojo (Giusti y Wrolstad, 1996b).

Una reacción de degradación de primer orden está descrita por la ecuación:

$$C = C_0 \cdot e^{-kt} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde

C = concentración de antociano a un tiempo determinado;

C₀ = concentración inicial de antociano;

k = constante de degradación;

t = tiempo.

cuya regresión lineal corresponde a:

$$\ln C_i = \ln C_0 - k \cdot t_i \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde

$\ln C_i$ = logaritmo neperiano de la concentración de antociano en el tiempo t_i ;

$\ln C_0$ = logaritmo neperiano de la concentración inicial de antociano.

Aunque en los tres sistemas estudiados se obtuvieron buenos coeficientes de correlación al realizar la regresión lineal, la existencia de una cierta curvatura al realizar la representación gráfica de las dos variables – $\ln C_i$ y t_i – para el período integral de almacenamiento (figura VI.3), parece sugerir que el modelo de regresión lineal no es el más idóneo para los sistemas observados. Una ausencia de linealidad similar fue observada por Garzón y Wrolstad (2001) en estudios realizados con pelargonidina 3-soforósido-5-glucósido y, según citan estos mismos autores, también anteriormente por Erlandson y Wrolstad (1972) para la degradación de antocianos de fresa liofilizados y almacenados bajo distintos grados de humedad relativa. En este sentido, hay que indicar que las cinéticas de primer orden encontradas por otros autores han sido calculadas para períodos de almacenamiento mucho más cortos que el utilizado en este estudio, lo que posiblemente pueda explicar las desviaciones existentes en el modelo descriptivo. De hecho, si en nuestro caso se consideran sólo los dos primeros meses de almacenamiento se encuentra que existe una linealidad prácticamente total en los tres sistemas, lo que estaría de acuerdo con las observaciones de esos autores.

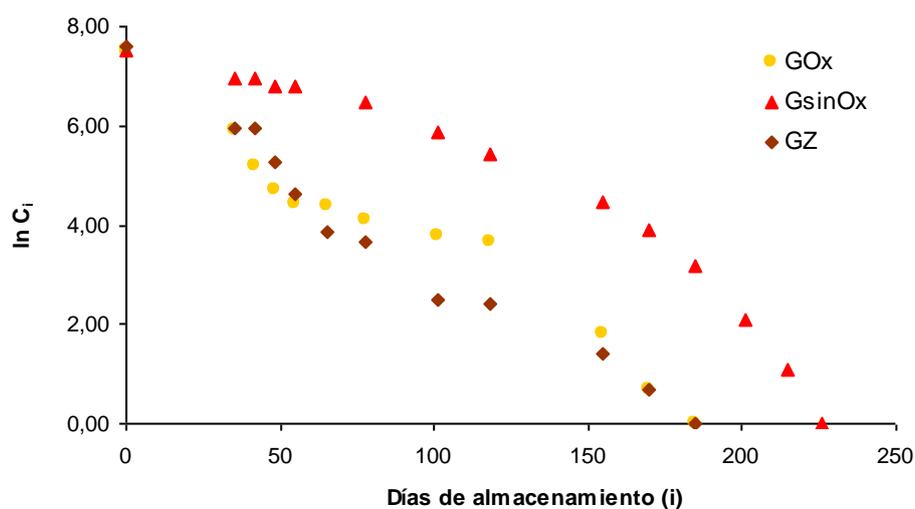


Figura VI.3 - Representación gráfica del logaritmo neperiano de la concentración remanente de Pg 3-glucósido vs tiempo de almacenamiento.

A efectos prácticos, para calcular los parámetros de degradación del antociano: tasa de degradación (k) y tiempo de media vida ($t_{1/2}$) – tiempo que tarda en reducirse a la mitad el contenido inicial de Pg 3-glucósido – se ha considerado el modelo de regresión lineal obtenido para del período comprendido entre los días 0 y 55, en el que existe mayor linealidad y donde se pierde más del 50% de la concentración inicial de pigmento en los tres sistemas. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla VI.1. En todo caso, se debe señalar que los valores obtenidos para estos parámetros no diferían de manera importante cuando para su cálculo se considera la regresión lineal obtenida para el período integral de almacenamiento.

Como se puede comprobar y se había comentado en el apartado anterior, la tasa de degradación es notablemente menor en ausencia de oxígeno, con un tiempo de media vida del antociano en el ensayo que alcanza los 48 días. Este tiempo se reduce drásticamente en presencia de oxígeno a 13 días y medio. De manera unánime se considera la temperatura como el factor más importante sobre la cinética de la degradación del color de productos derivados de fresa (Garzón y Wrolstad, 2002), aunque la disponibilidad de oxígeno se considera también un factor determinante (Skrede *et al.*, 1983). La influencia de este último sobre la estabilidad de los pigmentos antocianícos es confirmada en los estudios aquí realizados.

Tabla VI.1 - Parámetros de la regresión lineal de la degradación de Pg 3-glucósido calculados en el período 0 - 55 días para los sistemas modelo GOx, GsinOx y GZ.

<i>Sistema Modelo</i>	<i>Tasa de degradación, k (días⁻¹)</i>	<i>r²</i>	<i>Tiempo de media vida, t_{1/2} (días)</i>
GOx	-5,7x10 ⁻²	0,98	13,6
GsinOx	-1,4 x10 ⁻²	0,98	48,0
GZ	-5,0 x10 ⁻²	0,98	15,9

Como se había apuntado anteriormente, durante los dos primeros meses de almacenamiento la presencia de azúcares parece ejercer un cierto efecto protector del antociano, lo que también se pone de manifiesto en el aumento en su tiempo de media vida en el ensayo GZ (15,9 días) con relación a lo observado en el ensayo GOx (13,6 días). No está claro cómo se ejercería este posible efecto protector. Una posible explicación podría estar en la influencia del azúcar sobre la actividad de agua (a_w) del sistema. En medios modelo se ha demostrado que la extensión de la destrucción de Pg 3-glucósido aumenta al hacerlo la a_w , especialmente para valores de ésta superiores a 0,66 (Garzón y Wrolstad, 2001).

El efecto protector de los azúcares no se observa a partir del día 55, después del cual la desaparición del pigmento se produce de manera algo más rápida en la disolución GZ que en la GOx. No obstante, hay que tener en cuenta que en ese momento en las disoluciones existe sólo ya menos de un 6% de antociano remanente, por lo que en la práctica esta posible influencia negativa del azúcar sobre la estabilidad del mismo se puede considerar casi irrelevante en el contexto del ensayo realizado. La mayor actividad degradativa aparente en esta etapa podría derivar de la presencia en el medio de compuestos de degradación de los azúcares.

Garzón y Wrolstad (2001, 2002) observaron que la estabilidad de Pg 3-glucósido depende, en gran extensión, de la composición del sistema en el cual se encuentran los antocianos. Zumo y concentrado de fresa enriquecidos con los mismos derivados de pelargonidina y en la misma concentración, presentaban valores de $t_{1/2}$ del pigmento bastante distintos (de 8 – 12 días y 3,5 - 5 días, respectivamente). Para ellos, está claro que los componentes del entorno del antociano, entre los que se encuentran los azúcares, están definitivamente involucrados en su degradación. Con relación a la influencia del entorno, ya anteriormente, Wightman y Wrolstad (1995) habían registrado en zumo de arándano que la destrucción de antocianos era más pronunciada después de la remoción de la pulpa (zumo clarificado), por la acción deletérea que resulta de la presencia de enzimas; una posible inhibición competitiva podría retardar la hidrólisis del

antociano en el fruto exprimido no clarificado. También Iversen (1999), estudiando el efecto del procesado y almacenamiento sobre los pigmentos del néctar de grosella, terminó considerando que la cinética de degradación de los antocianos depende fuertemente de la naturaleza global del sistema.

En estudios hechos con zumos y concentrados de fresa, Garzón y Wrolstad (2002) y Giusti y Wrolstad (1996) observaron que, en relación con la tasa de degradación de Pg 3-glucósido, las muestras de zumo eran significativamente más estables que las de concentrado. El proceso tecnológico de concentración hacía disminuir el contenido de antocianos del concentrado con respecto al zumo. El enriquecimiento posterior del zumo y del concentrado con antocianos conducía a un descenso en la tasa de degradación. Las muestras estudiadas por estos investigadores (antes de ser enriquecidas) tenían concentraciones antociánicas inferiores ($0,6 \times 10^{-3}$ M y $0,5 \times 10^{-3}$ M, en zumo y concentrado, respectivamente) a las utilizadas en nuestro estudio y, en condiciones de almacenamiento similares, ellos encuentran, de hecho, tasas de degradación superiores ($-0,079$ y $-0,21$ días⁻¹, en zumo y concentrado, respectivamente), y $t_{1/2}$ inferiores, lo que estaría de acuerdo con la influencia apuntada de la concentración de pigmento. Garzón y Wrolstad (2002) consideran igualmente que la concentración del antociano es más importante que el tipo de antociano en causa, lo que ya había sido sugerido por Markakis (1982) y registrado en los estudios realizados por Taylor (1989) y Skrede *et al.* (1992).

3.2 – ENSAYOS REALIZADOS EN PRESENCIA DE OXÍGENO (GOX)

3.2.1 – FORMACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS

En la figura VI.4 se recogen cromatogramas de HPLC que reflejan la evolución del perfil de composición de la disolución GOx a lo largo del tiempo de almacenamiento. Se puede comprobar que la disminución del pico de Pg 3-gluc se acompaña de la formación de nuevos compuestos, entre los cuales se han marcado con letras aquéllos más importantes para los cuales se podido obtener alguna información para su identificación (picos **a-g**). Las características (longitud de onda de máxima absorción, ion molecular y patrón de fragmentación) de estos productos se recogen al final del capítulo en la tabla resumen VI.5. No fue posible conseguir información que permitiera especular sobre la identidad de los picos localizados en la parte final de los

cromatogramas. En general, esos picos no son observados de manera regular ni se mantienen a lo largo del tiempo, sino que corresponden a sustancias diferentes en cada cromatograma, por lo que cabe pensar que se trata de productos de naturaleza transiente en evolución hacia otros compuestos. Se supone que los mismos pueden estar implicados, al menos en parte, en el pardeamiento observado en la disolución (ver apartado siguiente).

Lo que se sabe hasta al momento sobre el mecanismo de degradación no enzimática de antocianos deriva fundamentalmente de los trabajos realizados en sistemas acuosos simples por Furtado *et al.* (1993), Piffaut *et al.* (1994) y Seeram *et al.* (2001). Está bien establecido que la presencia de sustituyentes azucarados aumenta la estabilidad de los antocianos y que los aglucones en disolución son altamente inestables. Piffaut *et al.* (1994) encontraron que los productos formados en la degradación de los antocianos eran los mismos tanto tras la hidrólisis enzimática de los enlaces glicosídicos, como en el proceso no enzimático de degradación térmica, por lo que asumieron que el mecanismo de degradación era similar en ambos. Los productos finales encontrados por esos autores eran, por otra parte, iguales a los detectados por Furtado *et al.* (1993) en el proceso de degradación térmica de antocianidinas. De acuerdo con éstos, las antocianidinas (aglucones antociánicos) sufrirían una fácil hidratación y apertura del anillo C para formar una estructura calcona, que se rompería seguidamente para dar lugar a dos fragmentos, un aldehído fenólico y un ácido benzoico, derivados respectivamente de los anillos A y B de la antocianidina. En coherencia con lo anterior, como productos de la degradación de pelargonidina 3-glucósido se deberían esperar: ácido *p*-hidroxibenzoico, derivado del resto correspondiente al anillo B, y 2,4,6-trihidroxibenzaldehído, procedente del anillo A. El esquema de la degradación de la Pg 3-glucósido de acuerdo a este mecanismo, basado en la propuesta hecha por Piffaut *et al.* (1994) para la degradación de 3,5-diglucósido de malvidina, se encuentra representado en la figura VI.5. El 2,4,6-trihidroxibenzaldehído que se forma a partir del resto correspondiente al anillo A podría ser luego oxidado a ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico y posteriormente descarboxilado para formar floroglucinol (Furtado *et al.*, 1993; Piffaut *et al.*, 1994), aunque esta última reacción exigiría períodos de evolución más largos (Furtado *et al.*, 1993) o condiciones más drásticas de temperatura (Piffaut *et al.*, 1994).

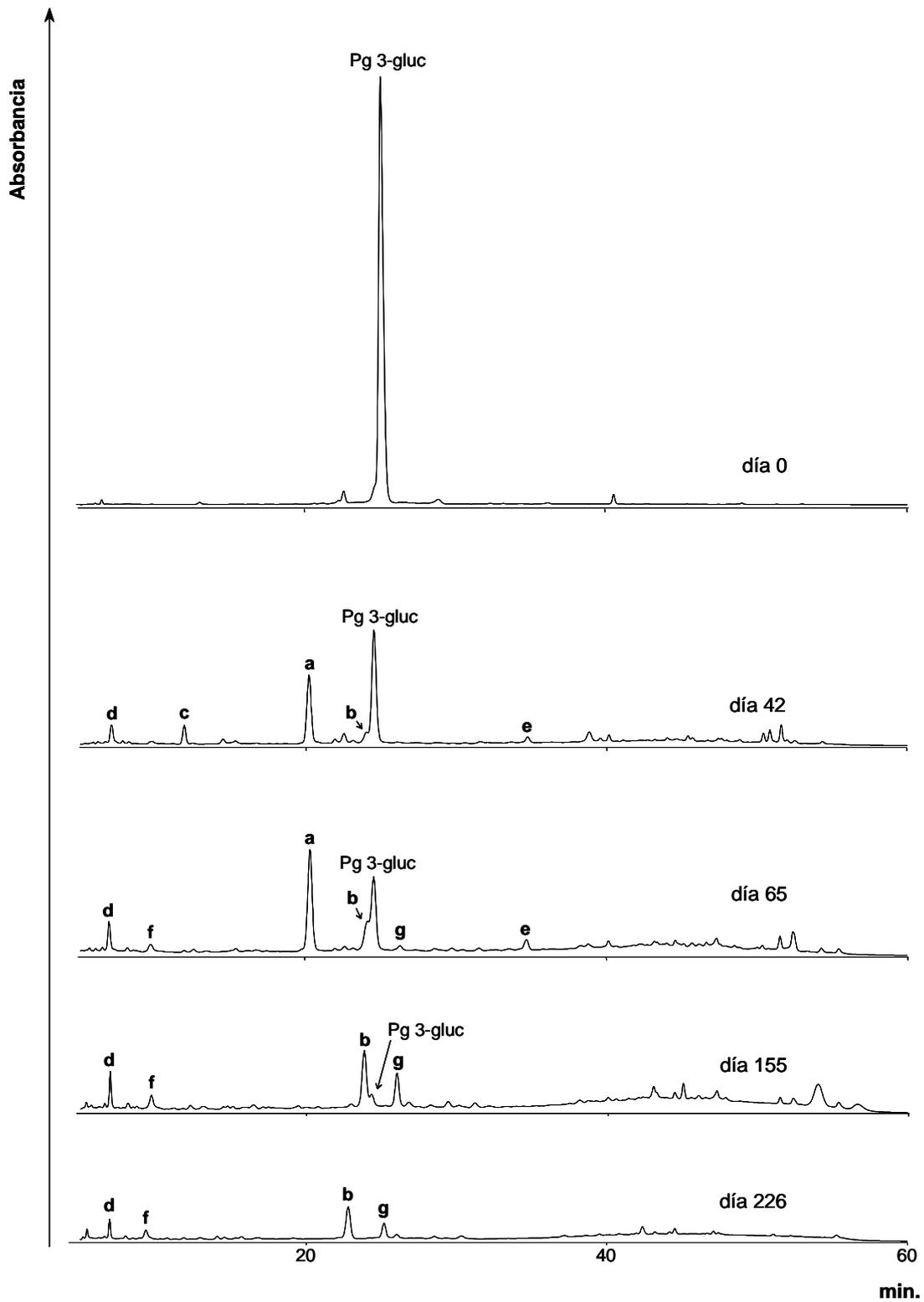


Figura VI.4 - Cromatogramas registrados a 280 nm para el ensayo GOx en los días 0, 42, 65, 155 y 226. La escala es la misma en todos los cromatogramas.

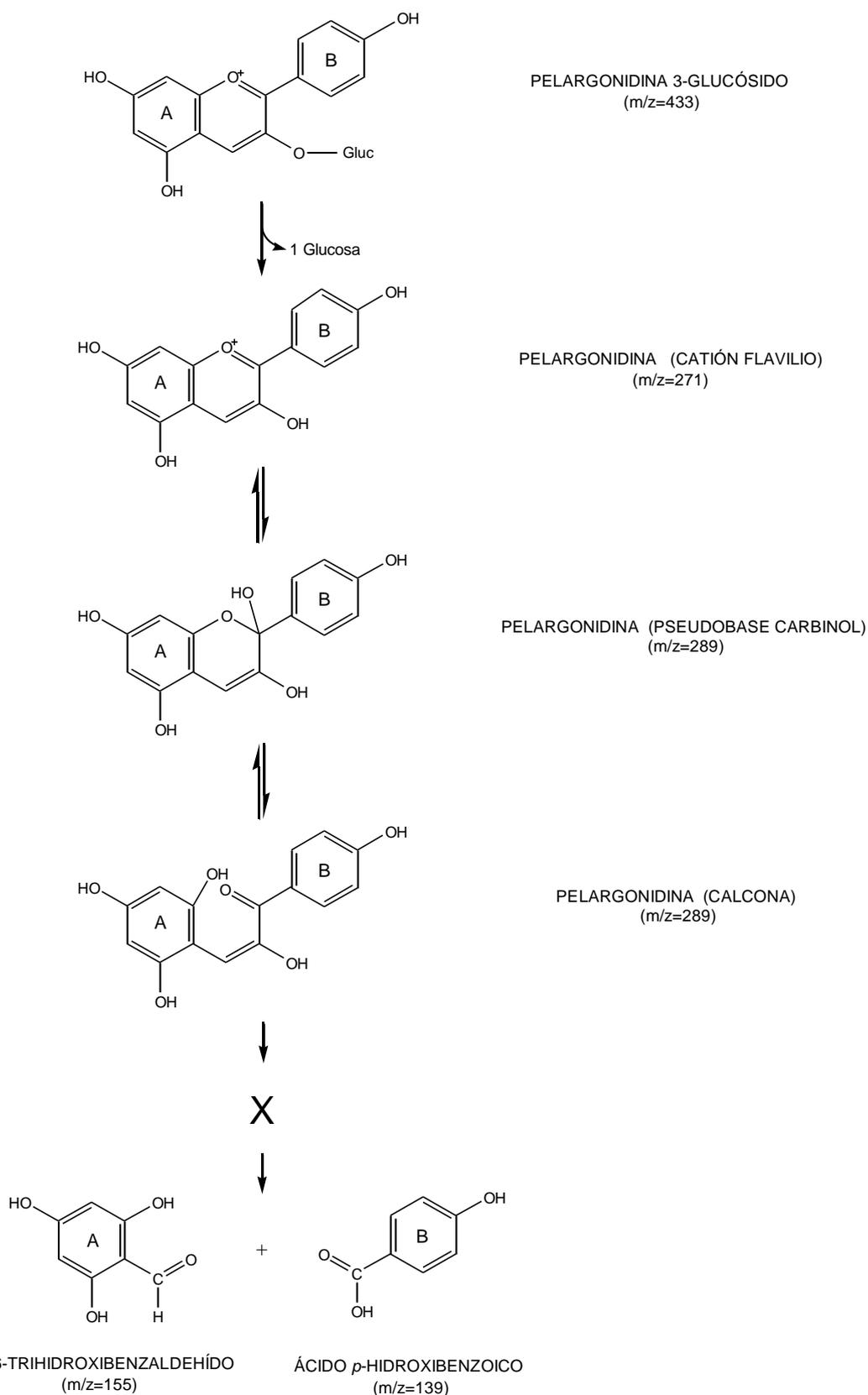


Figura VI.5 – Esquema hipotético de la degradación térmica de Pg 3-glucósido basado en el mecanismo propuesto por Piffaut *et al.* (1994). Las relaciones m/z indicadas corresponden al ion molecular del compuesto obtenido en modo positivo.

Para que se produzca la formación de benzaldehído y de ácido benzoico a partir de los anillos A y B es necesaria la pérdida de un átomo de carbono de la estructura original del antociano, que no ha sido aclarada en ninguno de los estudios anteriores. La escisión en C-2/C-3, sugerida por Maccarone *et al.* (1987), produciría el ácido benzoico correspondiente al anillo B, pero debería dar lugar a un fenilacetaldehído a partir del anillo A. Igualmente la escisión en C-3/C-4 llevaría a un ácido fenilacético derivado del anillo B. Productos de tipo fenilacético y fenilpropiónico han sido encontrados tras procesos de degradación microbiana de antocianos (Scheline, 1991) y otros flavonoides (Kim *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1989), pero no han llegado a observarse en los estudios de degradación química de antocianos en medios modelo. Para justificar la indicada pérdida del carbono, Piffaut *et al.* (1994) sugieren que debe formarse un producto intermediario no detectado por ellos (X en el esquema de la figura VI.5) antes de producirse la separación de los dos fragmentos. Furtado *et al.* (1993) ofrecen como explicación un posible mecanismo que supondría la hidrólisis en C-4 con formación de un aducto hidroxilo de la calcona intermediario, como el que se recoge en la figura VI.6(b), que daría lugar al benzaldehído derivado del anillo A y a una α -hidroxiacetofenona inestable, cuya hidrólisis produciría el ácido benzoico correspondiente al anillo B. Aunque no obtuvieron evidencias sobre la formación del aducto calcona intermediario, sugieren que el mismo podría derivar de la hidratación en C-4 del catión flavilio [figura VI.6(a)] y subsecuente hidrólisis en posición 2 del aducto en C-4 y apertura del heterociclo para formar la calcona hidroxilada [figura VI.6(b)]. La pseudobase hidratada en C-4 [figura VI.6(a)] puede producirse en pequeñas cantidades junto a la más favorecida hidratada en C-2 (Brouillard *et al.* 1982), aunque su proporción podría aumentar en condiciones termodinámica o cinéticamente favorables (por ejemplo, exposición a radiación UV). Por otra parte, Hrazdina (1970) indica que la oxidación en medio acuoso de antocianos que no poseen grupos *orto*-dihidroxi en el anillo B, como sería el caso de Pg 3-gluc, produce la ruptura en C-2/C-3 dando lugar a ésteres de tipo fenilacético/fenilbenzoico cuya hidrólisis posterior podría explicar la formación de productos como los encontrados por Piffaut y Furtado.

En los cromatogramas de la figura VI.4 se puede observar como los primeros productos que aparecen en la disolución a medida que se produce el descenso en la concentración corresponden a los identificados por las letras **a** – **e**, entre los que destaca el pico **a**. La masa de este compuesto pudo ser establecida mediante análisis de HPLC-MS (ion molecular positivo de m/z 155) [Figura VI.7(a)]; este dato junto su espectro UV [Figura VI.7(b)] y las características de retención cromatográfica

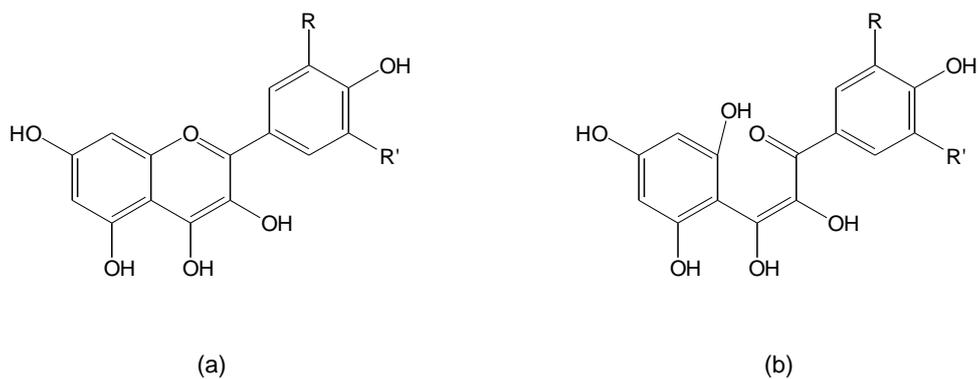


Figura VI.6 – Hipotéticas estructuras intermediarias en la degradación de Pg 3-glucósido: (a) aducto hidroxilado en la posición C4 de la antocianidina (b) aducto hidroxilado de la calcon intermediario.

T: + c ESI Full ms

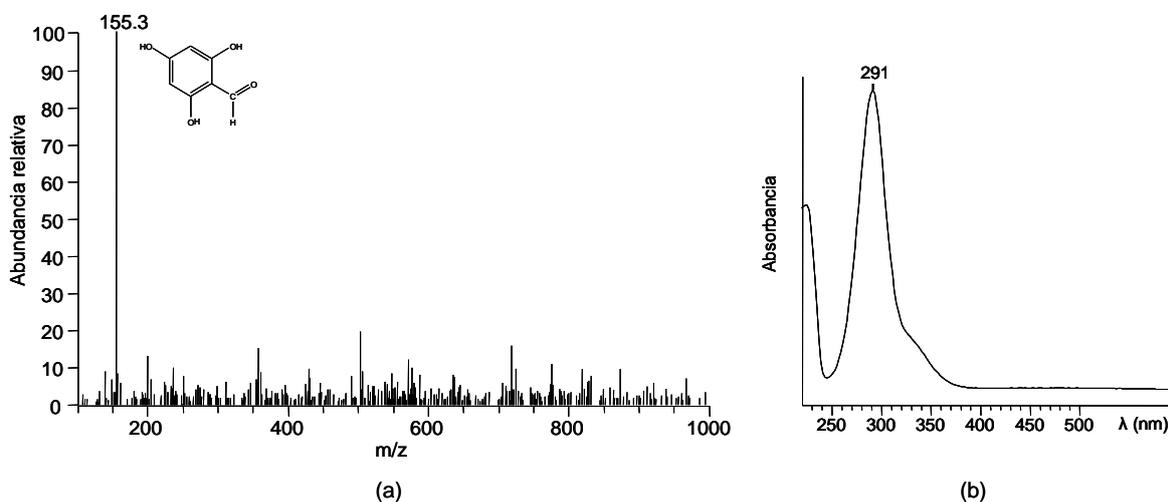


Figura VI.7 – Características espectroscópicas del compuesto a: (a) espectro de masas, *full scan*; (b) espectro UV-Vis.

permitieron identificarlo inequívocamente como 2,4,6-trihidroxibenzaldehído (THB), aspecto que se confirmó por cocromatografía con un patrón de este compuesto. Como se ha indicado anteriormente, este compuesto resultaría del fragmento derivado del anillo A del antociano, producido tras la ruptura del heterociclo. Su formación en las disoluciones estaría de acuerdo con el mecanismo de degradación térmica propuesto en la figura VI.5.

Se realizó, asimismo, un ‘rastreo’ de los cromatogramas obtenidos a lo largo del tiempo (búsqueda por masas, tiempos de retención y espectro UV) para detectar la posible presencia de ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico y floroglucinol, que de acuerdo con Furtado *et al.* (1993) podrían formarse a partir del THB, éstos no llegaron a ser

encontrados. Como ya se ha indicado, su formación parece requerir condiciones más exigentes de tiempo de temperatura, aunque tampoco se puede descartar que pudieran haberse producido ciertas cantidades de florogucinol seguidas por una rápida reacción del mismo con el antociano u otros productos de su degradación. Este último proceso ya fue observado previamente en nuestro laboratorio en ensayos modelo realizados con malvidina 3-glucósido en condiciones similares de tiempo y temperaturas, aunque en disoluciones de composición diferente (Santos-Buelga *et al.*, 1999).

Por comparación con patrones de diversos ácidos fenólicos se pudo establecer la identidad del pico **c** (espectro UV en la figura VI.8) como ácido *p*-hidroxibenzoico (*p*-HB), producto que derivaría del fragmento correspondiente al anillo B. Esta identificación no pudo ser confirmada por análisis de EM, ya que, en las condiciones utilizadas, no fue posible la ionización del mismo. En este sentido, se debe indicar que la ionización de los ácidos fenólicos no es fácil, al exigir umbrales energéticos elevados y, por tanto, la sensibilidad del detector de masas para la detección de estos compuestos es inferior a la existente para otras sustancias fenólicas, como han ya señalado otros autores (Määttä *et al.*, 2003; Tomás-Barberán *et al.*, 2001). Este pico apenas se detectaba ya en las muestras a partir del día 48 de ensayo, indicando su inestabilidad y/o reacción con otros productos del medio. Algo similar ocurre en el caso del pico **a**, si bien el mismo se mantiene durante más tiempo en la disolución antes de desaparecer (deja de detectarse a partir del día 170 del ensayo).

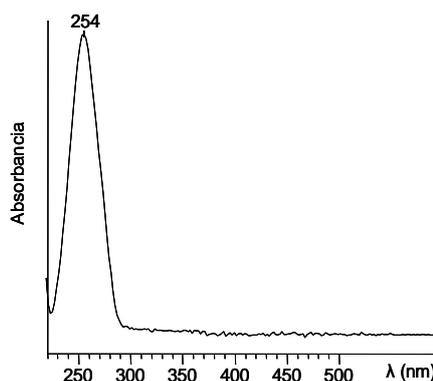


Figura VI.8 – Espectro UV-Vis del compuesto **c**, el ácido *p*-hidroxibenzoico.

La presencia de los productos **a** y **c** en la disolución permite confirmar la validez del mecanismo de degradación propuesto por Furtado *et al.* (1993) y Piffaut *et al.* (1994), por lo se procedió a buscar en los cromatogramas correspondientes a las muestras analizadas donde aún se detectaba antociano, la presencia de alguna de las posibles estructuras intermedias anteriores al proceso de fragmentación del heterociclo antocianico. Se pudo, así, establecer la formación del aglucón (pelargonidina), que

aparecía en pequeñas cantidades en cromatogramas registrados con anterioridad al día 42 de ensayo. Como ejemplo, en la figura VI.9 se muestra un cromatograma registrado a 520 nm el día 35, cuyo espectro UV-Vis coincide el del aglucón y cuya identidad pudo también establecerse a partir de su espectro de masas (ion molecular en modo positivo de m/z 271) y por comparación con pelargonidina obtenida por hidrólisis ácida del Pg 3-glucósido. Las cantidades del aglucón detectadas no eran nunca demasiado grandes, lo que estaría en consonancia con la asumida inestabilidad del mismo. Por otra parte, su identificación en las disoluciones parece sugerir que la hidrólisis previa del azúcar constituye el primer paso en el proceso de fragmentación del antociano. La aparición de los productos **a** y **c** en la disoluciones es muy rápida, observándose desde los primeros días del estudio (ver figura VI.16), lo que también coincide con lo descrito por Furtado *et al.* (1993), quienes indican la detección de productos resultantes de la ruptura hidrolítica desde el inicio del ensayo de degradación térmica en el caso de pelargonidina.

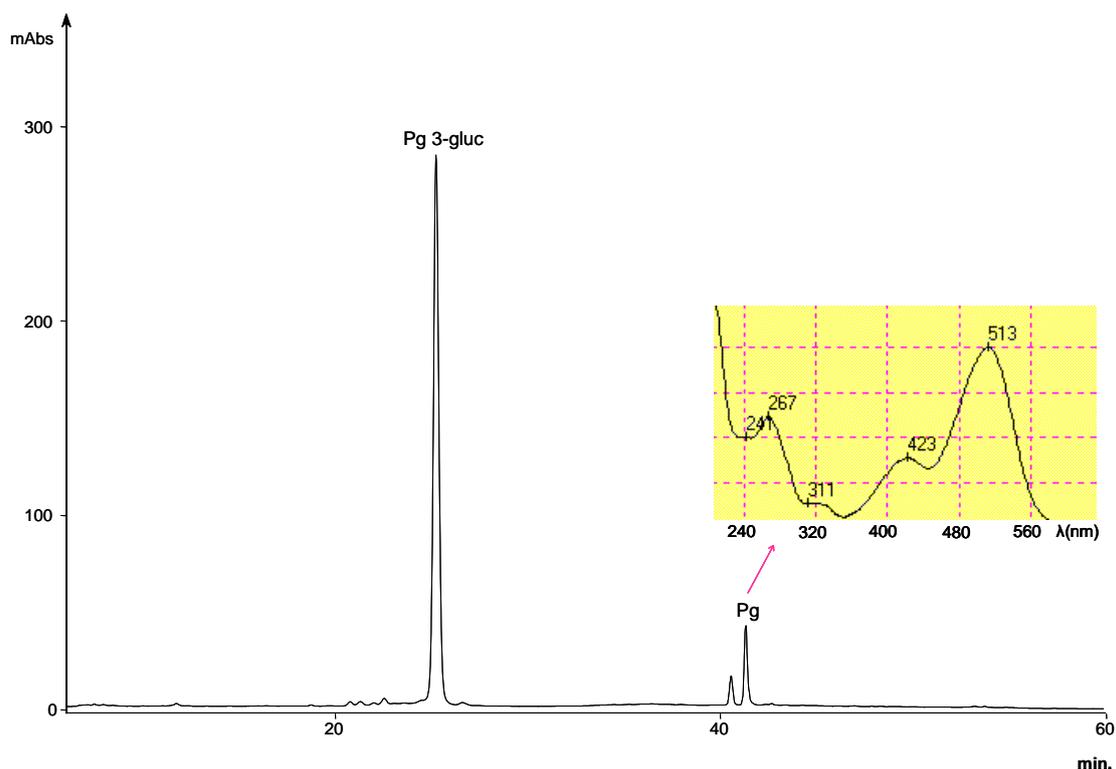


Figura VI.9 – Cromatogramas superpuestos (a 520 nm) del ensayo GOx en los días 0 y 35. La ventana enseña el espectro UV-Vis del pico correspondiente al aglucón pelargonidina.

Un pico también importante en los cromatogramas, cuya acumulación se produce cuando existen ya niveles bajos de antociano, es el pico **b** [espectro UV-Vis en la figura VI.10(b)]. El análisis por HPLC-MS permitió establecer para el mismo un ion molecular

en modo positivo de m/z 257 [figura VI.10(a)]. Este ion era de difícil fragmentación en MS^2 y cuando ésta era observada no respondía a un patrón constante, dando lugar a fragmentos diferentes según la ocasión y producidos con muy bajo rendimiento; uno de los fragmentos más normalmente (aunque no siempre) encontrado poseía una m/z de 209; en ningún caso se llegó a encontrar una pérdida de masa que pudiera atribuirse a la separación del resto glucosa (-162), indicando que no debe poseer sustituyente glucídico.

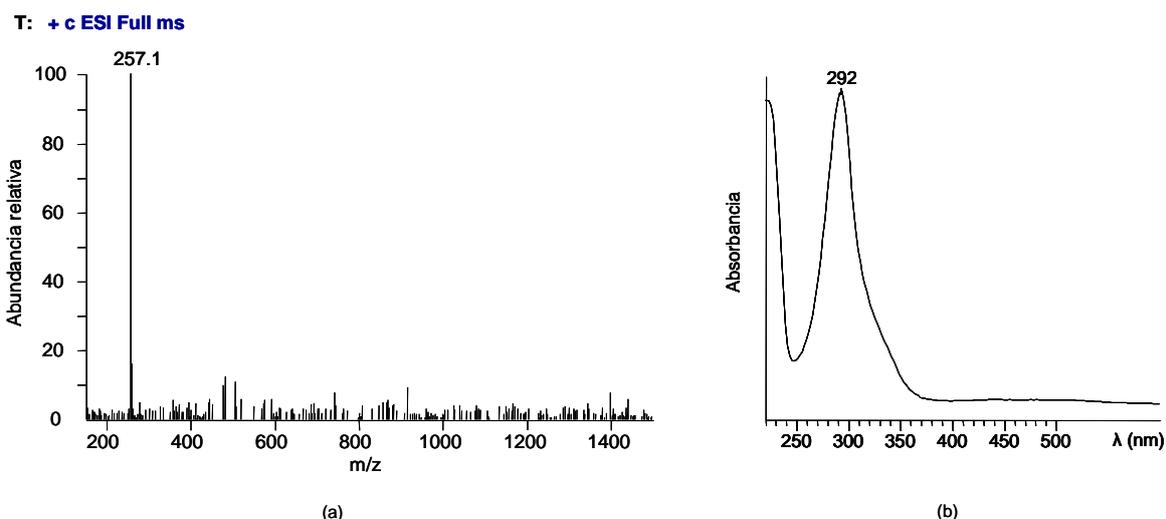


Figura VI.10 – Características espectroscópicas del compuesto **b**: (a) espectro de masas, *full scan*; (b) espectro UV-Vis.

Como posteriormente se comentará, el compuesto **b** es el principal producto acumulado en la disolución almacenada en ausencia de oxígeno (GsinOx), en la cual apenas se observa la formación de productos de la fragmentación del antociano (picos **a** y **c**), por lo que no cabe pensar que éstos puedan estar involucrados en la formación de **b**. Igualmente, el hecho de que el mismo se produzca en ausencia de oxígeno apunta a que su formación no comporta un proceso oxidativo. Parece pues que podría resultar de una modificación producida en la estructura del antociano. El hecho de que su masa sea inferior en 14 unidades a la de pelargonidina hacía pensar en la posible pérdida de un $-CH_2$, que sólo podría tener lugar a partir del C-4 del antociano; se podría formar así un derivado de tipo furánico. La formación de ese tipo de derivados por oxidación de sales de flavilio fue recogida por Hrazdina (1970). El único derivado furánico del antociano cuya masa encajaría con el ion molecular encontrado en el análisis de masas (m/z 257) sería el recogido en la figura VI.11; la pérdida de los tres sustituyentes hidroxilo explicaría la aparición del fragmento de m/z 209 observado de

manera ocasional en la fragmentación MS². Esta estructura no debería, sin embargo, corresponder al compuesto **b**, ya que la misma debe ser coloreada y, por tanto, mostrar máximos de absorbancia en la región del visible, lo que no ocurre en el caso del pico **b**. Además, la formación del mismo implicaría un proceso oxidativo.

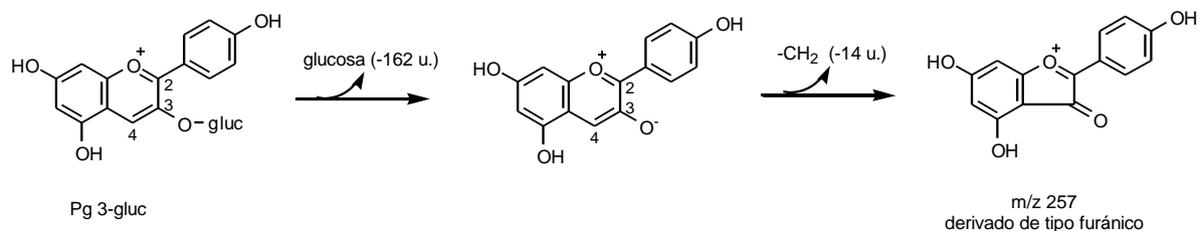
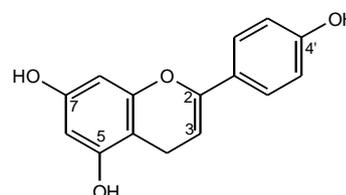


Figura VI.11 – Mecanismo hipotético de formación de un derivado de tipo furánico a partir de Pg 3-glucósido, en el proceso degradativo del antociano.

Otra posible estructura que encajaría con la masa encontrada para el compuesto es la correspondiente a un flaveno con tres sustituyentes hidroxilo (lo que también apoyaría la aparición del fragmento de m/z 209). La formación de una estructura de ese tipo implicaría la pérdida de uno de los cuatro hidroxilos existentes en la pelargonidina, lo que sería de difícil explicación. En apoyo de la posibilidad de que se pudiera tratar de un flaveno está el hecho de que la formación de productos de reducción de sales de flavilio fue ya reportada por Hrazdina (1972). En la figura VI.12 se realiza una propuesta en la cual los tres hidroxilos se han ubicado en las posiciones 5, 7 y 4', aunque no hay ningún elemento que nos permita descartar que el posible hidroxilo "perdido" fuera el originalmente localizado en el C-3 del heterociclo. La estructura del pico **b** permanece, en todo caso, sin asignar de manera definitiva.

Figura VI.12 – Estructura de un compuesto tipo flaveno, hipotéticamente obtenido a partir de Pg 3-glucósido.



Los picos **d** y **f** (datos de MS y espectro UV-Vis incluidos en la tabla resumen VI.5 presentada al final del capítulo) presentan idéntico ion molecular (m/z 487) y uno de los fragmentos producidos en su ruptura MS² (m/z 325, -162 unidades de masa) corresponde a la pérdida de una glucosa. Esto apunta a que ambos productos retienen

la estructura del antociano, aunque éste no debe encontrarse bajo su forma flavilio, ya que se trata de sustancias incoloras ($\lambda_{\text{máx}}$ 290 nm). No se ha encontrado una estructura satisfactoria para estos compuestos, aunque su mayor masa con relación a la del antociano sugiere que deben haberse formado por unión a éste de algún resto de baja masa molecular (poseen 54 unidades de masa más que Pg 3-gluc, lo que apuntaría hacia un resto con 3 átomos de carbono y uno de oxígeno o con cuatro átomos de carbono). Este resto podría derivar de un fragmento resultante de la propia degradación del antociano, aunque su pequeño tamaño apunta más bien a la posible implicación de un producto derivado del ácido cítrico. El hecho de que se formen dos productos de igual masa puede sugerir tanto la unión de dicho resto a dos posiciones distintas sobre la estructura del antociano o a la existencia de dos formas isómeras del mismo compuesto.

El pico **e** (m/z 865, $\lambda_{\text{máx}}$ 340 nm, tabla VI.5) presenta un ion molecular que duplica al de Pg 3-gluc, y en su fragmentación se liberan sucesivamente dos restos hexosa, dando lugar respectivamente a fragmentos de m/z 703 y m/z 541. Estas características de masa y fragmentación son coherentes con las de un dímero formado por dos unidades de antociano, que podrían estar bajo diferentes formas estructurales y con distinto tipo de unión. Así, los dos restos de Pg 3-gluc podrían estar unidos de manera simple, a través de un enlace carbono-carbono, en cuyo caso podría tratarse bien de un dímero flaveno-flaveno o bien de un dímero con las unidades doblemente ligadas, mediante una unión similar a la existente en las proantocianidinas de tipo A, en cuyo caso se trataría de un dímero flavano-flavano (figura VI.13). De acuerdo con los mecanismos propuestos por Jurd y Waiss (1965) y Jurd (1969), se puede suponer que dímeros de este tipo podrían formarse por condensación entre la forma flavilio del antociano a través de su posición 4 y la posición 8 (ó 6) del anillo florglucinol de otra unidad antociánica en forma pseudobase, del modo que se recoge en la figura VI.14.

No parece que deba esperarse que en el compuesto **e** existan unidades del antociano en forma flavilio, ya que, en ese caso, se debería observar un máximo de absorbancia en la región del visible en torno a 500 nm. La $\lambda_{\text{máx}}$ del pico **e** (340 nm) es del mismo orden a la que poseen algunas formas calcona de los antocianos; sin embargo, debe descartarse la presencia de unidades del antociano bajo esta forma

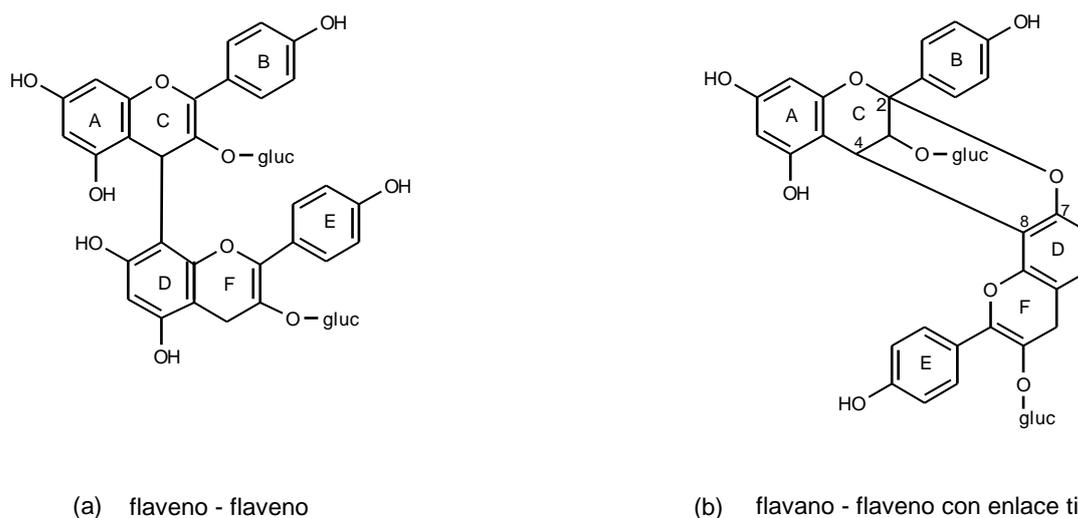


Figura VI.13 – Estructuras propuestas para el compuesto correspondiente al pico **e**, con m/z 865 en modo positivo: (a) dímero flaveno-flavono; (b) dímero flavano-flavono con enlace tipo A.

estructural, ya que la masa del dímero resultante sería superior a la encontrada para el compuesto **e**. Con relación al espectro UV de otros dímeros sugeridos en la figura VI.13, se sabe que los flavanos y las proantocianidinas de tipo A poseen $\lambda_{\text{máx}}$ en torno a 270-280 nm, pero se desconoce si las formas flaveno absorberían a longitudes de onda más elevadas y si, en ese caso, la presencia de una unidad flaveno sería suficiente para justificar un desplazamiento del máximo de absorbancia hasta los 340 nm, por lo que no se dispone de elementos de juicio suficientes para definitivamente por una u otra de las dos estructuras propuestas.

El pico **g** mostraba un espectro UV-Vis con máximos de absorción a 259 y 340 nm [figura VI.15(b)] y un ion molecular de m/z 467 [figura VI.15(a)], que da lugar a un fragmento MS^2 de m/z 329 (liberación de 138 unidades de masa), aunque no se observa ningún fragmento derivado de la pérdida de glucosa, sugiriendo que el compuesto carece de resto glucídico. Se trata de un producto de formación lenta que comienza a detectarse a partir de los 2 meses de almacenamiento, una vez que las cantidades de antociano en la disolución son ya muy bajas, por lo que no parece que deba esperarse que éste actúe directamente como precursor en su formación. Su evolución es paralela a la del pico **b** (figura VI.16), lo que podría sugerir la existencia de una relación entre ambos. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en el caso de **b**, la acumulación del compuesto **g** no es observada en la disolución mantenida en ausencia de oxígeno (GsinOx). Por ello, una posibilidad sería que en su formación estuviesen

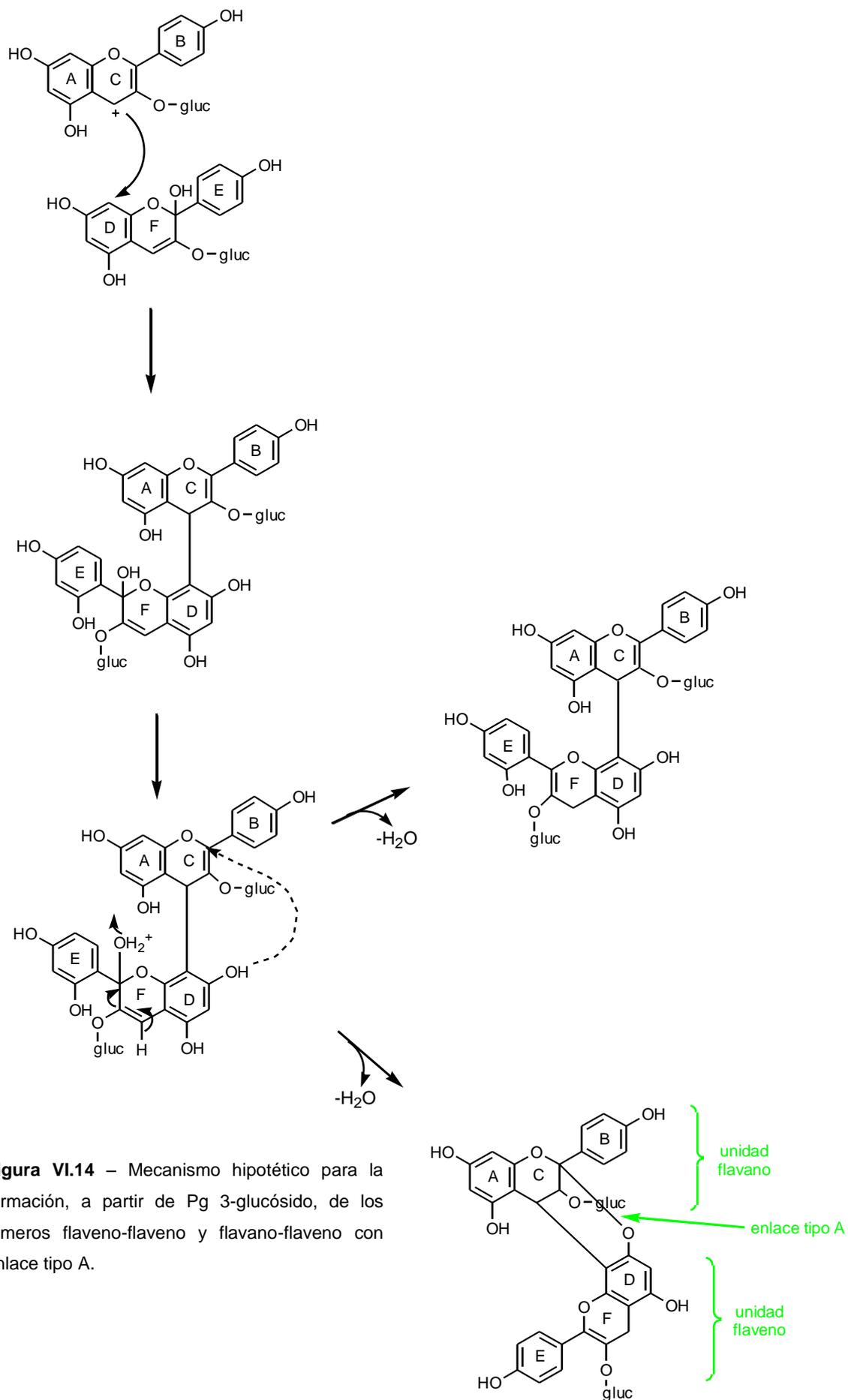


Figura VI.14 – Mecanismo hipotético para la formación, a partir de Pg 3-glucósido, de los dímeros flaveno-flaveno y flavano-flavono con enlace tipo A.

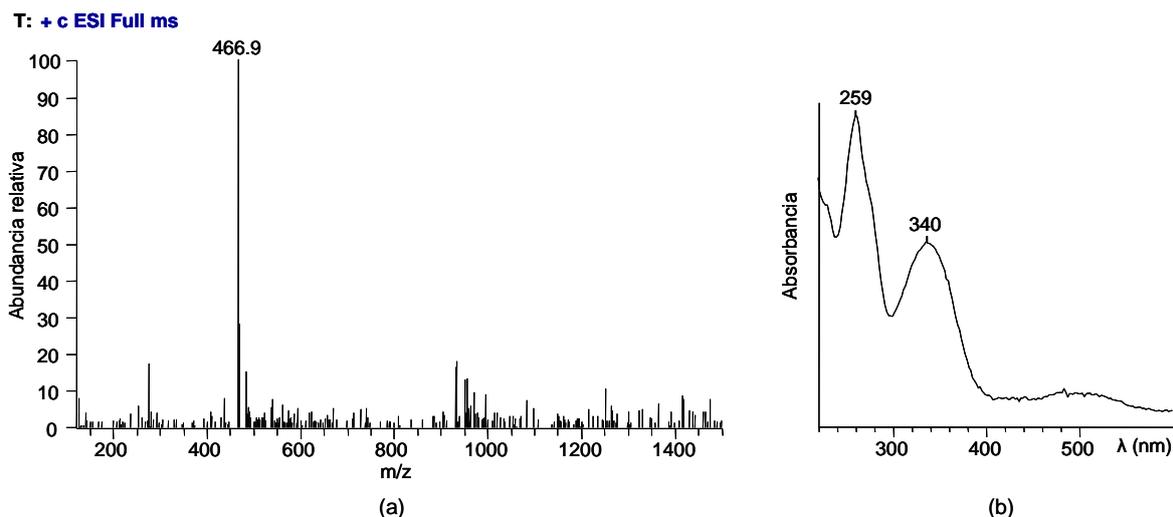


Figura VI.15 – Características espectroscópicas del compuesto **g**: (a) espectro de masas, *full scan*; (b) espectro UV-Vis.

implicados productos resultantes de la ruptura del antociano, proceso que apenas se observa en la disolución GsinOx. En este sentido, la polimerización de 2,4,6-THB o su reacción (o la de productos de su posterior transformación) ya fuera con **b**, con el propio antociano o con su aglucón podrían constituir posibles mecanismos de formación. No ha sido, sin embargo, posible asignar una estructura a la masa encontrada, que nos permitiera descartar u optar por alguna de estas alternativas.

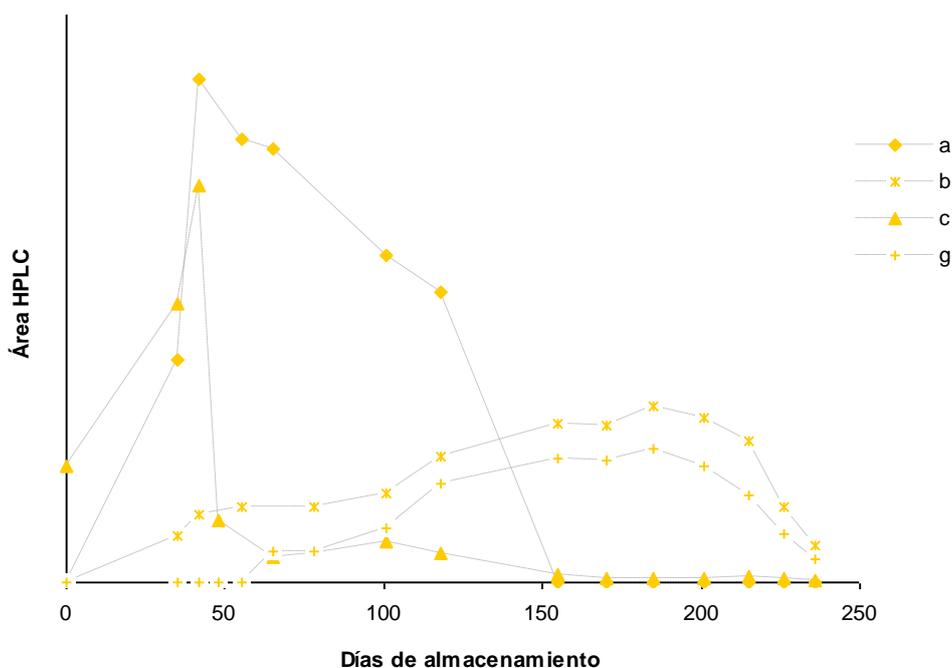


Figura VI.16 – Evolución relativa de algunos de los nuevos compuestos constituidos en GOx a lo largo del almacenamiento.

3.2.2 – CAMBIOS EN EL COLOR

La disminución en el contenido del pigmento y la aparición de nuevos compuestos hace que se produzca un cambio del color rojo intenso inicial de la disolución GOx, que pasa sucesivamente a adoptar tonalidades naranja fuerte (día 35), naranja parduzca (día 48) y naranja clara (día 65 en adelante). Esta evolución en el color a lo largo del almacenamiento es acompañada consecutivamente por la aparición de turbidez (hasta el día 55 – 65), debida a la existencia temporal de partículas dispersas en suspensión y acumulación paulatina de un sedimento oscuro, atribuido a la formación de pigmentos poliméricos pardos. Aunque no se han hecho mediciones objetivas, el desarrollo de la turbidez y del pardeamiento y el aumento de precipitado durante el almacenamiento fueron evidentes visualmente. En las etapas finales del período de estudio, la disolución presentaba un color anaranjado de aspecto límpido, aunque con bastante precipitado en el fondo del vial.

Comportamientos similares al observado en nuestro ensayo han sido ya descritos por diversos autores en zumos y en disoluciones modelo que contenían antocianos (Spayd y Morris, 1981; Rwabahizi y Wrolstad, 1988; Rommel *et al.*, 1990; Cemeroglu *et al.*, 1994; Garzón y Wrolstad, 2002), aunque en sistemas alimentarios, de mayor complejidad que las disoluciones modelo, existen otras reacciones que contribuyen a la formación de turbidez, como la insolubilización de pectinas, los procesos de pardeamiento enzimático y no enzimático o la interacción entre sustancias fenólicas y proteínas, que pueden también combinarse y precipitar (Wakayama y Lee, 1987; Rwabahizi y Wrolstad, 1988; Cemeroglu *et al.*, 1994). En relación con zumos de fresa, Rwabahizi y Wrolstad (1988) indicaron que el pardeamiento es más de origen no enzimático que enzimático.

En la disolución GOx, los productos derivados de la degradación/transformación del antociano discutidos en el apartado anterior (picos **a-g**) no deben influir de manera importante en el progresivo pardeamiento observado, ya que se trata básicamente de sustancias incoloras que absorben en la región ultravioleta y sólo cabe esperar una cierta tonalidad amarillenta en los casos de los compuestos **e** y **g**, que muestran máximos de absorbancia en torno a los 340 nm. Por tanto, es de suponer que el color existente en la disolución una vez que no quedan niveles importantes de antociano debe estar determinado por las sustancias que eluyen en la segunda mitad de los cromatogramas, algunas de las cuales muestran absorbancia significativa entre los 330 - 440 nm. Como se ha indicado en el apartado anterior, en esa zona del cromatograma

se produce una elevación en la línea base, indicando la existencia de productos de elución no regular, sobre la que se localizan varios picos no estables en el tiempo, por lo que se supone que debe tratarse de sustancias transientes que evolucionan para formar los polímeros que acaban por precipitar. En la figura VI.17 se recogen cromatogramas de la disolución registrados a 440 nm, donde se puede observar la presencia de los picos referidos y, en la figura VI.18, algunos de sus espectros de absorción.

Spayd *et al.* (1984) encontraron una elevada correlación entre la formación de turbidez y el “color polimérico” (medido como $[(Abs_{420} + Abs_{520}) - 2.Abs_{700}]$). De acuerdo con estos autores, en el origen de este color estarían los antocianos, que se van degradando y condensando a lo largo del almacenamiento, hasta finalmente precipitar. Rwabahizi y Wrolstad (1988) y Rommel *et al.* (1990), en zumos de fresa y frambuesa, también dieron cuenta de una fuerte correlación entre la formación de turbidez y el porcentaje de “color polimérico” (pigmentos que resisten a decoloración por bisulfito y que, según estos autores, reflejan el grado de polimerización antociánica). Por su parte, Rommel *et al.* (1990) sugieren que la mayor parte de los antocianos estaría implicada en reacciones de polimerización en lugar de perderse por degradación. En definitiva, todos estos autores asumen que los antocianos son fundamentalmente desplazados de manera progresiva por pigmentos poliméricos, que serían los responsables finales del color. No se han descrito, sin embargo, las posibles estructuras que poseerían esos pigmentos poliméricos derivados de antocianos que pueden formarse en productos procesados de la fresa.

La formación de pigmentos derivados de antocianos ha sido estudiada sobre todo en el vino, donde se asume que podrían producirse tres familias de compuestos: los derivados de la condensación entre antocianos y flavanoles mediada por acetaldehído, los resultantes de una condensación directa entre estos dos tipos de flavonoides y los pigmentos con estructura piranoantociano, formados por la cicloadición de diversas sustancias reactivas (ácido pirúvico, acetaldehído, ácidos cinámicos o vinilflavanoles) sobre el carbono en posición 4 e hidroxilo en 5 de la estructura antociánica nativa (Vivar-Quintana *et al.*, 1999, Vivar-Quintana *et al.*, 2002; Mateus *et al.*, 2002). En todo caso, estos pigmentos continúan presentando, en general, tonalidades rojas, con matices más o menos azulados o anaranjados, según el tipo de compuesto, por lo que tampoco permitirían explicar bien el pardeamiento observado; además, la mayoría de los mismos no podrían formarse en la disolución aquí estudiada, dada su composición. Se desconoce, por tanto, la estructura de los pigmentos responsables del pardeamiento

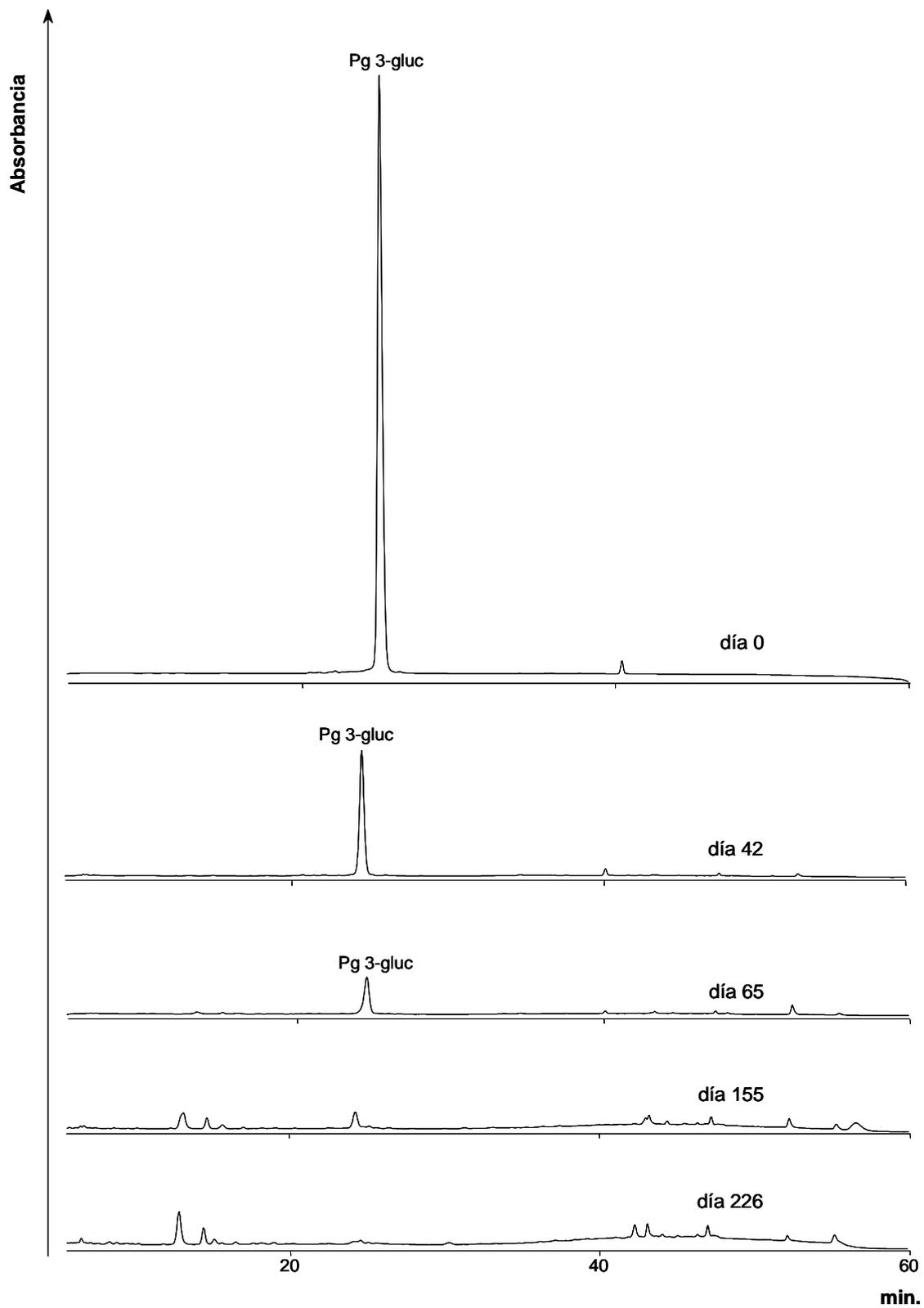


Figura VI.17 – Cromatogramas HPLC, registrados a 440 nm, para el ensayo GOx en los días 65, 155 y 226. La escala es la misma en todos los cromatogramas.

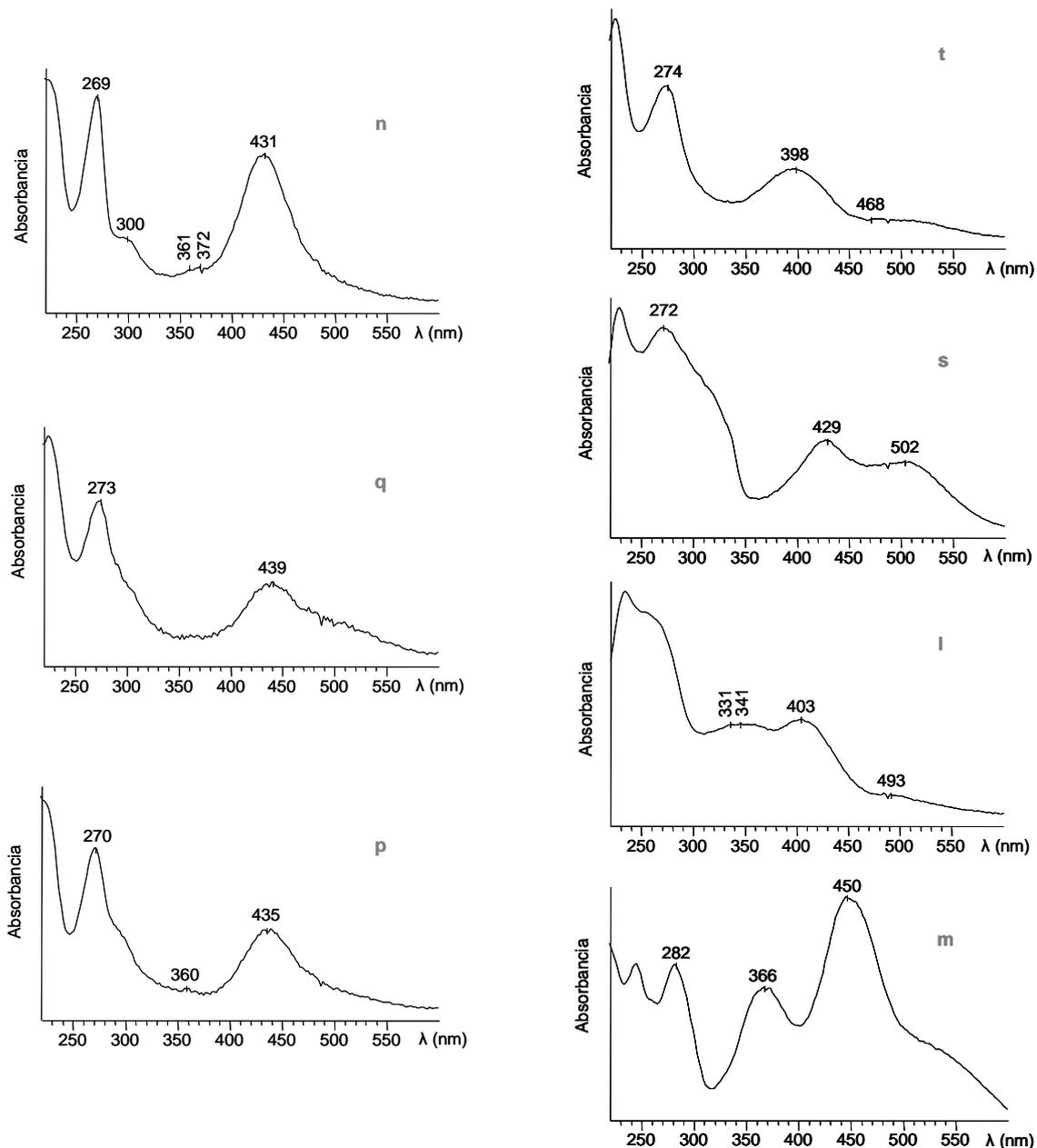


Figura VI.18 – Espectros UV-Vis de algunos de los picos señalados en los cromatogramas a 440 nm.

de la disolución, aunque dada la simplicidad del sistema modelo utilizado, sólo cabe pensar que en su formación deban estar implicados el antociano, el ácido cítrico o productos derivados de los mismos. De las observaciones realizadas no parece desprenderse que puedan derivar del antociano de manera directa, ya que aparecen mayoritariamente en un momento en que las cantidades de éste en el medio son ya bajas. Por ello, hay que suponer que son más bien los productos de su degradación (y/o de la degradación del ácido cítrico) los que intervienen en la formación de los pigmentos pardos no identificados. En este sentido, se debe tener en cuenta que entre los compuestos resultantes de la degradación del Pg 3-gluc hay algunos que podrían

reaccionar fácilmente entre sí o con el antociano, como el THB o el posible floroglucinol que pudiera haberse producido a partir del mismo. Igualmente, podría esperarse que se formaran compuestos carbonílicos reactivos a partir del ácido cítrico, si bien su formación en cierta cantidad exigiría condiciones más drásticas que las existentes en nuestro ensayo.

En la figura VI.19 se recoge la evolución del Índice de Pardeamiento (IP, *Brown Index*), que permite hacerse una idea acerca del cambio de color producido en la disolución. Se puede observar una primera etapa, que dura en torno a un mes, donde no existe un pardeamiento perceptible y la disolución presenta visualmente una tonalidad rojo cambiante hacia el naranja. Esta etapa coincide con una caída acusada en la concentración del antociano (al final del primer mes sólo queda un 20% de su concentración inicial), siendo el proceso que predomina el de su degradación hacia sustancias incoloras, como se pone manifiesto por la destacada acumulación de productos de su ruptura (THB y *p*-HB, figura VI.16), sin que exista producción importante de los compuestos de elución retrasada que se asociaban al pardeamiento. El color continúa estando determinado por la presencia de antociano en el medio como pigmento prácticamente exclusivo y se puede, por tanto, considerar que se trata de una etapa de inducción (*lag phase*) en el proceso de formación de “pigmentos poliméricos”.

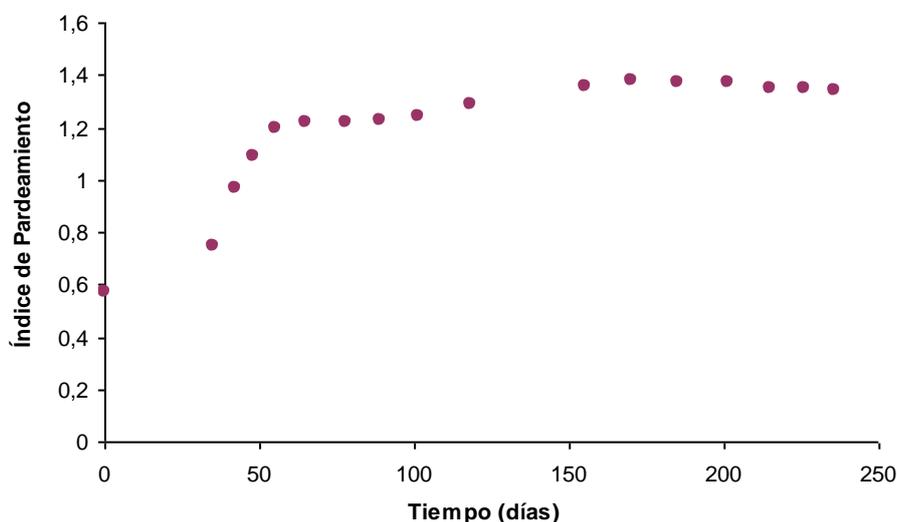


Figura VI.19 - Representación del Índice de Pardeamiento vs. tiempo de almacenamiento en el ensayo GOx.

Sigue un período de crecimiento rápido del IP, que abarca aproximadamente el segundo mes de almacenamiento (durante el cual la disolución adopta una tonalidad

naranja parduzca). En esta fase se observa ya la acumulación de nuevos pigmentos, al mismo tiempo que comienza el declive en los niveles THB y *p*-HB (figura VI.16). A partir del segundo mes de almacenamiento las variaciones en el IP son ya menos importantes, observándose en una primera etapa un ligero aumento en el IP, especialmente durante los meses cuarto y quinto de almacenamiento, y luego una muy suave disminución en sus valores a partir del sexto mes y hasta el final del ensayo. A lo largo de todo este tiempo se observa la formación progresiva de un depósito pardo en el vial, atribuible a la precipitación de los polímeros y que da lugar a una clarificación en la disolución, la cual, como se ha indicado anteriormente, pasa a adoptar una tonalidad naranja progresivamente más clara. La existencia de este aumento en la luminosidad ya se había observado por otros autores, tanto en disoluciones modelo de antocianos (Poei-Langston y Wrolstad, 1981), como en zumos de fresa -de forma más acentuada cuando se encontraban expuestos al aire – (Wrolstad *et al.*, 1980) o en jarabes de grosella (Skrede *et al.*, 1983), y explicado como resultado de la acelerada oxidación, polimerización y precipitación de complejos de antociano (Wrolstad *et al.*, 1980).

Las observaciones realizadas ponen de manifiesto que el mayor impacto visual sobre el color en la disolución se produce en el segundo mes de almacenamiento en el que existe un cambio progresivo de un naranja fuerte a parduzco, que se refleja en las modificaciones que experimenta su espectro de absorción en la región del visible (figura VI.20). Durante el primer mes de ensayo, aunque existe una reducción de un 80% en la concentración de antociano, la disolución continúa manteniendo su máximo de absorbancia en torno a los 500 nm y no hay un gran aumento en el IP (tabla VI.2). Sin embargo, al final del segundo mes, el IP ha duplicado su valor con relación al inicial y la $\lambda_{\text{máx}}$ ha sufrido un desplazamiento hipsocrómico hasta los 440 nm. A partir del día 55 dominan ya los compuestos pardos y la $\lambda_{\text{máx}}$ permanece estable en valores de ese orden. Esto confirma la idea, apuntada por Skrede *et al.* (1983) y Skrede *et al.* (1992) en ensayos realizados en jarabes de grosella y de fresa, acerca de que la degradación de los antocianos libres no tiene un impacto inmediato en los cambios del color de los productos, los cuales, según Wrolstad *et al.* (1980) se asociarían más a la formación de pigmentos pardos. Observaciones similares fueron también realizadas por Clydesdale *et al.* (1978) en jaleas de fresa enriquecidas con antocianos de uva.

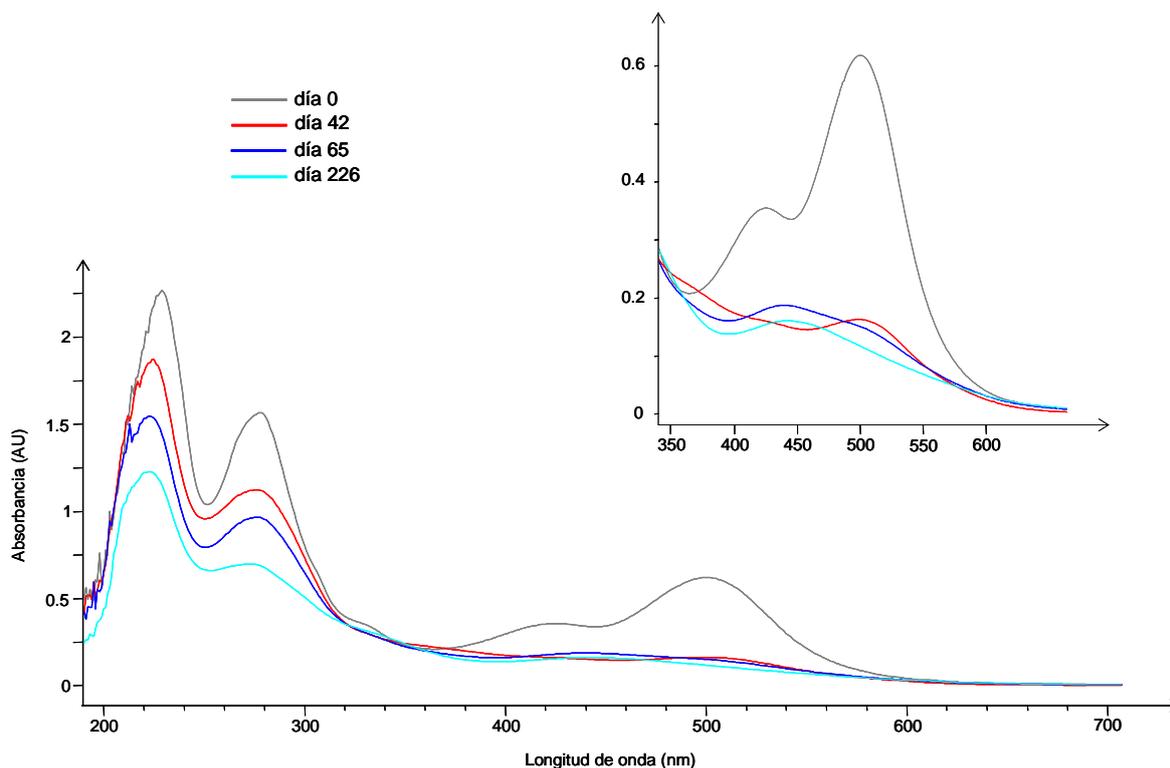


Figura VI.20 – Modificaciones en el espectro de absorción de la disolución GOx. En la parte superior se recoge un zoom del espectro en la región del visible.

Tabla VI.2 – Evolución de la longitud de onda de máxima de absorción ($\lambda_{\text{máx.}}$, nm) y del Índice de Pardeamiento (IP) en la disolución GOx a lo largo del almacenamiento.

Tiempo (días)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	IP
0	500	0,57
35	501	0,75
42	499	0,97
48	485	1,09
55	439	1,20
65	441	1,22
78	440	1,22
89	441	1,23
101	441	1,24
118	441	1,29
155	441	1,36
170	440	1,38
185	441	1,37
201	441	1,37
215	441	1,35
226	441	1,35
236	442	1,34

3.3 – ENSAYOS REALIZADOS EN AUSENCIA DE OXÍGENO (GSINOX)

Como ya se ha comentado en el apartado VI.3.1, en esta disolución se produce también un descenso progresivo en la concentración de Pg 3-gluc (figura VI.2), si bien mucho más lenta que la existente en los ensayos realizados en presencia de oxígeno. Esta disminución se acompaña de la formación de nuevos compuestos, como se muestra en la figura VI.21, donde se resume la evolución del perfil cromatográfico de la disolución a lo largo del almacenamiento.

Como se puede inferir de los cromatogramas de la figura VI.21, en ausencia de oxígeno la formación de productos de la ruptura hidrolítica del antociano: THB y *p*-HB (picos **a** y **c**, respectivamente) es muy reducida, si se compara con lo encontrado en la disolución GOx. Esto se puede comprobar mejor en el gráfico de la figura VI.28 donde se comparan las evoluciones del pico **a** en los tres ensayos realizados.

En esta disolución, el principal producto detectado corresponde al compuesto **b**, sobre cuya posible estructura se ha discutido ya en el apartado anterior. La baja tasa de ruptura del antociano en este ensayo apoya que en la formación del compuesto **b** no deben intervenir productos derivados de la misma; igualmente, el que su formación no esté impedida en condiciones anaerobias, parece sugerir que se trata de un producto resultante de la reducción del antociano, lo que apuntaría más hacia un posible flaveno que hacia el derivado furánico sugeridos en la figuras VI.11 y VI.12. Por otra parte, el hecho de que el mismo se acumule principalmente en una fase en la que existen ya niveles reducidos del antociano lleva a pensar que debe existir un producto intermedio en su formación, que no ha sido detectado ni identificado.

Otro producto que se observa en la disolución GsinOx es **d**, cuya estructura, como se ha comentado previamente, debe retener la estructura básica del antociano. Este compuesto es ya detectable en el segundo mes de ensayo y alcanza su nivel máximo en torno a los 3 meses; el hecho de que posteriormente no exista acumulación apreciable del compuesto **d** es coherente con su procedencia del antociano, ya que los niveles del mismo son ya bajos en ese momento.

Las observaciones realizadas permiten asegurar que en ausencia de oxígeno la degradación hidrolítica del antociano no constituye un mecanismo importante en su desaparición del medio. Otras vías alternativas que comportan reorganizaciones sobre la estructura original del antociano, como son las que conducen a la formación de **b** y **d**,

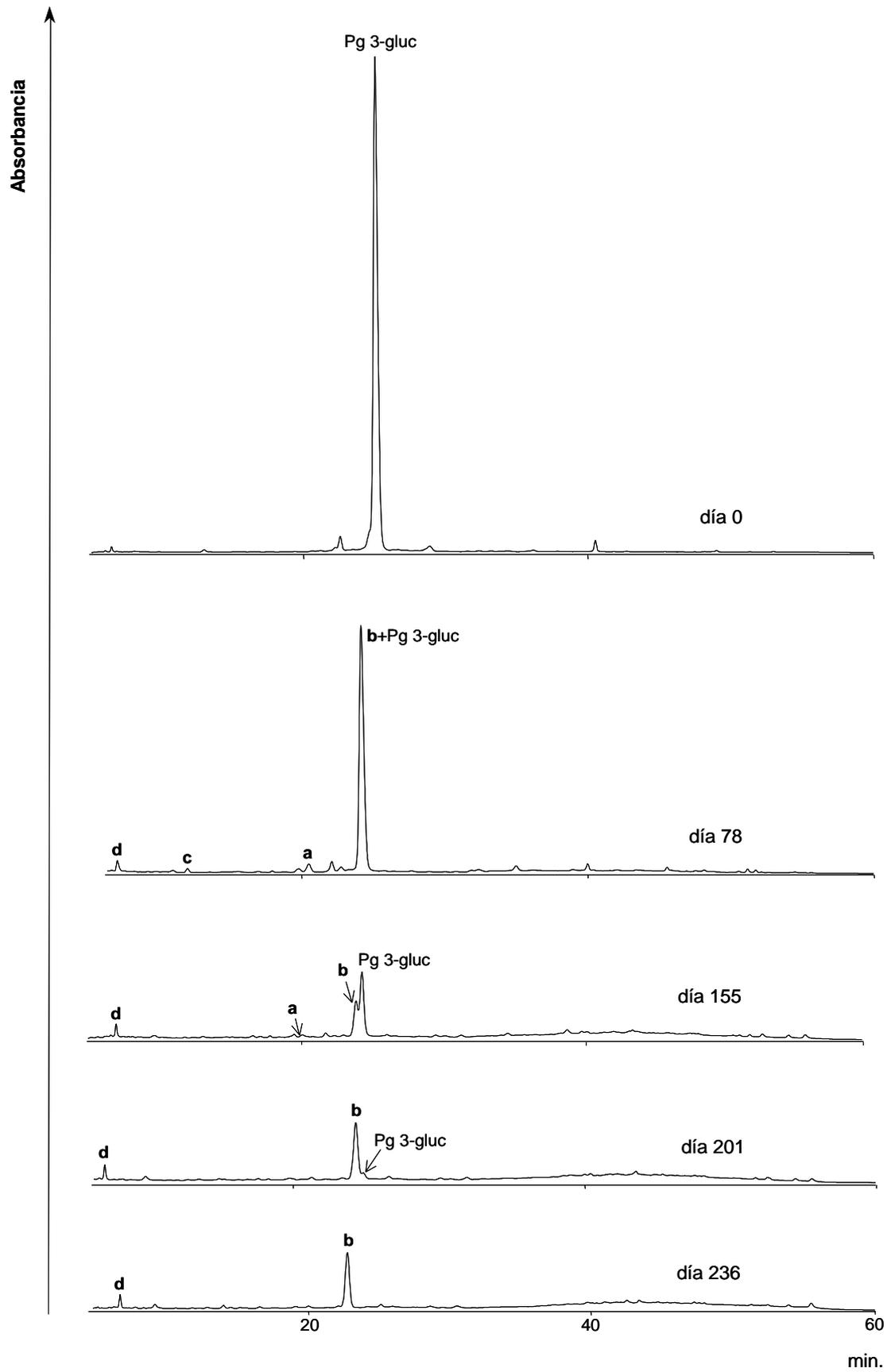


Figura VI.21 – Cromatogramas registrados a 280 nm en la disolución GsinOx en los días 0, 78, 155, 201 y 236. La escala es la misma en todos los cromatogramas.

no están, sin embargo, impedidas en ausencia de oxígeno sino que están incluso favorecidas, si se juzga por las áreas alcanzadas por el pico cromatográfico del compuesto **b**, que alcanzan a duplicar a las obtenidas en el ensayo realizado en presencia de oxígeno, como se puede comprobar en la figura VI.27. Esta mayor tasa de formación de **b** serviría para justificar, al menos en parte, la pérdida del antociano, aunque no podría explicar adecuadamente el cambio de color que se produce en la disolución al tratarse de un producto incoloro. Un aspecto a señalar es que la mayor acumulación de **b** se produce a partir del tercer mes de ensayo (ver figura VI.27), en un momento en que los niveles de antociano en el medio están ya muy reducidos, lo que sugiere que la transformación de Pg 3-gluc en el producto **b** no es directa, sino que debe existir un intermediario, que no ha podido ser identificado.

Rommel *et al.* (1990) habían sugerido que la mayor parte de los antocianos deben perderse más por su implicación en reacciones de polimerización que por procesos de degradación. En todo caso, la formación de polímeros no parece muy extensa en la disolución GsinOX, a juzgar por la ligera turbidez y precipitación observadas en la misma, especialmente si se compara con lo encontrado en el ensayo GOx. Esto no resulta sorprendente teniendo en cuenta que se puede suponer que la polimerización debe tratarse de un proceso de tipo oxidativo, como sugieren Wrolstad *et al.* (1980).

En los cromatogramas no llega a observarse en ningún momento la presencia importante de nuevos pigmentos definidos, que permitan explicar el color anaranjado que aparece en la disolución al producirse el descenso del antociano. Al igual que en la disolución GOx, el origen del color debe seguramente buscarse en los productos que dan lugar al aumento de la línea base en la parte final de los cromatogramas, aunque en este caso la elevación es de menor magnitud y sobre la misma no se localizan picos definidos destacados. Esta observación es también coherente con la existencia de una menor tasa de polimerización, ya que como se sugería en el apartado anterior, se supone que los productos que se acumulan en esa parte de cromatograma guardan relación con el proceso de formación de pigmentos complejos.

Comparada con la disolución GOx, la evolución del color en GsinOX es bastante lenta, visual y objetivamente, como se demuestra por los cambios producidos en el espectro de la disolución en la región del visible (figura VI.23) y el más lento aumento que se produce en el IP (figura VI.22), que tampoco llega a alcanzar valores tan altos (máximo de 1,20 frente al 1,38 alcanzado en GOx, como se puede comprobar en las tablas VI.2 y VI.3). En este ensayo, el sistema mantiene el color rojo durante una parte sustancial del período de almacenamiento y sólo a partir de aproximadamente el cuarto

mes, en que ya existe poco antociano remanente, comienza a apreciarse el cambio hacia una tonalidad anaranjada, que se manifiesta en un aumento del IP. Aunque el color se mantiene rojo, en el día 35 se observa ya la presencia de algunas partículas dispersas en suspensión, que confieren cierta turbidez a la disolución, y a partir del día 65 se aprecia también la formación de un muy ligero precipitado pardo, que se disuelve nuevamente hasta dejar de ser perceptible en torno a los tres meses del ensayo; sólo al final de estudio (día 236) vuelve nuevamente a aparecer algún precipitado en la disolución, que explicaría el descenso producido en ese momento en el IP (figura VI.22). En el ensayo GsinOx el color no evoluciona hacia un naranja fuerte y claro como en GOx, sino hacia un naranja oscuro, lo que encaja con la propuesta ya mencionada de Wrolstad *et al.* (1980) para explicar la mayor luminosidad cuando hay oxígeno presente. La ausencia de oxígeno impide los procesos oxidativos y consecuentemente habría menor polimerización y precipitación, los posibles productos formados quedarían en parte dispersos confiriendo turbidez y un tono oscurecido a la disolución.

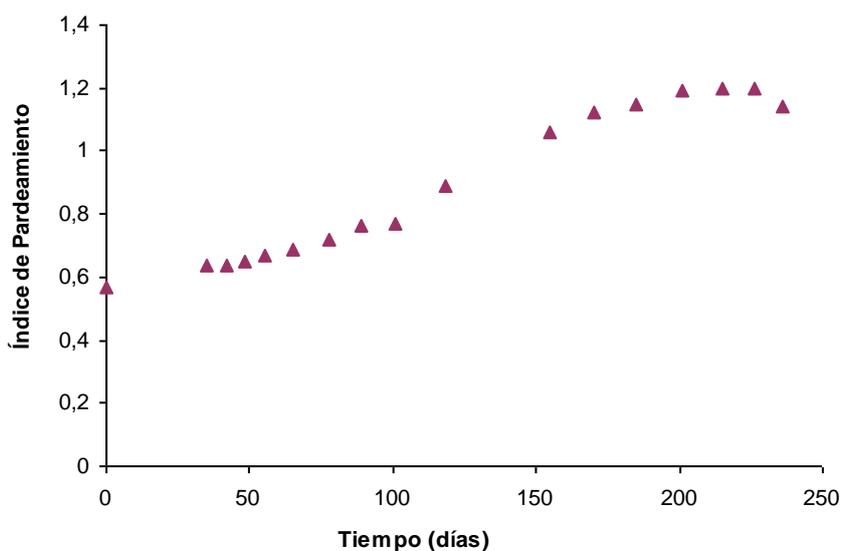


Figura VI.22 – Representación del Índice de Pardeamiento vs. tiempo de almacenamiento en el ensayo GsinOx.

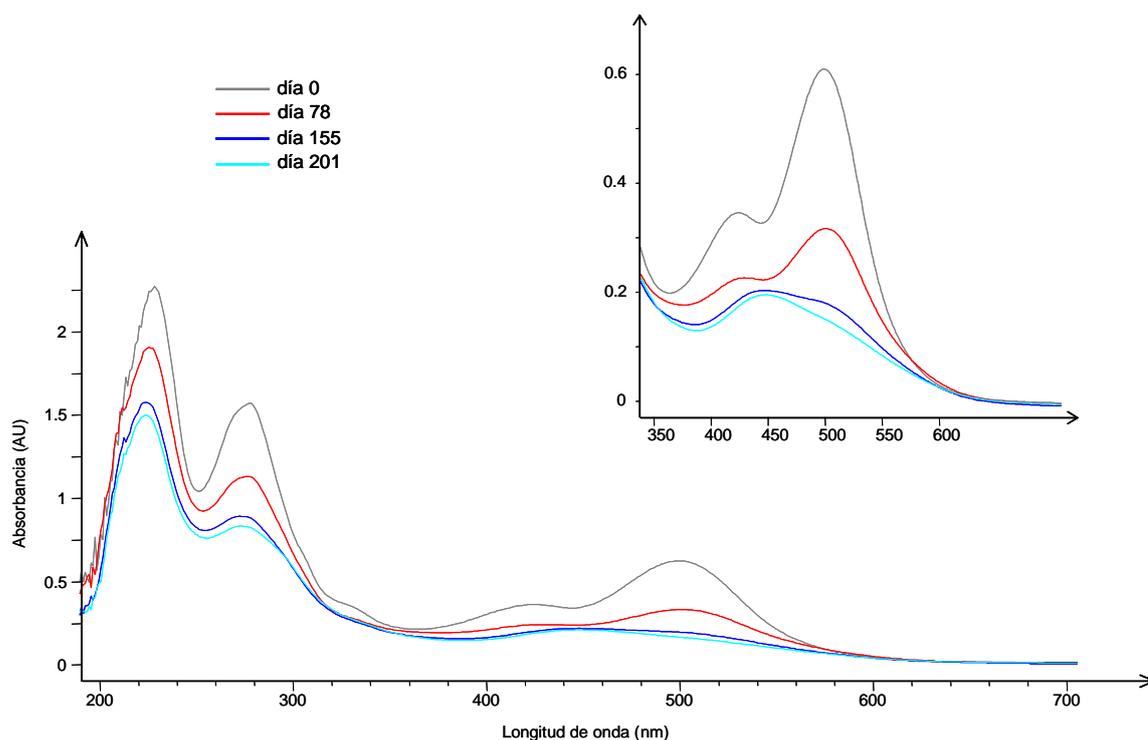


Figura VI.23 – Espectros de absorción registrados en la disolución GsinOx los días 0, 78, 155 y 201. En la parte superior se recoge un *zoom* del espectro en la región del visible.

Tabla VI.3 – Cambios en la longitud de onda de máxima absorbancia ($\lambda_{\text{máx.}}$, nm) y en el Índice de Pardeamiento (IP) en la disolución GsinOx a lo largo del almacenamiento.

Tiempo (días)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	IP
0	500	0,57
35	501	0,64
42	502	0,64
48	501	0,65
55	502	0,67
65	501	0,69
78	501	0,72
89	501	0,76
101	502	0,77
118	497	0,89
155	448	1,06
170	447	1,12
185	448	1,15
201	449	1,19
215	448	1,20
226	449	1,20
236	451	1,14

3.4 – ENSAYOS REALIZADOS EN PRESENCIA DE AZÚCAR Y OXÍGENO (GZ)

En la figura VI.24 se muestra la evolución del perfil cromatográfico en la disolución GZ a lo largo del almacenamiento. Al igual que en los ensayos anteriores, la disminución del pico de Pg 3-glucósido se acompaña de la formación de nuevos picos, en este caso más variados que en GOx y GsinOx. Con relación a lo observado en esas disoluciones, surgen adicionalmente, como picos importantes y definidos los marcados como **h**, **i**, **j** y **k**, en cuya formación podrían estar implicados los azúcares, ya que la presencia de éstos constituye el hecho diferencial en este ensayo. En esta disolución es nuevamente apreciable el proceso de ruptura hidrolítica del antociano, con formación de los productos **a** y **c** (THB y *p*-HB), lo que confirma el efecto favorecedor que la presencia de oxígeno tiene sobre la misma. Igualmente, aparecen los productos de la transformación alternativa del antociano: **b**, **d**, **f** y **g**, entre los cuales cobran particular importancia los picos **b** y **f**, este último invierte de hecho sus proporciones con relación al pico **d**, con el cual estaba relacionado, con respecto a lo observado en el ensayo GOx. El hecho de que los compuestos **f** y **g** apenas fuesen detectables en la disolución mantenida en ausencia de oxígeno avalaría lo ya apuntado anteriormente de que se trata de sustancias en cuya formación intervienen además del antociano productos resultantes de la ruptura de éste o de la transformación oxidativa del ácido cítrico.

Con relación a los nuevos picos detectados (**h**, **i**, **j** y **k**), no se pudo llegar a conclusiones sobre su estructura, aún cuando fue posible obtener el ion molecular para los picos **j** y **k**. Las sustancias **h**, **j** y **k** corresponden a sustancias incoloras ($\lambda_{\text{máx}}$ 282, 285 y 287 nm, respectivamente), mientras que **i** es un compuesto coloreado ($\lambda_{\text{máx}}$ en el visible a 400 nm), que debe, por tanto, contribuir al cambio de color de la disolución. La presencia transitoria de **h** y **j** en el medio apunta a que se trata de productos intermediarios en la formación de otros compuestos. Como se ha señalado antes, se piensa que en la formación de estos nuevos compuestos pueden estar implicados los azúcares, salvo en el caso del pico **k**, que parece estar relacionado con **f**. Hay dos motivos para suponer esto; por un lado, la masa del compuesto **k** (m/z 365) coincide con la de uno de los fragmentos producidos en el espectro MS^2 de **f**; por otro, el pico **k** emerge en los cromatogramas a medida que desciende el área de **f**. El hecho de que **k** no llegara a ser observado en el ensayo GOx, en el cual sí era detectado **f**, puede justificarse por la mayor acumulación de este último en la disolución GZ. Por otra parte, de la fragmentación de **k** resulta la pérdida de una molécula de glucosa, lo que permite deducir que **k** tiene una estructura basada en la del antociano.

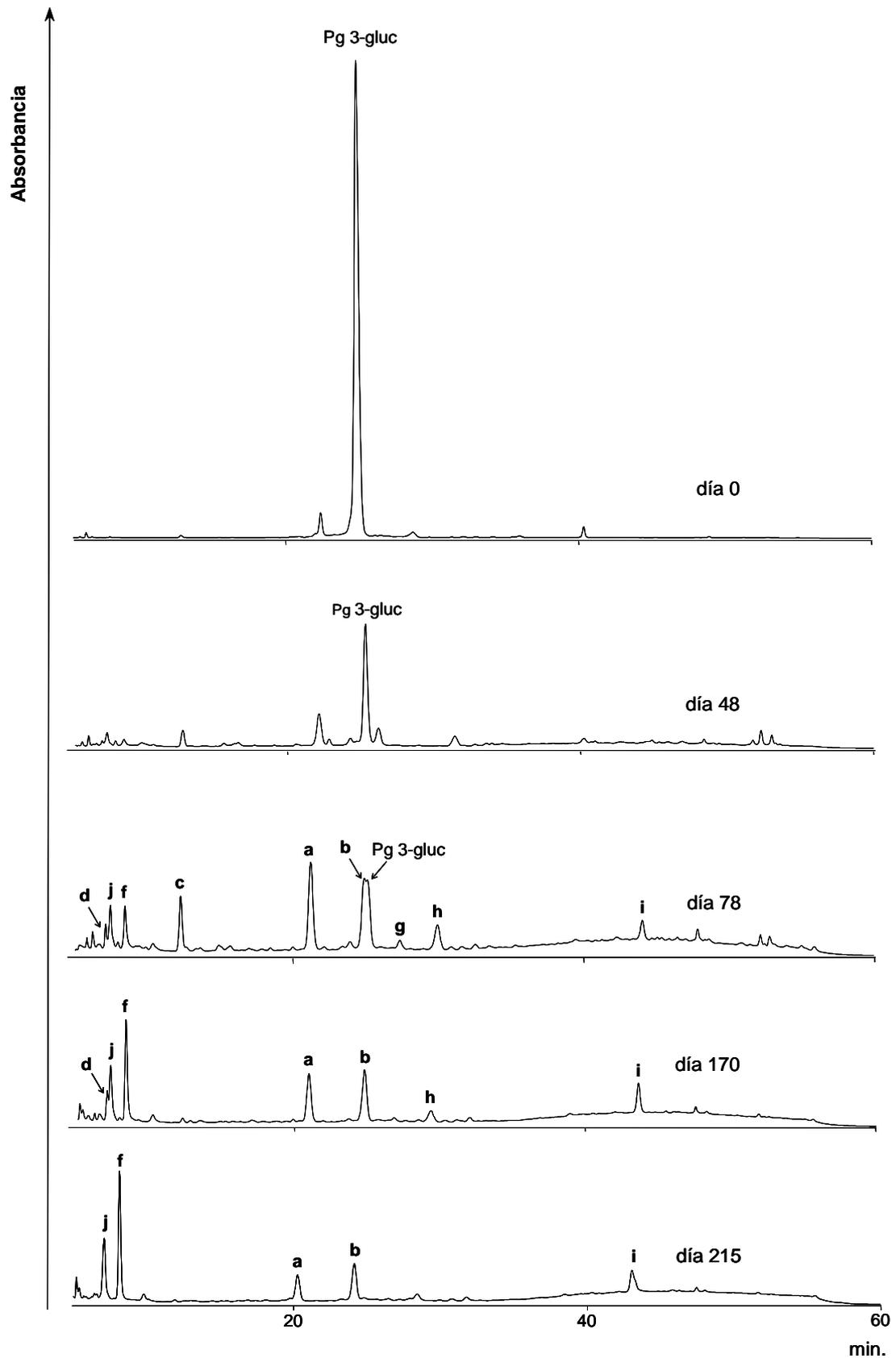


Figura VI.24 – Cromatogramas registrados a 280 nm para el ensayo GZ en los días 0, 48, 78, 170 y 215. La escala es la misma en todos los cromatogramas.

Al igual que en los ensayos anteriores, la disminución en la concentración de Pg 3-gluc y la formación de nuevos compuestos da lugar a un cambio progresivo en el color del sistema; del rojo intenso inicial se pasa a un naranja rojizo (1,5 meses) y luego a un naranja neto (2 meses), que va entonces oscureciendo gradualmente, para permanecer en un naranja oscuro prácticamente invariable desde el final del tercer mes hasta el final del período de estudio. Esta evolución en el color se acompaña de la existencia temporal de partículas en suspensión (hasta el día 55 de ensayo), pero curiosamente sin acumulación de precipitado; sólo en las últimas fases del ensayo se aprecia la existencia de un precipitado muy ligero en el fondo del vial, coincidiendo con una nueva aparición de turbidez, seguramente debida ahora a la formación de productos insolubles derivados de los azúcares. Los cambios observados en el color quedan registrados en la evolución del espectro de absorción en el visible de la disolución que se muestra en la figura VI.26.

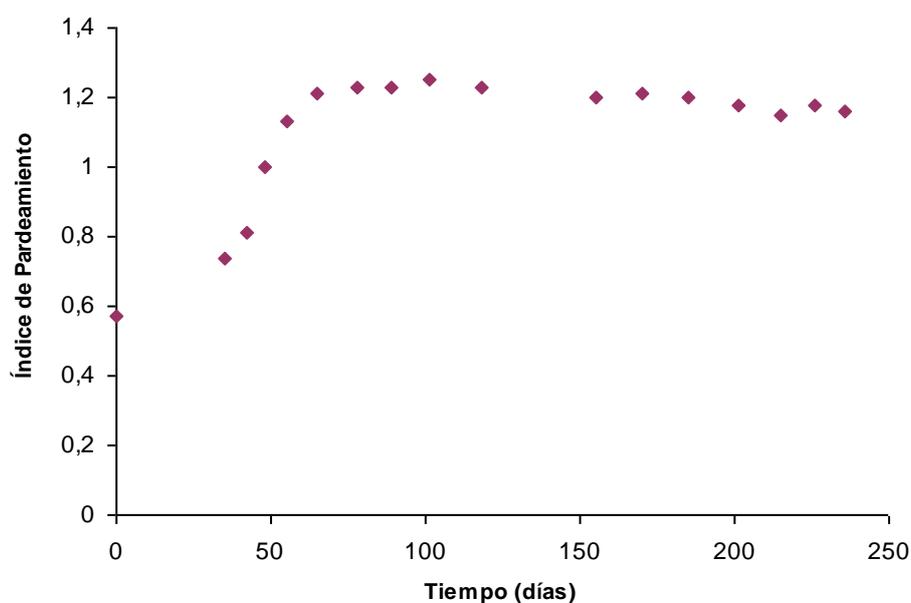


Figura VI.25 – Representación del Índice de Pardeamiento vs. tiempo de almacenamiento en el ensayo GZ.

La figura VI.25 y tabla VI.4 presentan la evolución en el Índice de Pardeamiento en la disolución GZ. Durante los tres primeros meses de ensayo el perfil es similar al observado en la disolución GOx, con una fase inicial en la que el pardeamiento es limitado, en la cual se produce degradación del antociano pero la formación de pigmentos pardos es aún escasa, posiblemente por encontrarse en fase de inducción (formación de precursores). La caída que experimentan los niveles del antociano en esta etapa justifica la pérdida progresiva de la tonalidad rojiza. Durante el segundo mes se produce una fase de crecimiento rápido del IP, que coincidiría con la formación de

nuevos pigmentos pardo/anaranjados y que se manifiesta en los cromatogramas por la elevación de la línea base en su tramo final. A partir de este momento, el color de la disolución estaría determinado por la presencia de pigmentos pardo/anaranjados que muestran $\lambda_{\text{máx}}$ en torno a 443-450 nm (ver figura VI.26 y tabla VI.4) y el IP se mantiene estable con una tendencia ligeramente decreciente desde el tercer mes hasta al fin del ensayo. Esto último no era observado en la disolución GOx, donde los valores del IP continuaban aumentando en esa etapa, indicando la formación de una mayor cantidad de nuevos pigmentos; en esta fase era también observada la deposición progresiva de un precipitado pardo, con un aumento en la claridad del color, no apreciados en el ensayo GZ. Estas observaciones parecen apuntar a que en presencia de azúcares se produce una menor progresión del proceso de “polimerización” que conduce a la formación de nuevos pigmentos y su ulterior precipitación.

Como se ha indicado en el apartado VI.3.1, la tasa de desaparición del antociano es ligeramente menor en presencia de azúcares en los dos primeros meses, durante los cuales se aprecia también una menor acumulación de productos de su degradación hidrolítica, como se puede comprobar por la evolución de las áreas del pico **a** (THB) resultante de ese proceso, que se muestra en la figura VI.26. Igualmente, como se acaba de comentar, en presencia de azúcares existe menor tasa de pardeamiento y de precipitación, indicando una progresión menos acusada del proceso de “polimerización” que se asocia a esos fenómenos. Ambos aspectos, en definitiva, sugieren la existencia de un cierto efecto protector de los azúcares sobre el antociano y los procesos que conducen al cambio de color. Una posible explicación podría ser la existencia de cierta captación de oxígeno por parte de los azúcares, que competirían con el antociano por el mismo, reduciendo, de este modo, los procesos oxidativos sobre el Pg 3-gluc o productos de su degradación. La mayor protección relativa del antociano frente a su degradación podría ser la razón por la que en esta disolución se produzca una mayor y más rápida acumulación del producto **b**, como se puede comprobar en la figura VI.27, cuya formación constituiría, como se ha sugerido en el apartado anterior, una vía no oxidativa alternativa en el proceso de desaparición del antociano.

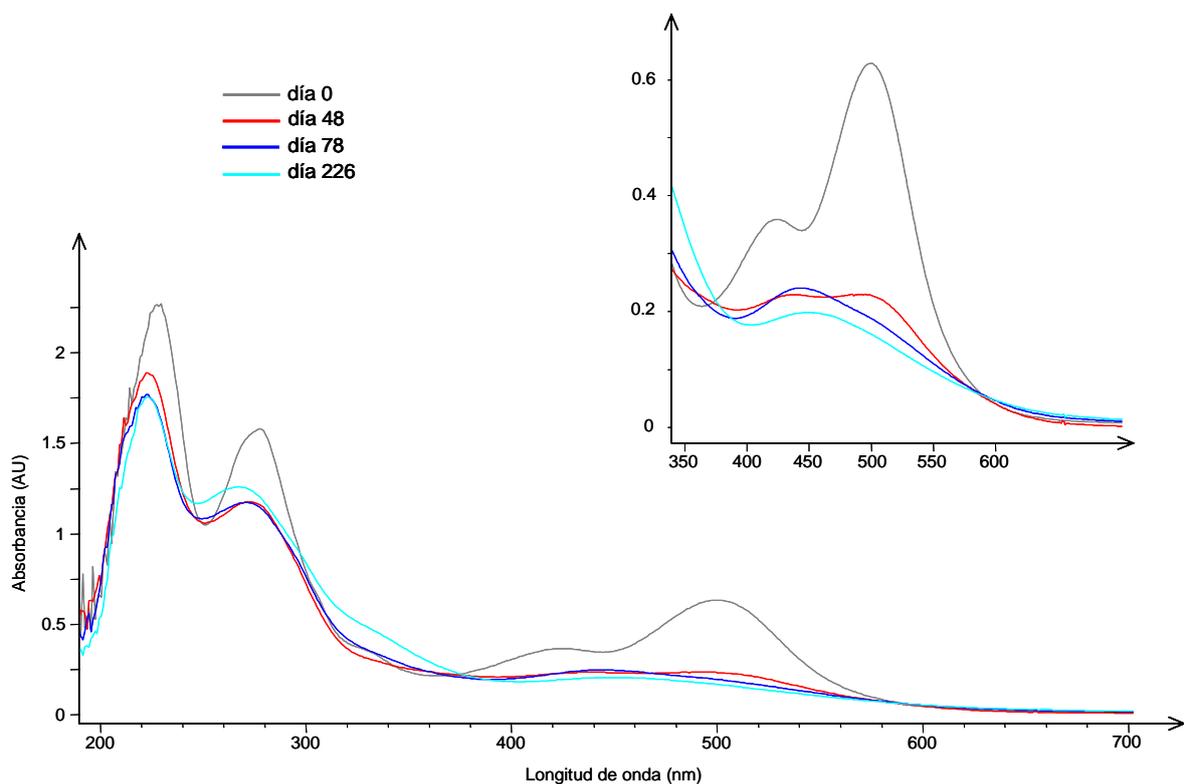


Figura VI.26 – Espectros de absorción de la disolución GZ los días 0, 48, 78 y 226. En la parte superior se recoge un zoom del espectro en la región del visible.

Tabla VI.4 - Longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia ($\lambda_{\text{máx}}$, nm), y Índice de Pardeamiento (BI) para cada muestra de GZ a lo largo del almacenamiento.

Tiempo (días)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	BI
0	500	0,57
35	499	0,74
42	500	0,81
48	485 / 441	1,00
55	444	1,13
65	445	1,21
78	443	1,23
89	445	1,23
101	446	1,25
118	446	1,23
155	449	1,20
170	449	1,21
185	448	1,20
201	449	1,18
215	452	1,15
226	450	1,18
236	450	1,16

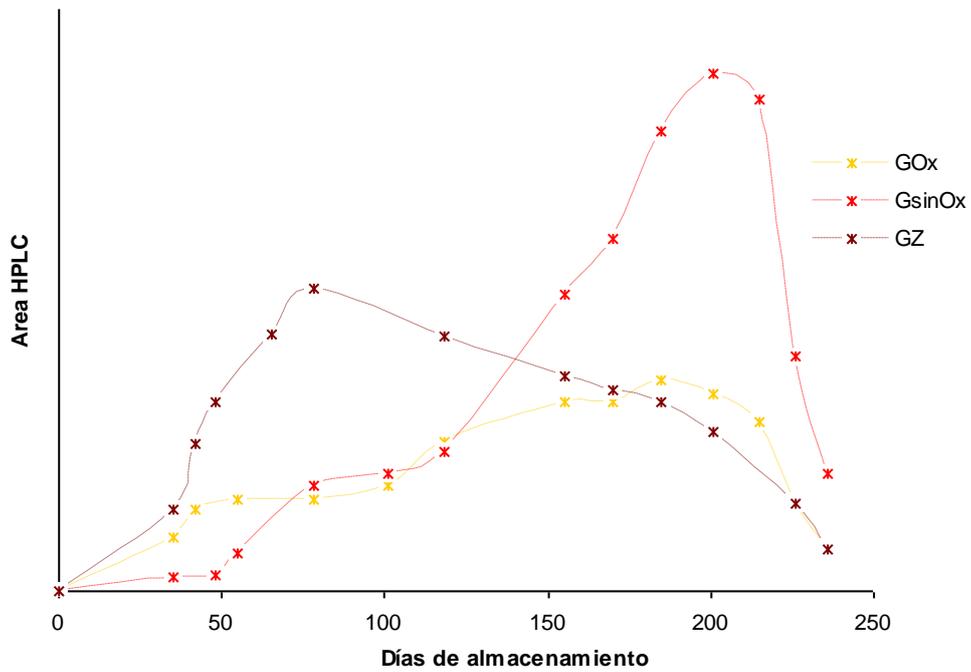


Figura VI.27 – Evolución las áreas del pico **b** a lo largo del almacenamiento en las tres disoluciones estudiadas.

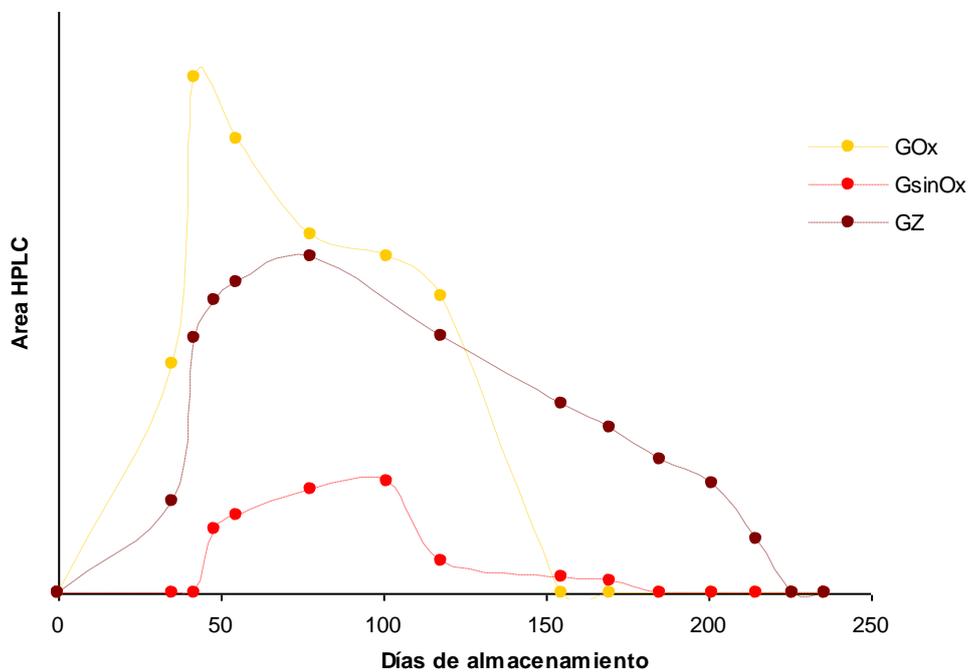


Figura VI.28 – Evolución las áreas del pico **a** (THB) a lo largo del almacenamiento en las tres disoluciones estudiadas.

Tabla VI.5 – Longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx.}}$), ion molecular y fragmentos MS^2 y MS^3 de algunos de los productos cuya formación es observada en los ensayos realizados.

Producto	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	Ion molecular (m/z)	Fragmentación (m/z) $\text{MS}^2 \rightarrow \text{MS}^3$
a (2,4,6-THB)	291	155.3	155.3 \rightarrow 155.3; 137.2
b	292	257.2	257.2 \rightarrow 257.3
c (ácido p-HB)	254	n.d.	
Pg (pelargonidina)	513	271	
d	290	487.2	457.3
			325.1
			317.3
e	340	865.1	703.1 \rightarrow 541.2
f	293	487.2	365.5
			325.0
g	259, 340	466.9	329.1 \rightarrow 285.6; 301.3; 261.1
h	282	n.d.	
i	274; 400	n.d.	
j	285	143.3	143.3 \rightarrow 143.3
k	287	365.3	203.1 \rightarrow 203.1
			365.0
			202.2
			305.1

n.d. no disponible

4 – CONCLUSIONES

1. La tasa de desaparición de Pg 3-gluc en disolución acuosa de pH 3,5 es notablemente más baja en ausencia de oxígeno que en su presencia ($t_{1/2}$ de 48 días frente a 13,5 días, respectivamente). La presencia de azúcares en el medio, en concentraciones similares a las que puede existir en la fresa, tiene un pequeño efecto protector sobre las reacciones que conducen a la pérdida del antociano ($t_{1/2}$ 15,9 días). La desaparición del Pg 3-gluc se ajusta a un proceso de tipo exponencial mientras existen aún cantidades significativas de antociano en el medio, aunque la bondad del ajuste a este modelo es menor cuando se considera el período integral de almacenamiento.
2. La disminución en el contenido del antociano en las disoluciones da lugar a la aparición de nuevos compuestos y a un cambio en el color que pasa desde el rojo inicial a una tonalidad naranja, más o menos oscura según el tipo de ensayo. La evolución en el color se acompaña consecutivamente por la aparición de turbidez y la acumulación de un sedimento pardo, atribuido a la formación de pigmentos poliméricos. Este último proceso es menos acusado en el ensayo realizado en presencia de azúcares y apenas llega a observarse en ausencia de oxígeno.
3. Existen al menos tres procesos que conducen a la desaparición del antociano y formación de nuevos compuestos en las disoluciones modelo: 1) degradación hidrolítica del antociano que conduce a la ruptura del heterociclo, 2) existencia de reorganizaciones estructurales sobre la estructura básica del antociano, y 3) reacciones de condensación/polimerización. Los dos primeros procesos dan lugar fundamentalmente a la formación de productos incoloros, mientras que en el último tipo de reacciones se formarían nuevos pigmentos de tonalidad pardo/anaranjada que serían los responsables del cambio de color de la disolución y la aparición de precipitaciones. El proceso de ruptura hidrolítica apenas llega a observarse en ausencia de oxígeno, en la cual también están limitadas las reacciones de condensación/polimerización y donde la principal causa para la desaparición del antociano parecen ser las reorganizaciones estructurales.
4. Como productos de la degradación hidrolítica de Pg 3-gluc se han identificado 2,4,6-trihidroxibenzaldehído y ácido 4-hidroxibenzoico, resultantes

respectivamente de los fragmentos correspondientes a los anillos A y B del antociano liberados tras la ruptura del heterociclo. La identificación de estos productos y la detección del aglucón del antociano en las disoluciones permiten corroborar el mecanismo de degradación térmica de antocianos propuesto por Furtado *et al.* (1993) y Piffaut *et al.* (1994). Según este mecanismo, el proceso comenzaría por la hidrólisis del enlace glicosídico, liberando el aglucón que, más lábil, se desestabiliza conduciendo a la ruptura del anillo C, dando lugar a la liberación de un ácido benzoico y un carboxialdehído, con pérdida de un átomo de carbono. Este proceso pasaría posiblemente por la formación de una estructura calcona intermediaria, que sería luego hidroxilada u oxidada antes de producirse la separación de los anillos A y B. La existencia de este paso no pudo confirmarse, al no poder detectarse la presencia de los posibles intermediarios calcona.

5. Con relación a los compuestos formados en la reorganización de la estructura del antociano, los datos obtenidos en el análisis de espectrometría de masas han permitido especular acerca de la formación de un producto resultante de una posible reducción del aglucón, que podría poseer una estructura de tipo flaveno. Igualmente, se han detectado una serie de compuestos que podrían resultar de la aducción al antociano de productos de baja masa molecular, que estarían en el medio como resultado de la degradación previa del ácido cítrico o del propio antociano. Esta vía alternativa para la pérdida de Pg 3-gluc está favorecida en condiciones anaerobias y, en menor medida, en presencia de azúcares. En ausencia de oxígeno constituye incluso el principal mecanismo implicado en la desaparición del antociano. Asimismo, se ha podido detectar la formación de un producto menor cuya estructura parece corresponder a la de un dímero formado por dos unidades del antociano.
6. No fue posible llegar a concluir sobre los tipos de productos formados en los procesos de condensación/polimerización que conducen a la formación de nuevos pigmentos y a la aparición de precipitado en las disoluciones. La formación de estos compuestos es un proceso básicamente oxidativo de naturaleza dinámica, que comporta la formación de productos intermediarios no necesariamente coloreados, que son detectados de manera transiente e irregular en los cromatogramas de HPLC.

VII

Interacciones entre Pelargonidina 3-glucósido y Flavan-3-oles

1 – Introducción

2 – Metodología

2.1 – Obtención de procianidina B3

2.1.1 – Hemisíntesis

2.1.2 – Aislamiento y purificación

2.2 – Preparación de las disoluciones modelo

2.3 – Análisis

2.3.1 – Cromatografía líquida de alta eficacia con detección por espectrofotometría de diodos

2.3.2 – Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas

2.3.3 – Medidas espectrales

3 – Resultados y Discusión

3.1 – Disoluciones modelo de Pg 3-gluc, catequina y procianidina B3

3.1.1 – Evolución de antociano y flavanoles

3.1.2 – Formación de nuevos compuestos

3.1.3 – Cambios en el color

4 – Conclusiones

1 – INTRODUCCIÓN

Los alimentos derivados de frutos son mezclas complejas capaces de experimentar reacciones numerosas y diversas. Los cambios de color que sufren a lo largo de su vida útil, han sido atribuidos a la formación de nuevos productos, entre los que se incluyen pigmentos poliméricos, más estables, derivados de reacciones en las que están implicados antocianos y taninos. Entre los ejemplos más emblemáticos se encuentran las modificaciones que se producen en vinos tintos durante el envejecimiento o las alteraciones de color observadas en zumos y mermeladas durante el almacenamiento. En el caso del envejecimiento del vino tinto, producto más estudiado en relación con los cambios de color, éstos se asocian a fenómenos de degradación antociánica simultáneos a la aparición de nuevos pigmentos, en cuya formación intervienen también frecuentemente flavanoles. En este sentido, se han descrito diversos tipos de procesos, como son la copigmentación (Figueiredo *et al.*, 1996, Mistry *et al.*, 1991), las reacciones de antocianos y/o flavanoles con intervención de otras sustancias, como acetaldehído (Bakker *et al.*, 1993; Escribano-Bailón *et al.*, 1996, 2001; Rivas-Gonzalo *et al.*, 1995; Roggero *et al.*, 1987; Saucier *et al.*, 1997a; Timberlake y Bridle, 1976) u otros aldehídos (Pissarra *et al.*, 2003, 2004), ácido pirúvico (Fulcrand *et al.*, 1998) o ácido glioxílico (Fulcrand *et al.*, 1997), la condensación directa antociano-flavanol (Jurd, 1967; Liao *et al.*, 1992; Santos-Buelga *et al.*, 1995; Saucier *et al.*, 1997a; Timberlake y Bridle, 1976) o las reacciones de pardeamiento fenólico (Cheynier *et al.*, 1988; Cheynier y Ricardo-da-Silva, 1991; Francia-Aricha *et al.*, 1998; Guyot *et al.*, 1995; Oszmianski *et al.*, 1996).

La fresa contiene, junto con los antocianos, otros compuestos fenólicos y, en particular, flavanoles, por lo que es de esperar que algunos de los procesos anteriores puedan también producirse en sus productos derivados y ser así los responsables, al menos en parte, de las modificaciones de color que éstos experimentan. La dificultad de estudiar estas reacciones en medios naturales, debido a la gran cantidad de factores que pueden influir, hace que, al menos en una primera etapa, resulte adecuado su estudio en sistemas modelo que permiten controlar las condiciones de reacción, evaluar la contribución de cada factor por separado e incluso obtener algunos de los productos formados, haciendo posible el estudio de su estructura y propiedades.

Con la finalidad de estudiar las posibles interacciones que pueden tener lugar entre antocianos y flavanoles en productos derivados de fresa y la contribución que las mismas, en caso de producirse, podrían tener sobre el color, se realizaron ensayos en

disoluciones modelo, utilizando el antociano (Pg 3-gluc) y los flavanoles (catequina y procianidina B3, catequina-(4 α →8)-catequina) característicos de las fresa. Para ello, era necesario disponer previamente de cantidades suficientes de ambos sustratos. En el caso del antociano, se optó por proceder a su aislamiento a partir de la fresa, mientras que para los flavanoles se utilizó catequina comercial purificada y para la procianidina B3 se optó por la hemisíntesis química. En el presente capítulo se recogen los resultados obtenidos en estos estudios.

2 – METODOLOGIA

2.1 – OBTENCIÓN DE PROCIANIDINA B3

2.1.1 – HEMISÍNTESIS

Para la hemisíntesis de catequina-(4 α →8)-catequina se utilizó una modificación del procedimiento descrito por de Freitas (1995), basado en la reducción de la (\pm)-taxifolina (flavano-3-ol) por borohidruro de sodio (NaBH₄), seguido de la condensación del carbocatión (C₄⁺) formado en medio ácido con una molécula de flavan-3-ol (figura VII.1).

En un balón de dos bocas de 150 mL se disolvieron 0,2 g (0,66 mmol) de (\pm)-taxifolina en 30 mL de etanol (al 99,9%). Se hizo borbotear nitrógeno directamente en la disolución durante 10 minutos y luego, manteniendo la atmósfera de N₂ en el interior de balón, se añadieron gota a gota 10 mL de una solución alcohólica de borohidruro de sodio (0,10 g; 1,0 mmol). La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos, tras lo cual se incorporaron 40 mL de una disolución acuosa del flavan-3-ol (+)-catequina (0,30 g; 1,0 mmol) después de haber hecho borbotear nuevamente nitrógeno durante 10 minutos. Se agitó, se ajustó el pH a 4,0 con una disolución de ácido acético a 10% y se dejó bajo agitación durante 30 minutos en atmósfera de nitrógeno.

La reacción de (\pm)-taxifolina con el tetrahidrobórulo de sodio (NaBH₄) es muy rápida, conduciendo a la formación, por reducción, de un flavan-3,4-diol. El NaBH₄, además de un potente reductor, es una base fuerte, por lo que vuelve básico el medio de reacción. En estas circunstancias, los compuestos fenólicos tienen tendencia a oxidarse rápidamente, sobre todo en presencia de trazas de oxígeno, por lo que es indispensable realizar la síntesis bajo atmósfera inerte (nitrógeno). La posterior acidificación del medio (pH = 4) lleva a la formación, a partir del flavan-3,4-diol, de un carbocatión C₄⁺, que realiza un ataque nucleofílico sobre el anillo floroglucinol de la catequina, de manera preferente sobre el carbono C₈ con relación al carbono C₆. Esta regioselectividad es debida a impedimentos estéricos ocasionados por los grupos hidroxilo en ese anillo. La reacción de condensación es estereoespecífica, estando la

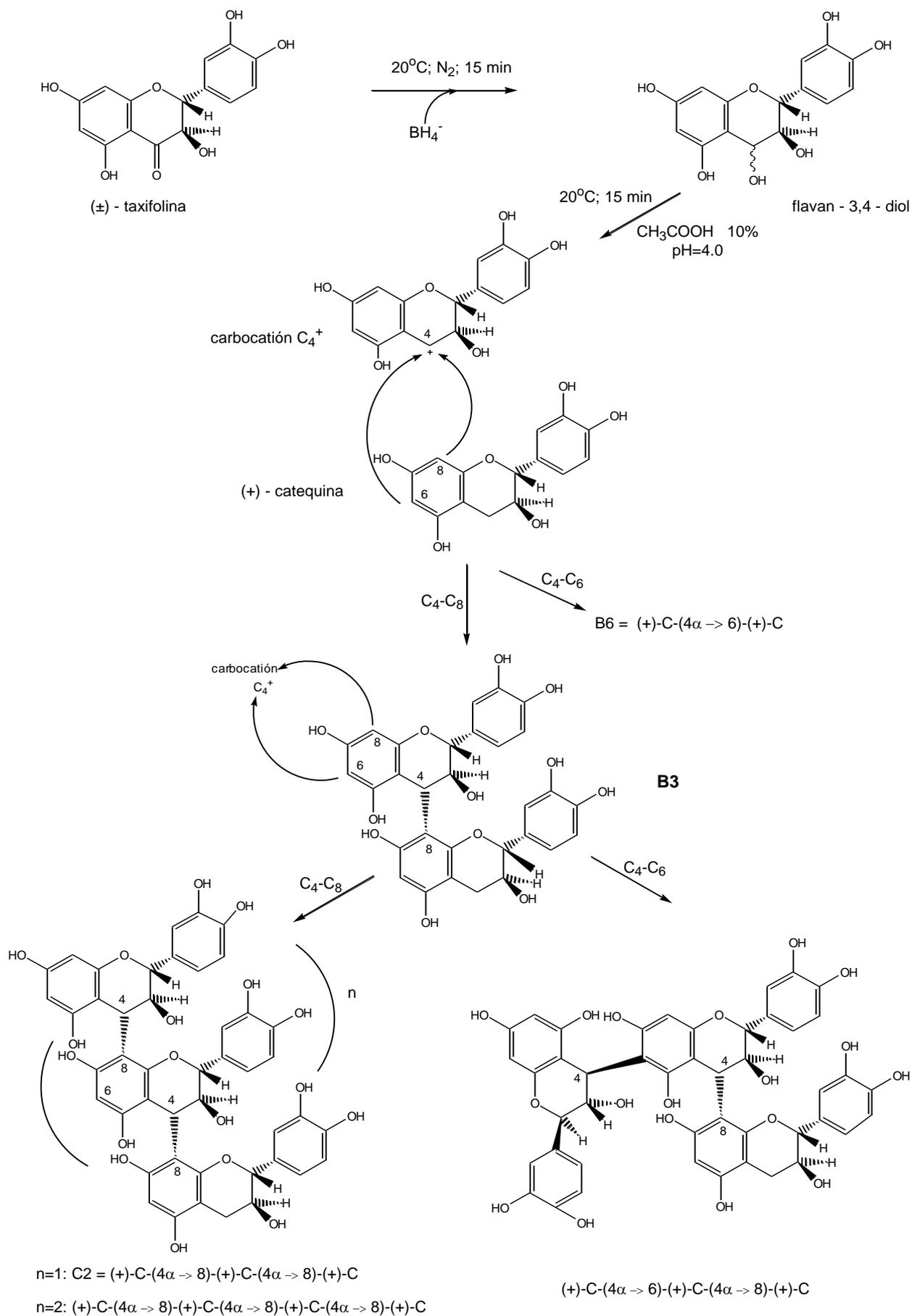


Figura VII.1 – Hemisíntesis de procianidinas a partir de (±)-taxifolina (adaptado de de Freitas, 1995).

formación de isómeros 3,4-*trans* altamente favorecida (Botha *et al.*, 1978), lo que da lugar a productos condensados con enlace interflavánico de tipo 4 α → (Botha *et al.*, 1982; Porter y Foo, 1982). De este modo, de la reacción de la (\pm)-taxifolina con cantidades estequiométricamente superiores de (+)-catequina, se obtiene esencialmente el dímero C-(4 α →8)-C (procianidina B3), seguido del dímero C-(4 α →6)-C (procianidina B6) y los trímeros C-(4 α →8)-C-(4 α →8)-C (procianidina C2) y C-(4 α →6)-C-(4 α →8)-C. Operando en las condiciones señaladas, la posibilidad de que se produzcan otras reacciones competitivas capaces de disminuir el rendimiento en procianidinas es despreciable (de Freitas, 1995).

2.1.2 – AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

Una vez concluida la hemisíntesis, se procedió a la extracción del medio de reacción de los productos formados, y a su fraccionamiento y posterior purificación individual de la procianidina B3.

La mezcla resultante de la reacción se concentró por evaporación a vacío y el residuo fue redisolto en metanol, se analizó por HPLC y se sometió a fraccionamiento por cromatografía en columna de gel *Sephadex LH-20* usando metanol como eluyente. Después del acondicionamiento del gel en metanol y de haber estabilizado la columna, se añadió la disolución metanólica y se dejó eluir por gravedad. El fraccionamiento de los productos fue seguido por cromatografía en capa fina (TLC) en cromatoplasmas de sílica gel 60, utilizando una mezcla tolueno:acetona:ácido fórmico (3:6:1) como fase móvil y revelando con una disolución de *p*-dimetilaminocinamaldehído (preparada según Capítulo V, apartado 2.3). Tres fracciones fueron recuperadas, concentradas, liofilizadas y analizadas por HPLC. La segunda fracción, la más rica en procianidina B3, se volvió a cromatografiar en *Sephadex LH-20*, eluyendo ahora con etanol. No fue posible, sin embargo, obtener una separación totalmente satisfactoria de procianidina B3 por lo que se procedió a su purificación a través de HPLC semipreparativa, utilizando el sistema cromatográfico correspondiente (ya descrito en el Capítulo III, apartado 1), y bajo las condiciones puestas a punto que se describen a continuación:

Fase estacionaria: Módulo de compresión radial *Waters* Prep LC 25 mm con cartucho de fase reversa Prep Nova-Pak® HR C18 (6 µm, 60 Å, 25 x 100 mm) de *Waters*

Fase móvil: Eluyente A → mezcla [ácido acético:agua] (2,5:97,5) (v/v)
Eluyente B → metanol

Gradiente:

<i>Tiempo (min.)</i>	<i>B (%)</i>	<i>A (%)</i>
0	0	100
10	0	100
25	5	95
30	10	90
40	100	0
55	100	0
60	0	100
70	0	100

Detección: detector de diodos a 280 nm

Flujo: 12 mL.min⁻¹

Volumen de inyección por cada proceso de separación: 2 mL

Con esta tabla de trabajo y en estas condiciones, se logró finalmente separar satisfactoriamente la procianidina B3 de lo que restaba de uno de los trímeros y del residuo de (+)-catequina.

El dímero B3 así separado fue transferido a agua, concentrado en evaporador rotativo, congelado (-36°C) y liofilizado. La pureza del dímero fue comprobada por cromatografía líquida de alta eficacia analítica, según las condiciones que se presentan a continuación, ya utilizadas anteriormente en nuestro laboratorio:

Fase estacionaria: Columna Spherisorb® S3 ODS-2, C18 (3 µm, 4,6 x 150 mm) de *Waters*

Fase móvil: Eluyente A → mezcla [ácido acético:agua] (2,5:97,5) (v/v)
Eluyente B → mezcla [ácido acético (2,5%):acetonitrilo] (90:10) (v/v)
Eluyente C → Acetonitrilo (100%)

Gradiente:

Tiempo (min.)	A (%)	B (%)	C (%)
0	100	0	0
5	0	100	0
30	0	85	15
35	0	50	50
40	0	50	50
50	100	0	0
55	100	0	0

Temperatura de la columna: 25°C**Detección:** detector de diodos a 280 nm**Flujo:** 0,5 mL.min⁻¹

En la figura VII.2 se recoge el cromatograma correspondiente a la procianidina B3 finalmente obtenida, cuyo grado de pureza, estimado a partir del área de un pico en el registro realizado a 280 nm, fue del orden del 90%.

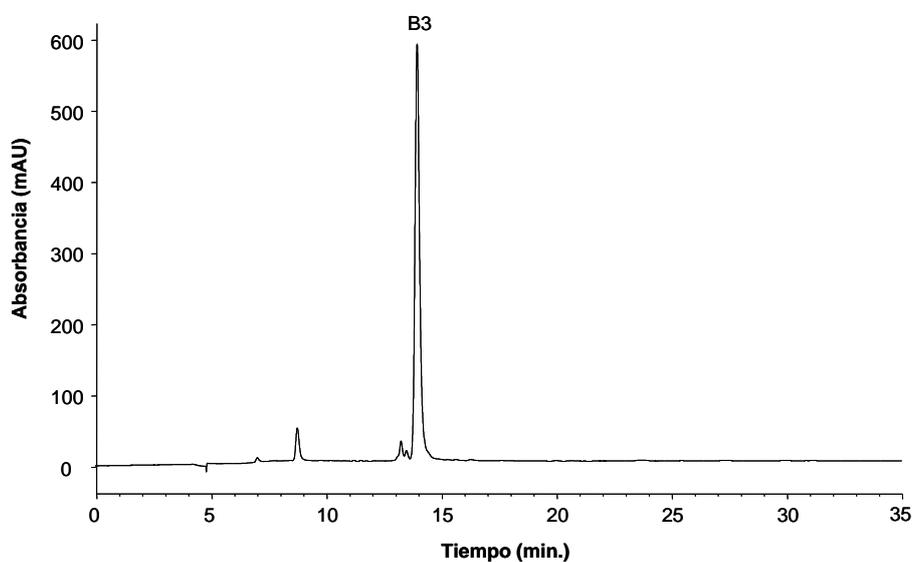


Figura VII.2 – Cromatograma de HPLC (280 nm) correspondiente a la procianidina B3 después de su síntesis, aislamiento y purificación.

2.2 – PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES MODELO

Se prepararon cuatro disoluciones modelo que contenían diferentes combinaciones y concentración de pelargonidina 3-glucósido y flavanoles (catequina y procianidina B3) en tampón citrato 0,1 M a pH 3,5:

Vial 0,2BC, disolución de Pg 3-gluc ($2,4 \times 10^{-3}$ M) + catequina ($0,5 \times 10^{-3}$ M) + B3 ($0,2 \times 10^{-3}$ M), proporciones molares equivalentes a las encontradas en fresa;

Vial 1,0BCSinOx, disolución de Pg 3-gluc ($2,2 \times 10^{-3}$ M) + catequina ($1,5 \times 10^{-3}$ M) + B3 ($1,0 \times 10^{-3}$ M); en este vial se hizo borbotear nitrógeno durante 2 min, antes de ser cerrado con un *septum* de goma y sellado, a fin de simular condiciones anaerobias;

Vial 1,0BCOx, composición idéntica a la del vial 1,0BCSinOx, pero en este caso no se hizo borbotear nitrógeno en el vial antes del cerrado;

Vial 1,5B, disolución de Pg 3-gluc ($2,4 \times 10^{-3}$ M) + B3 ($1,5 \times 10^{-3}$ M).

Los viales 0,2BC, 1,0BCOx y 1,5B fueron cerrados sin excluir el oxígeno, y todas las preparaciones fueron almacenadas en oscuridad en cámara termostatizada a 25°C.

2.3 – ANÁLISIS

A lo largo del tiempo, la evolución de los sistemas modelo fue monitorizada, tomándose alícuotas periódicas de las disoluciones a lo largo de 78 días, para obtener su espectro UV-Visible y realizar análisis por HPLC-DAD. Asimismo, con el objeto de contribuir a la identificación de los nuevos productos formados, algunas de las muestras fueron también analizadas por HPLC-MS. Para el vial **1,0BCSinOx**, la toma de muestra era realizada por punción a través del *septum*, mientras que los restantes viales eran abiertos. La primera muestra (día cero) fue recogida 2 horas después de la preparación de las disoluciones.

2.3.1 – CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA CON DETECCIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE DIODOS

En el Capítulo III, apartado 1, se hizo ya referencia al sistema cromatográfico aquí utilizado, el cual ha operado bajo las condiciones optimizadas para el análisis HPLC-DAS de antocianos de la fresa, descritas en el Capítulo IV, apartado 2.3.

La cuantificación de los sustratos (antociano y flavanoles) se realizó a partir de las áreas de sus picos cromatográficos registrados a 520 nm (Pg 3-gluc) y a 280 nm (catequina y procianidina B3), por comparación con rectas de calibrado obtenidas para patrones externos de cada compuesto. Las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:

$$\text{Concentración catequina (mM)} = 2,94\text{E-}8 \cdot \text{área} - 1,1\text{E-}2$$

$$\text{Coeficiente de regresión (R}^2\text{)} = 0,998$$

$$\text{Concentración B3 (mM)} = 1,82\text{E-}8 \cdot \text{área} - 2,82\text{E-}5$$

$$\text{Coeficiente de regresión (R}^2\text{)} = 0,998$$

Para la cuantificación del antociano se utilizó la ecuación indicada en el Capítulo IV, apartado 2.5.

Para los compuestos formados en las disoluciones modelo, se hizo una cuantificación relativa a partir de las áreas de sus picos en los cromatogramas obtenidos a la longitud de onda más cercana a sus máximos de absorción, entre las utilizadas de modo preferente para el registro de los cromatogramas (250, 280, 330, 360, 440 y 520 nm).

2.3.2 – CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las condiciones cromatográficas (fase estacionaria, fase móvil, gradiente, flujo, detección, volumen de inyección) son idénticas a las utilizadas en el apartado anterior, excepto para el sistema cromatográfico, ya detallado en el Capítulo III, apartado 1.

Los análisis por espectrometría de masas se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas, provisto de fuente de ionización a presión atmosférica (API) y utilizando una interfase de ionización por electrospray (ESI) (Cap. III, ap. 1). El sistema de HPLC estaba conectado a un espectrómetro de masas por la salida del detector de

fotodiodos. Tanto el gas auxiliar como el envolvente eran una mezcla de nitrógeno y helio, y as condiciones empleadas fueron las siguientes:

Temperatura del capilar: 195° C

Voltaje del capilar: 4 V

Flujo del gas envolvente (N₂): 80 (unidades arbitrarias)

Flujo del gas auxiliar (N₂): 20 (unidades arbitrarias)

Gas de colisión: He

Detección: modo positivo; intervalo de masas: $150 \leq m/z \leq 1500$

Energía normalizada de colisión: 45%

En todos los casos, el espectrómetro se programaba para realizar tres barridos consecutivos: uno del espectro total de masas (*full scan*), otro correspondiente al espectro total de masas generado tras la ruptura del ion mayoritario del primer barrido por aplicación de una energía de colisión relativa del 45% (MS^2), y otro correspondiente al espectro de masas generado tras la ruptura del fragmento mayoritario obtenido en el MS-MS, por aplicación de la misma energía de colisión relativa (MS^3).

2.3.3 – MEDIDAS ESPECTRALES

a. Espectro ultravioleta-visible (UV-Vis)

Se registró el espectro UV-Vis de cada toma de muestra en un espectrofotómetro de diodos en el intervalo comprendido entre 200 y 700 nm, utilizando una cubeta de cuarzo de 0,1 cm y una solución tampón citrato (pH 3,5) como referencia.

b. Índice de pardeamiento (IP o *Brown Index*)

A partir del espectro obtenido se obtuvo asimismo el “Índice de Pardeamiento” (IP) como relación entre la absorbancia a 430 nm y la absorbancia a 500 nm (longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia de Pg 3-gluc), tal y como se comentó en el apartado 2.3.3 del Capítulo VI.

3 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 – DISOLUCIONES MODELO DE PELARGONIDINA 3-GLUCÓSIDO, CATEQUINA Y PROCIANIDINA B3

Se prepararon cuatro disoluciones modelo con diferentes combinaciones de Pg 3-gluc y flavanoles, con el objeto de estudiar la influencia de éstos sobre la estabilidad del antociano y la evolución del color. La disolución **0,2BC** se elaboró manteniendo proporciones molares entre los sustratos aproximadamente equivalentes a las que podrían encontrarse en la fresa, de acuerdo con los análisis realizados previamente. En las disoluciones **1,0BCSinOx** y **1,0BCOx** se aumentaron la cantidad y proporciones relativas de catequina y de procianidina B3, para ver si ello influía (positiva o negativamente) sobre la estabilidad del antociano. Una de estas disoluciones - **1,0BCSinOx** - se mantuvo, además, en condiciones anaeróbicas, para poder evaluar el efecto del oxígeno sobre el comportamiento de los flavanoles y sus interacciones con el antociano. Finalmente, se preparó una disolución (**1,5B**) con Pg 3-gluc y procianidina B3, para evaluar las interacciones particulares entre este flavanol y el antociano. Se debe señalar que en trabajos anteriores de nuestro grupo se habían ya realizado ensayos modelo con disoluciones [antociano + catequina] (Francia-Aricha *et al.*, 1998; Santos-Buelga *et al.*, 1995, 1999), razón por la que este tipo de combinación no se incluyó en el presente trabajo.

3.1.1 – EVOLUCIÓN DE ANTOCIANO Y FLAVANOLES

En la figura VII.3 se muestra la evolución de los contenidos de Pg 3-gluc en las cuatro disoluciones modelo a las que se habían incorporado flavanoles. En los tres viales que se mantuvieron en presencia de oxígeno (0,2BC, 1,0BCOx y 1,5B), las diferencias observadas en cuanto a la velocidad de desaparición del antociano no son muy acusadas. De este modo, el Pg 3-gluc había desaparecido totalmente en los viales 0,2BC y 1,0BCOx al cabo de 55 días de almacenamiento, momento en que las cantidades remanentes de antocianos en los viales 1,5B y 1,0BCSinOx eran, respectivamente del 1% y el 11%. El oxígeno se muestra nuevamente como el factor con mayor influencia sobre la estabilidad de Pg 3-gluc (comparar 1,0BCSinOx con el

resto de disoluciones), al igual que ya se había observado en los estudios previos realizados con el antociano (Cap. VI).

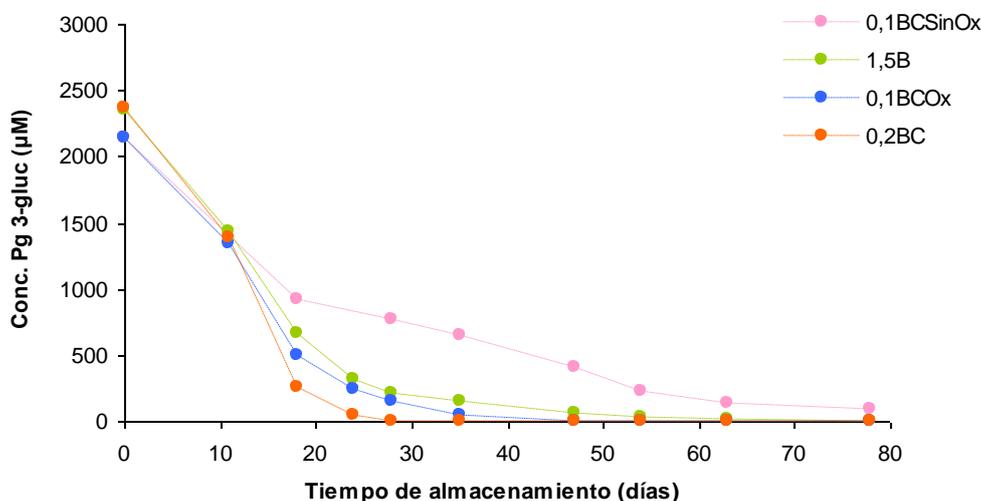


Figura VII.3 – Evolución de los contenidos de Pg 3-gluc en los sistemas modelo 0,2BC, 0,1BCSinOx, 0,1BCOx y 1,5B, a lo largo del almacenamiento a 25°C.

Cuando se compara la evolución del antociano en estos ensayos con la encontrada en los realizados exclusivamente con Pg 3-gluc (figura VII.4), se pone claramente de manifiesto que, en las condiciones del ensayo utilizadas, la presencia de flavanoles no supone un elemento de protección del antociano. Tanto en la representación de la figura VII.4 como por comparación de los tiempos de semivida del antociano en las distintas disoluciones (tabla VII.1), se comprueba claramente como, ya sea en presencia (comparación de GOx con disoluciones 0,2BC, 1,0BCOx y 1,5B) o en ausencia de oxígeno (comparar GsinOx y 1,0BCSinOx), la caída en la concentración de Pg 3-gluc se produce de manera más rápida cuando existen flavanoles en el medio. El efecto desestabilizante de los flavanoles sobre el antociano llega casi a contrarrestar la protección ofrecida por la anaerobiosis, haciendo que la vida media del Pg 3-gluc en el vial 1,0BCSinOx se reduzca hasta valores próximos a los observados en el ensayo realizado con solo antociano en presencia de oxígeno (16,9 frente a 13,6 días; tabla VII.1). De modo general, la ordenación de los viales en función de la tasa de desaparición de pelargonidina 3-glucósido en sentido creciente, queda establecida como sigue: [Pg 3-gluc + N₂] → [Pg 3-gluc + C + B3 + N₂] → [Pg 3-gluc + O₂] → [Pg 3-gluc + B3 + O₂] → [Pg 3-gluc + C + B3 + O₂].

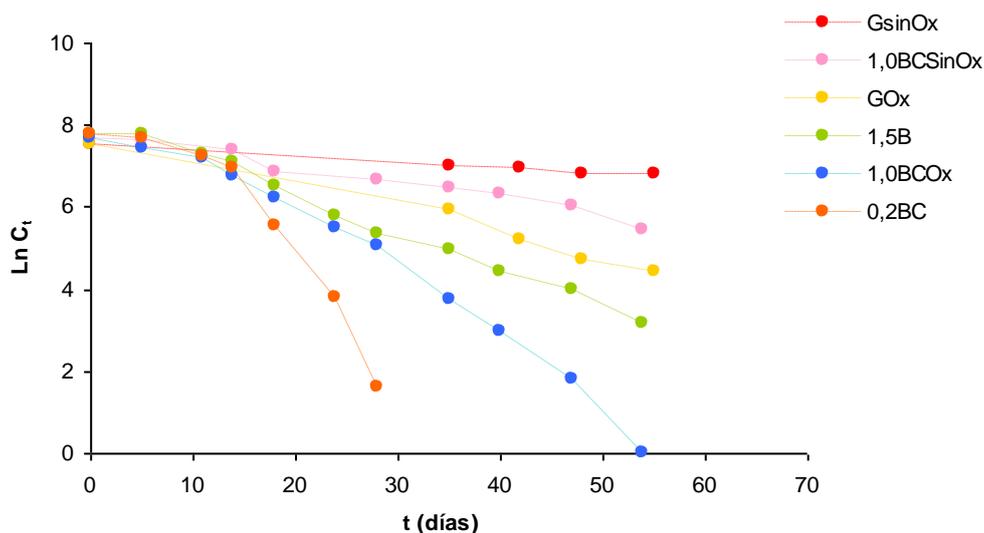


Figura VII.4 – Evolución de la concentración de Pg 3-gluc (escala logarítmica) a lo largo del tiempo (t) en disoluciones modelo, en ausencia (GOx y GsinOx) y en presencia de flavanoles (0,2BC, 1,0BCSinOx, 1,0BCOx y 1,5B).

Estos resultados coinciden sólo en parte con los obtenidos por Poei-Langston y Wrolstad (1981), quienes, estudiando disoluciones modelo (pH 3,4) con una relación molar Pg 3-gluc:C de 1:6,7, encontraron que el porcentaje de retención del antociano disminuía según el orden [antociano + N₂] → [antociano + O₂] → [antociano + flavanol + N₂] → [antociano + flavanol + O₂]. Como se puede observar, esos autores encuentran que cuando la mezcla antociano-flavanol se mantiene en ausencia de oxígeno, el porcentaje de pérdida del antociano es superior que cuando el antociano se encuentra solo en disolución en presencia de oxígeno. Este aspecto no fue constatado en nuestros ensayos en los que el antociano es más estable en ausencia de oxígeno, en presencia o no de flavanoles.

Tabla VII.1 – Tiempo de media vida (t_{1/2}, días), estimado por interpolación para Pg 3-glucósido, catequina y B3 en los sistemas 0,2BC, 1,0BCSinOx, 1,0BCOx, y 1,5B. Se presentan igualmente los valores estimados para las disoluciones control GOx y GsinOx.

Sistema Modelo	Tiempo de media vida, t _{1/2} (días)		
	<i>Pg 3-glucósido</i>	<i>Catequina</i>	<i>B3</i>
GsinOx	48,0	-	-
1,0BCSinOx	16,9	35,9	29,6
GOx	13,6	-	-
1,5B	14,2	-	16,7
1,0BCOx	12,5	17,8	12,3
0,2BC	12,7	15,3	16,0

En la tabla VII.1 se recogen los valores obtenidos al hacer una estimación, por interpolación, del tiempo de media vida ($t_{1/2}$) de los tres sustratos fenólicos incluidos en las disoluciones. Resulta curioso que los tiempos de semivida del antociano sean similares en los viales 0,2BC y 1,0BCOx, aún cuando en la representación de la figura VII.4 se aprecia claramente la mayor estabilidad del Pg 3-gluc en la disolución 1,0BCOx, con una pendiente de pérdida menos acusada que en la disolución 0,2BC después de las dos semanas de almacenamiento. En lo que respecta a los flavanoles, la catequina presenta tiempos de media vida algo superiores a los de B3, excepto en el vial 0,2BC en el cual ambos compuestos muestran $t_{1/2}$ similares. La evolución de los dos flavanoles en las distintas disoluciones se muestra en la figura VII.5, donde se puede observar como la pérdida de procianidina B3 es ligeramente más rápida que la de C en los sistemas 0,2BC, 1,0BCSinOx y 1,0BCOx. La mayor labilidad de la procianidina con relación al monómero había sido ya puesto de manifiesto por otros autores (Oszmianski *et al.*, 1985, de Freitas *et al.*, 1998, Francia-Aricha *et al.*, 1998) y podría ser debida a su mayor capacidad para captar radicales libres oxigenados y, por tanto, de experimentar, en mayor extensión, reacciones de autooxidación.

Un aspecto que parece deducirse de las observaciones realizadas es que la inestabilidad de antociano es algo menor en presencia de una mayor concentración relativa de flavanoles (comparar curvas de pérdida de Pg 3-gluc en las disoluciones 0,2BC y en 1,0BCOx en la figura VII.4). Generalmente se asume que la existencia de una mayor concentración de flavanoles produce un mayor efecto de copigmentación, que podría ofrecer cierta protección al antociano frente a su degradación. No obstante, hay que tener en cuenta que ni catequina ni procianidina B3 pueden considerarse buenos copigmentos de antocianos (Brouillard *et al.*, 1991; Escribano-Bailón *et al.*, 1999; Malien-Aubert *et al.*, 2002). Por otra parte, en estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio, se encontró que no existía un efecto de copigmentación significativo en disoluciones que contenían concentraciones equimolares de antociano y flavanoles (Escribano-Bailón *et al.*, 1999), por lo que éste tampoco sería de esperar que existiera en las disoluciones ahora estudiadas, donde las concentraciones de flavanoles son inferiores en términos molares a las del antociano. La inexistencia de un efecto de copigmentación en estos ensayos quedó, además, patente al comparar los espectros UV-Vis iniciales de las disoluciones del antociano preparadas en presencia y en ausencia de flavanoles, en los cuales no se observaron modificaciones cualitativas ni cuantitativas que denotaran la existencia de una complejación molecular entre el catión flavilio y catequina o procianidina B3.

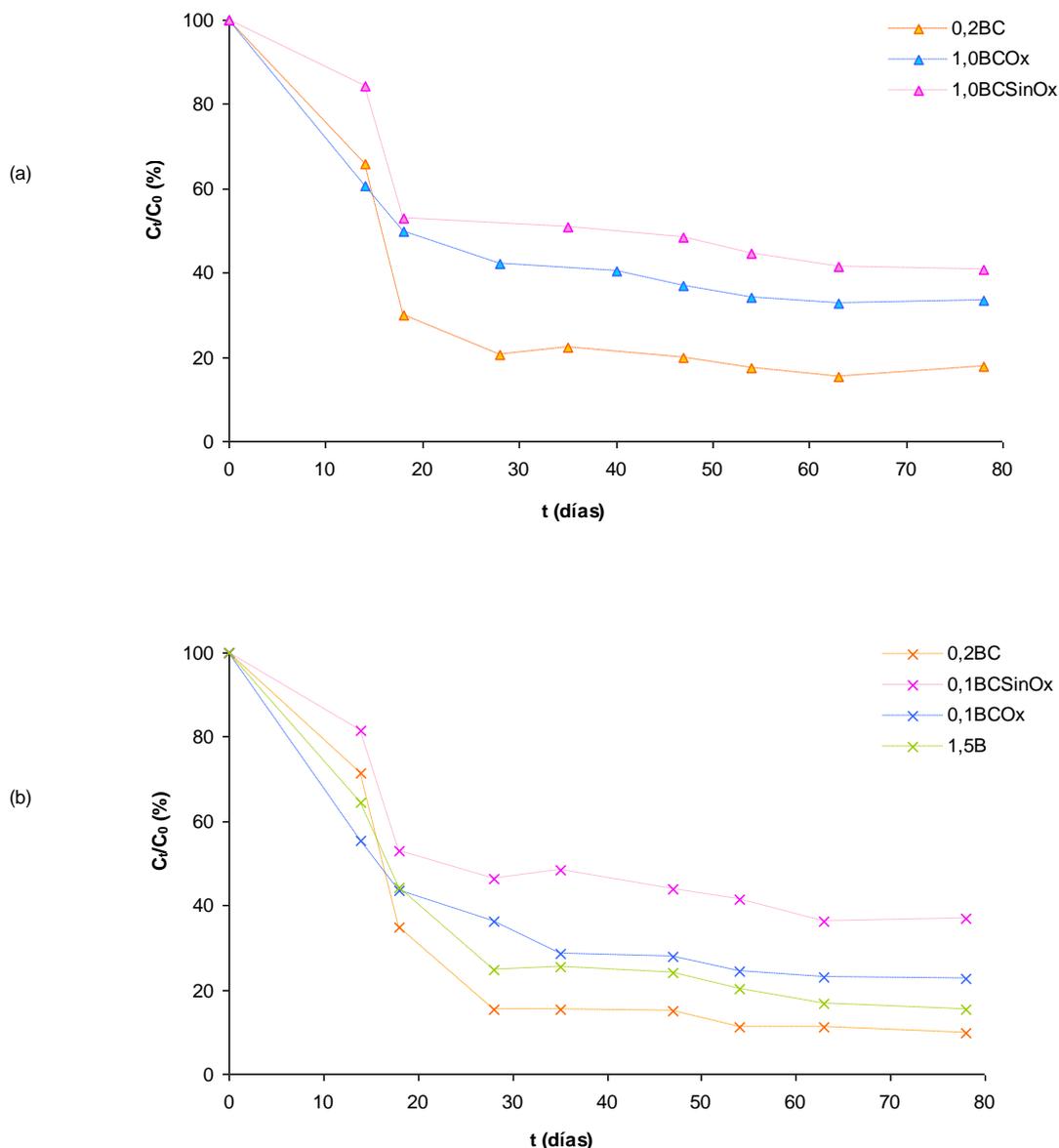


Figura VII.5 – Representación del logaritmo de la concentración vs. tiempo de almacenamiento para catequina (a) y B3 (b), individualmente, en los sistemas 0,2BC, 0,1BCSinOx, 0,1BCOx y 1,5B.

En estas condiciones, una posible explicación alternativa para la menor inestabilidad aparente del antociano en la disolución de mayor concentración de flavanoles podría residir en la actividad de éstos como captadores de oxígeno, que podría, de ese modo, limitar el proceso de oxidación de Pg 3-gluc.

Otro aspecto que se puede deducir de los ensayos realizados es que la presencia de catequina o de la mezcla [C+B3] resulta más desestabilizante para el antociano que la de sólo procianidina B3, lo que se aprecia más claramente al comparar la vida media del Pg 3-gluc en las disoluciones 0,2BC, 1,0BCOx y 1,5B (tabla VII.1). Esta menor inestabilidad del antociano en presencia de procianidina B3 que de catequina no

coincide con la observación realizada en estudios previos en nuestro laboratorio (Francia-Aricha *et al.*, 1998), donde se encontró que la tasa de desaparición del antociano malvidina 3-glucósido era más elevada en presencia de procianidina B3 que de catequina. Hay que tener en cuenta que las condiciones de esos ensayos eran distintas a las existentes en los actuales, ya que se llevaron a cabo en disoluciones de 10% de etanol y 0,5% de ácido tartárico de pH 3,2, donde se incorporaban concentraciones equimolares de antociano y flavanoles (0,4 mM de cada sustrato) e inferiores a las utilizadas en el presente estudio (2,2-2,4 mM de antociano; 0,2 a 1,5 mM de flavanoles). Una característica de aquellos ensayos era que en las disoluciones se producía la formación de acetaldehído por un mecanismo de oxidación del etanol acoplado a flavanoles (Wildenradt y Singleton, 1974; Ciolfi, 1986), lo que daba lugar a la formación de productos de condensación entre antociano y flavanoles mediada por acetaldehído, favorecida además por la mayor acidez del medio. En los ensayos ahora realizados, la formación de acetaldehído no tendría lugar, debido a la ausencia de etanol, lo que evitaría la reacción de condensación a través del mismo y la subsiguiente pérdida de Pg 3-gluc por ese motivo.

El efecto menos perjudicial de la procianidina B3 con respecto a catequina observado en las disoluciones ahora estudiadas no puede tampoco explicarse por un posible proceso de copigmentación. Como se indicado antes, las concentraciones de flavanoles existentes no son suficientes para inducirlo, pero, además, la procianidina B3 es un copigmento menos eficaz de antocianos que catequina, de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Escribano-Bailón *et al.*, 1999). La explicación de las diferencias observadas en la cinética de pérdida del antociano en función del tipo de flavanol podría buscarse nuevamente en la mayor oxidabilidad de la procianidina, que actuaría como un captador de oxígeno más eficaz que catequina, ofreciendo, de este modo, mayor protección relativa al antociano frente a su oxidación. La existencia de una mayor oxidabilidad por parte de la procianidina B3 es coherente con la mayor velocidad de pérdida que ésta experimenta comparada con la de catequina, lo que se traduce en una vida media más corta, como ya se comentado previamente.

Parece lógico suponer que si existe una oxidación preferente de flavanoles sobre el antociano, éste debería encontrarse más protegido en presencia de aquéllos y, por tanto, su velocidad de pérdida debería ser más lenta que la existente en las disoluciones que no contienen flavanoles. El hecho de que esto no ocurra así sugiere que deben existir otras reacciones entre el antociano y los flavanoles distintas a la de

degradación del antociano inducida por el oxígeno. Esta suposición se confirma por la observación de tasas de formación de productos de la ruptura de Pg 3-gluc prácticamente nulas en los ensayos ahora realizados, y la aparición de nuevos productos que resultarían de sus interacciones con los flavanoles, como se discutirá en el siguiente apartado de este capítulo.

3.1.2 – FORMACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS

La disminución en los contenidos de antociano, catequina y procianidina B3 en las disoluciones 0,2BC, 0,1BCSinOx, 0,1BCOx y 1,5B se acompaña de la formación de nuevos compuestos. Entre ellos, los cuantitativamente más importantes (evaluados de acuerdo a las áreas de sus picos en los registros cromatográficos realizados a 280, 330, 440 y 520 nm) se han identificado de forma alfanumérica con la notación P1 a P9. Los picos de estos compuestos aparecen señalados en los cromatogramas de las figuras VII.6 y VII.7 y sus características obtenidas con los detectores de HPLC (longitud de onda de máxima absorción, ion molecular y patrón de fragmentación) se recogen al final de este apartado, en la tabla VII.2.

De acuerdo a sus características de absorción en el UV-visible, los nuevos compuestos formados en las disoluciones se pueden distribuir en dos grupos. El primero integra los picos P1, P5, P6 y P7, correspondientes a sustancias incoloras, que absorben exclusivamente en la zona del UV, cuyos espectros se recogen en la figura VII.8. El segundo grupo corresponde a los picos P2, P3, P4, P8 y P9, que muestran absorción en la zona visible del espectro y, por tanto, tienen color. Los espectros de estos últimos se recogen más adelante en la figura VII.18, junto con la discusión acerca de los mismos.

Un primer aspecto a señalar es que en ninguna de las disoluciones que contienen flavanoles se detecta la formación de cantidades significativas de productos procedentes de la ruptura hidrolítica del antociano: 2,4,6-trihidroxibenzaldehído (2,4,6-THB) y ácido p-hidroxibenzoico (*p*-HB). Una observación parecida fue ya realizada en estudios anteriores de nuestro grupo (Francia-Aricha *et al.*, 1998), en disoluciones de malvidina 3-glucósido (Mv 3-gluc), en las cuales se producía una menor acumulación de ácido siríngico (procedente del resto del anillo B liberado en la ruptura de ese antociano) en las disoluciones que contenían [Mv 3-gluc + flavanoles], que en las que sólo presentaban Mv 3-gluc. De manera general, los resultados obtenidos en ambos

ensayos sugieren que la presencia de flavanoles limita la degradación hidrolítica de antocianos, posiblemente, como se ha comentado en el apartado anterior, por actuar como captadores preferenciales del oxígeno en las disoluciones, protegiéndolo así de su degradación oxidativa. Como antes se señaló, existen, no obstante, diferencias en cuanto a las características de composición de las disoluciones modelo utilizadas por Francia-Aricha *et al.* (1998) y las ahora empleadas, entre ellas la presencia en estas últimas de ácido cítrico, también con actividad antioxidante, lo que podría justificar que en los ensayos anteriormente realizados se llegara a observar cierta ruptura del antociano en presencia de flavanoles.

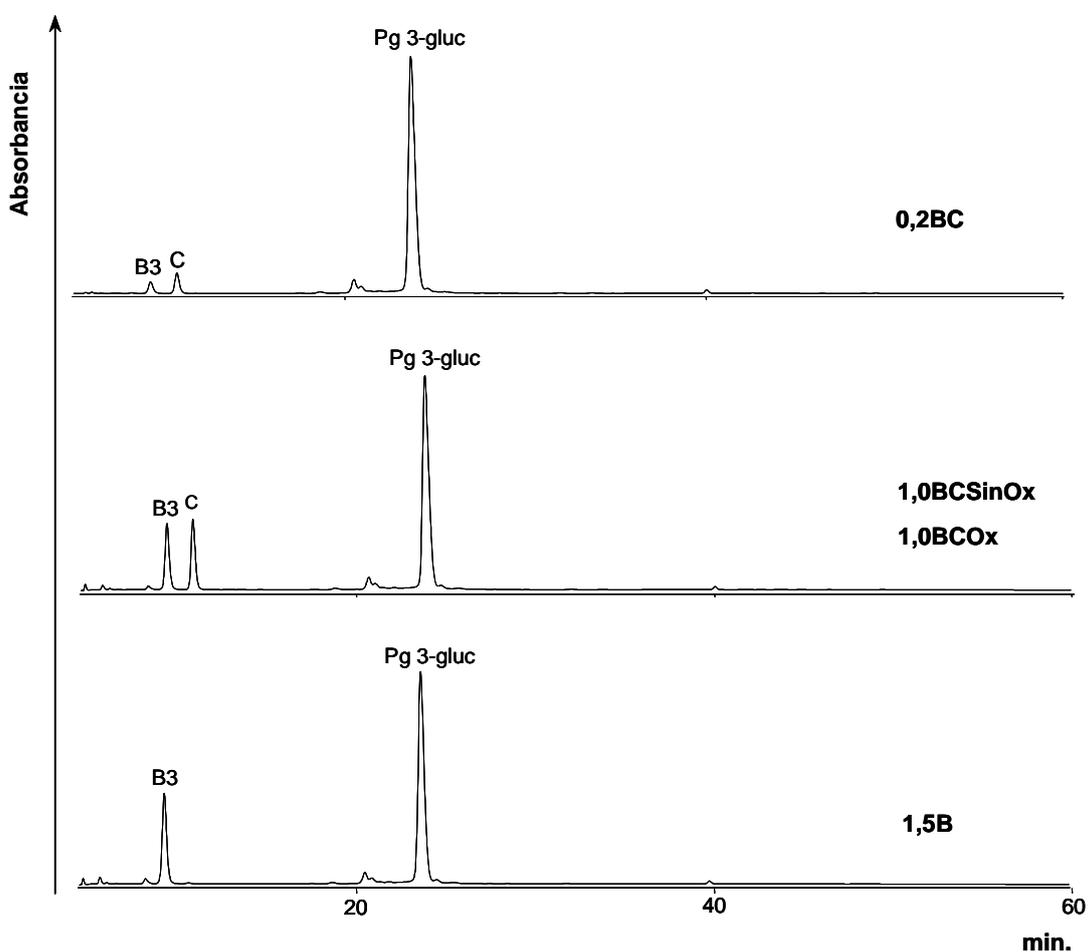


Figura VII.6 – Cromatogramas de HPLC, registrados a 280 nm, obtenidos en el día 0 de ensayo para las diferentes disoluciones de antociano y flavanoles estudiadas. La escala cromatográfica es la misma en todos los casos.

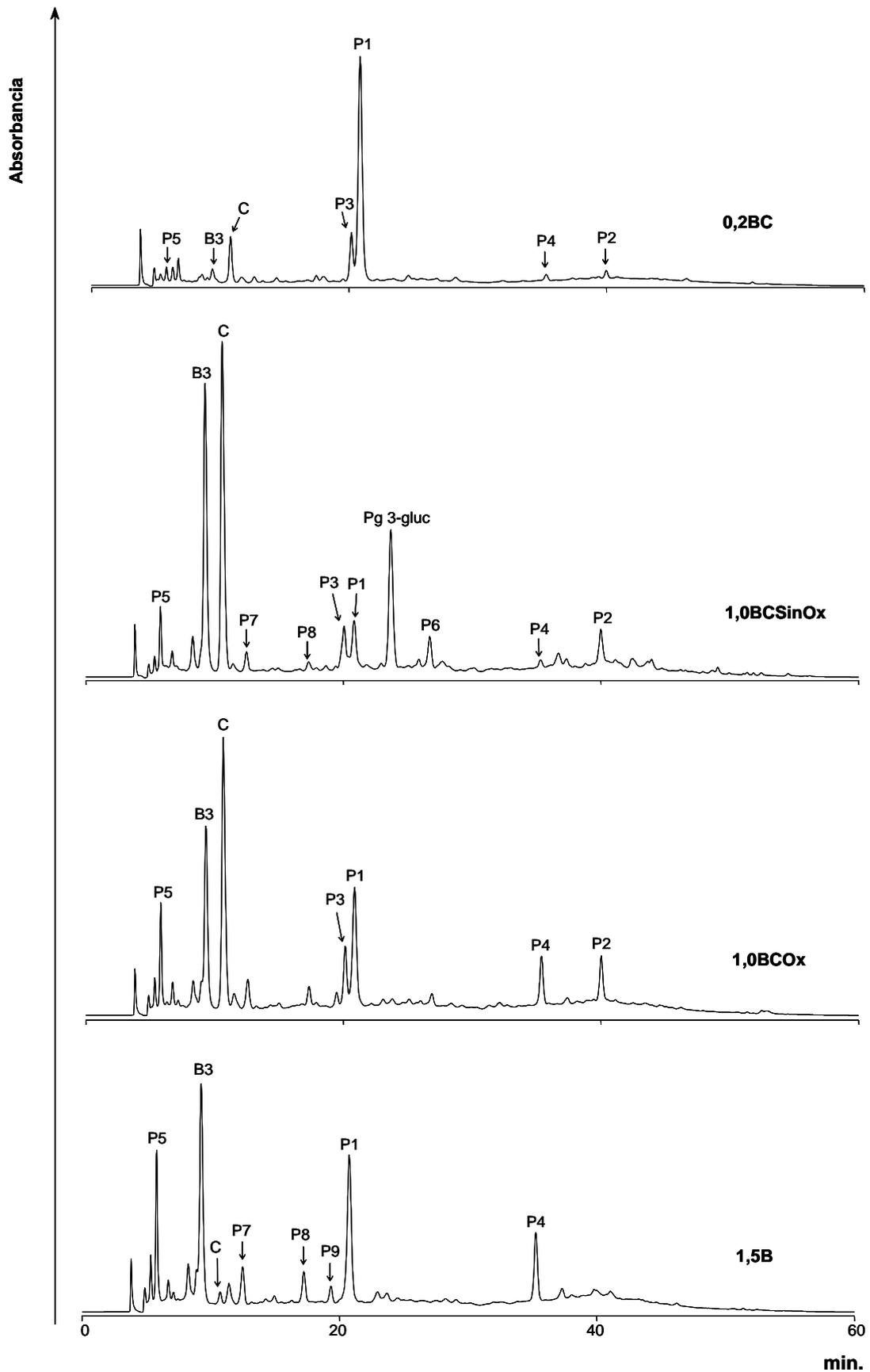


Figura VII.7 – Cromatogramas de HPLC, registrados a 280 nm, obtenidos en el día 78 de ensayo para las diferentes disoluciones de antociano y flavanoles estudiadas. La escala cromatográfica es la misma en los cuatro cromatogramas.

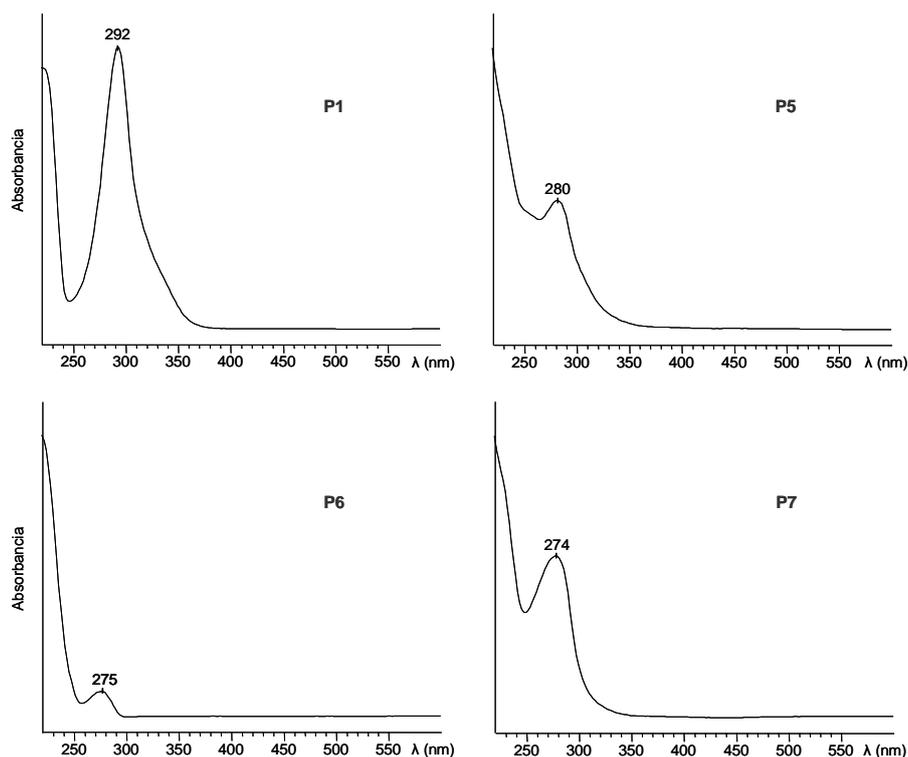


Figura VII.8 – Espectros UV-visible de los nuevos compuestos incoloros formados en las disoluciones 0,2BC, 1,0BCSinOx, 1,0BCOx y 1,5B.

El posible mayor potencial antioxidante existente en las disoluciones que contienen flavanoles no impide, sin embargo, que en presencia de éstos se produzca una pérdida más acusada del antociano que la que tiene lugar en su ausencia, por lo que se debe suponer que se están favoreciendo otro tipo de reacciones de desaparición del Pg 3-gluc. Una de ellas podría ser la que conduce a la formación del compuesto P1 ($\lambda_{\text{máx}} = 292 \text{ nm}$).

Pico P1

Su ion molecular ($m/z = 257$) y características cromatográficas y espectrales confirman que se trata del mismo producto que era designado como pico **b** en las disoluciones GOx y GsinOx. Este compuesto no pudo ser definitivamente identificado, aunque se concluía que el mismo debía resultar de la transformación no oxidativa de Pg 3-gluc por un mecanismo distinto al de ruptura hidrolítica del antociano (apartado 3.2.1, capítulo VI). La aparente supresión de esta última vía favorecida por la presencia de flavanoles haría que existiera más antociano disponible para la formación de P1, explicando, de este modo, la mayor acumulación del mismo que se produce en las disoluciones 0,2BC, 1,0BCOx y 1,5B con respecto a la encontrada en los ensayos que

no contenían flavanoles (figura VII.9). La ausencia de oxígeno en la disolución 1,0BCsinOx actúa como factor de protección del antociano, haciendo que la acumulación de P1 sea mucho más baja en la misma.

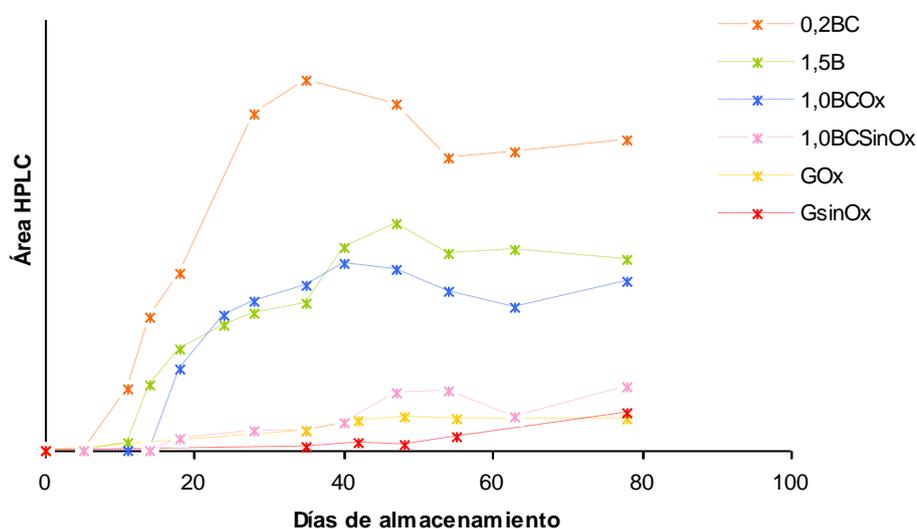


Figura VII.9 – Evolución de las áreas cromatográficas (280 nm) del pico P1 en los distintos sistemas modelo.

En la figura VII.9 se puede también comprobar que hay mayor producción de P1 en la disolución 0,2BC que en 1,0BCOx y en 1,5B. Hay que tener en cuenta, como luego se comentará, que paralelamente a la formación de P1, el antociano desaparece de las disoluciones por su reacción con flavanoles, proceso que tiene lugar en mayor extensión en las preparaciones 1,0BCOx y 1,5B, donde existen mayores contenidos de éstos. De este modo, en esas disoluciones la cantidad de antociano disponible para experimentar otro tipo de reacciones es menor, lo que explicaría los niveles más bajos de P1 acumulados en las mismas.

Picos P5 y P7

Los picos P5 y P7 (espectro UV en figura VII.8) poseen idéntico ion molecular (m/z 577) y similar patrón de fragmentación. La masa de ambos compuestos y su espectro UV coinciden con la de un dímero de tipo proantocianidina unido mediante un enlace de tipo A; además, su patrón de fragmentación es similar al descrito por Remy-Tanneau *et al.* (2003) para ese tipo de compuestos, con la formación de dos fragmentos principales resultantes de la fisión RDA de una catequina (-152 u.m.) y del resto floroglucinol (-126 u.m.) correspondiente al flavonoide situado en la parte superior del dímero. El hecho de

que se acumulen mayores niveles de P5 y P7 a medida que aumenta el contenido de procianidina B3 en las disoluciones (1,5B > 1,0BCOx \approx 1,0BCSinOx > 0,2BC) sugiere una implicación de este flavanol en su formación, por lo que, de poseer la estructura sugerida, habría que suponer que los compuestos resultan de una reestructuración de B3, tras hidrólisis de su enlace interflavánico. Este proceso llevaría a la liberación de un carbocatión C4⁺ a partir de la subunidad superior y de una catequina libre a partir de la subunidad inferior; la posterior reacción entre ambas (así como de la catequina añadida en las disoluciones 0,2BC, 1,0BCSinOx y 1,0BCOx) conduciría a la formación de las nuevas proantocianidinas. La formación de dos compuestos se justificaría por la reacción alternativa del carbocatión sobre las posiciones nucleófilas C6 y C8 de la unidad catequina. Desde este punto de vista, P5 poseería un enlace interflavánico C4→C8, C2→O→C7, mientras que P7 lo tendría C4→C6, C2→O→C5 (estructuras representadas en la figura VII.10). Esta suposición parte de la base de que el enlace C4→C8 está favorecido con relación al C4→C6 – lo que explicaría los mayores niveles de P5 que de P7 – y que los compuestos con enlace C4→C6 eluyen generalmente a tiempos de retención más altos, como ocurre en el caso de P7 con relación a P5.

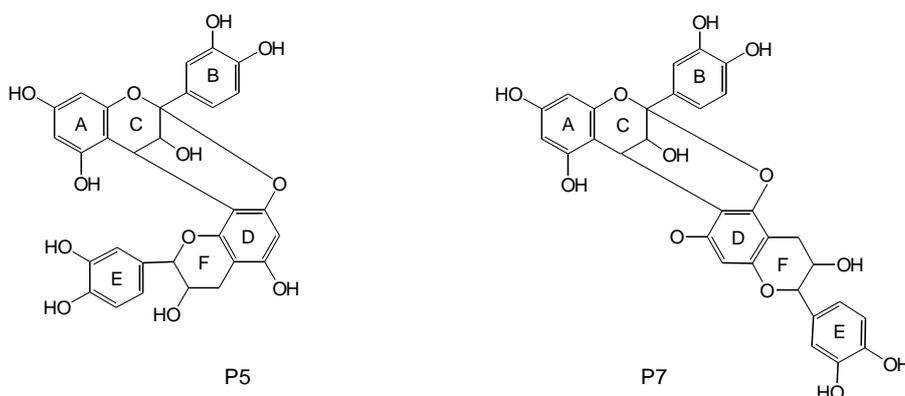


Figura VII.10 – Estructuras propuestas para los productos P5 y P7 con enlace de tipo A.

Otra posibilidad estructural que también encaja con las características espectrales y de masas de P5 y P7 es que correspondieran a compuestos resultantes de la condensación directa entre el carbocatión C4⁺ resultante de la hidrólisis de B3 sobre las posiciones nucleófilas C6 y C8 del antociano en forma hidratada, para formar un dímero de tipo flavanol-antociano hidratado (F-AOH) (figura VII.11). Por las mismas razones indicadas en el párrafo anterior, P5 debería poseer el enlace C4→C8 y P7 el de tipo C4→C6. Este tipo de estructura también explicaría los principales los fragmentos observados en los espectros MS² y MS³, como se esquematiza para el compuesto P5 en la figura VII.12. El hecho de que el principal fragmento MS² (m/z 425)

derive de la fisión Retro Diels-Alder (RDA) de una unidad catequina (-152 u.m.), apoyaría que la misma se encuentra localizado en la subunidad superior del dímero, ya que es sobre ésta donde se produce la fisión RDA de manera preferente (de Pascual-Teresa *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2000). Un aspecto en contra de este tipo de condensados es que se puede también considerar que la presencia en el mismo del antociano en forma no glicosilada debería conferirle inestabilidad, conduciendo a su pronta degradación o transformación, como posteriormente se comentará también para la formación del producto P3. En todo caso, tampoco existen referencias sobre la estabilidad de aglucones antociánicos incorporados a este tipo de estructuras condensadas, las cuales podrían ser más estables de lo inicialmente supuesto.

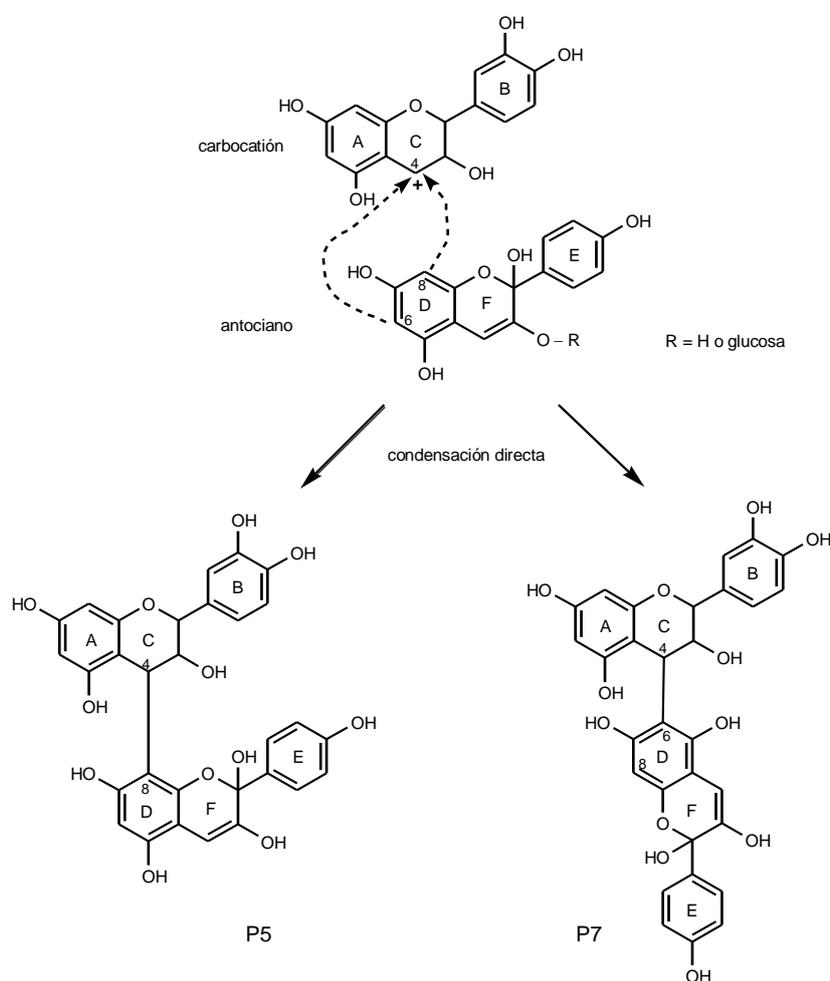
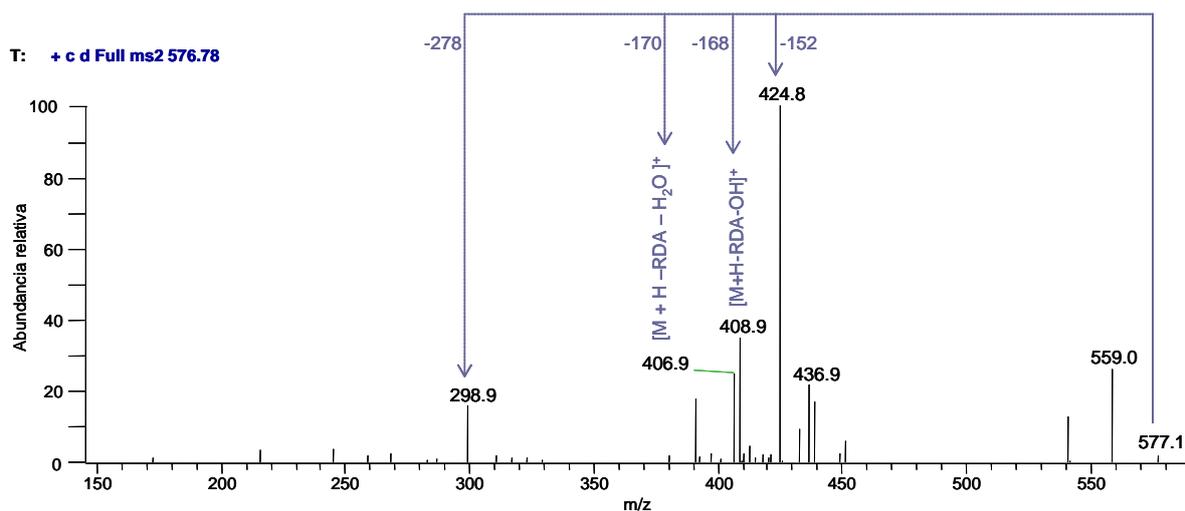


Figura VII.11 – Estructuras alternativas para P5 y P7 formadas por condensación directa entre el carbocatión C₄⁺ resultante de la hidrólisis de B3 sobre las posiciones C6 y C8 de pelargonidina en forma hidratada.



T: + c d Full ms3 576.78@45.00 424.82

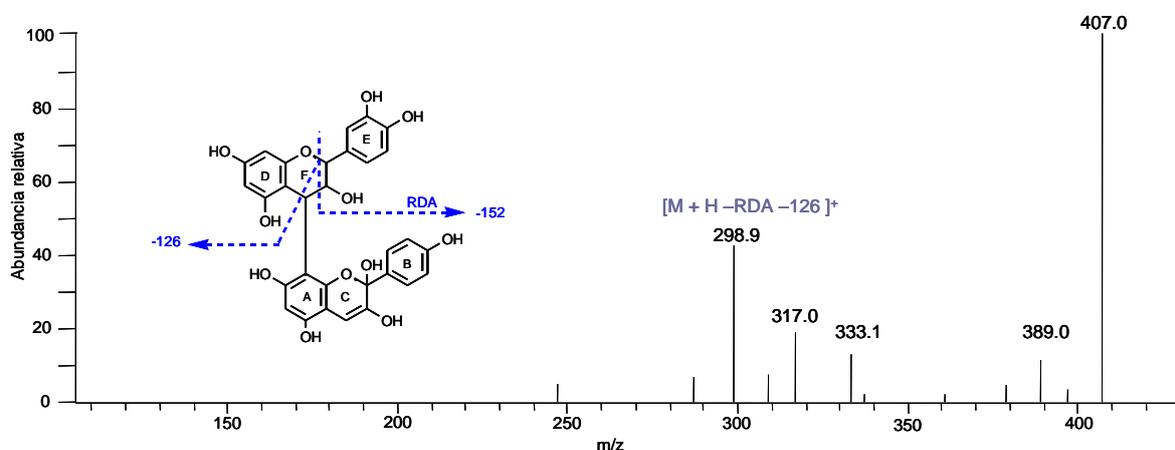


Figura VII.12 – Esquema de fragmentación de la estructura alternativa F-AOH propuesta para el compuesto P5.

La formación en disoluciones modelo de estructuras como las sugeridas para P5 y P7 en la figura VII.11, resultantes de la reacción entre un carbocatión procedente de la despolimerización de una procianidina y un antociano en forma hidratada ha sido recientemente confirmada por Salas *et al.* (2003), encontrando para los mismos patrones de fragmentación MS² y MS³ similares a los obtenidos por nosotros. La presencia de aductos flavanol-antociano derivados de este tipo de condensación ha sido igualmente detectada en vinos tintos (Salas *et al.*, 2004; Vivar-Quintana *et al.*, 1999), si bien en todos estos casos anteriores la molécula de glucosa permanecía unida al resto antociano. Por otra parte, se puede esperar que en este tipo de condensados (F-AOH) el resto antociano hidratado estuviera en equilibrio con su correspondiente forma flavilio (F-A⁺), como encuentran Salas *et al.* (2003). En nuestro estudio no llega a detectarse ningún pico significativo con un ion molecular de m/z 559, que sería el atribuible al pigmento de estructura F-A⁺. No obstante, esto no significa que

se deba descartar que P5 y P7 sean condensados de tipo F-AOH, ya que se debe tener en cuenta que los ensayos de Salas *et al.* (2003) fueron realizados en disoluciones de pH 2, lo que favorece el desplazamiento de equilibrios hacia la forma flavilio del antociano, mientras que en nuestro caso el pH utilizado era de 3,5, al cual la forma favorecida es la base hidratada (al menos si se juzga por lo que ocurre en el caso de los equilibrios que se establecen entre antocianos puros).

Un importante factor en contra de que P5 y P7 correspondan a proantocianidinas de tipo A, como las formadas a través del primero de los mecanismos sugeridos, es que este tipo de compuestos poseen tiempos de retención en fase reversa más altos que los de las procianidinas unidas por un único enlace C-C, como es el caso de la procianidina B3, lo que no coincide con lo observado en estos ensayos. Otro aspecto en contra de este tipo de estructura es la dificultad para explicar cómo llega a establecerse el enlace éter adicional, lo cual exigiría que el C2 de la subunidad superior se encontrara activado (p.ej. existencia de un doble enlace o de un sustituyente hidroxilo), tal y como se recoge en el mecanismo propuesto por Jurd y Waiss (1965) para la formación de este tipo de compuestos doblemente unidos (ver posteriormente figura VII.16). Ambas circunstancias nos llevan a suponer como más probable para P5 y P7 la estructura de tipo F-AOH, a pesar de las insuficientes explicaciones que pueden ofrecerse para justificar la pérdida de la molécula de glucosa del resto antociano y la estabilidad de los derivados condensados obtenidos.

Otro aspecto a señalar es que P5 y P7 carecen de molécula de glucosa en su estructura, por lo que su formación a través de cualquiera de los dos mecanismos sugeridos implica la separación del azúcar, que podría tener lugar antes (es decir, con formación previa del aglucón del antociano) o después del proceso de condensación. Esta última alternativa podría ser más plausible dada la inestabilidad de los aglucones antociánicos, para los que es de esperar una rápida degradación.

Por último, se debe también indicar que Guyot *et al.* (1996) identificaron una serie de productos resultantes de la oxidación enzimática de catequina que poseían idéntico ion molecular (m/z 577) que P5 y P7. Las estructuras de esos compuestos se recogen en la figura VII.13. No obstante, se trata de productos amarillos y no incoloros como los ahora encontrados, de difícil formación por vía exclusivamente química, como los propios autores indican, por lo que cabe descartar su presencia en las disoluciones aquí estudiadas.

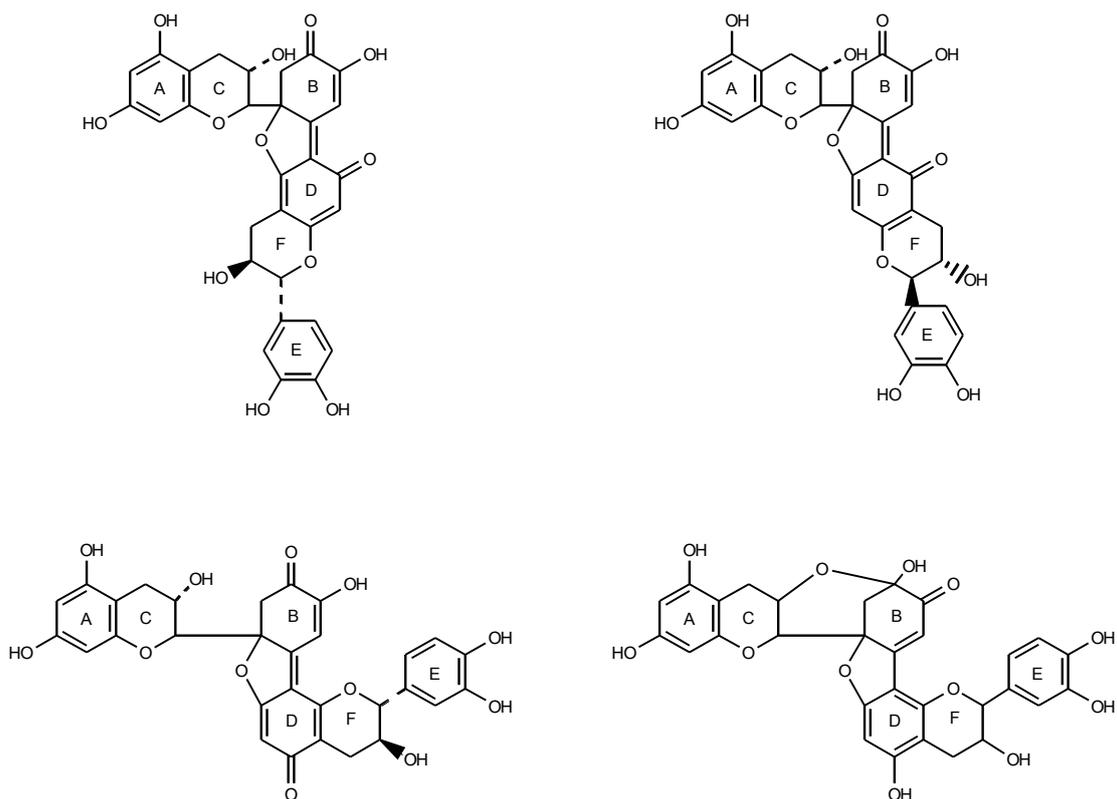


Figura VII.13 – Estructuras propuestas por Guyot *et al.* (1996) para productos resultantes de la oxidación enzimática de catequinas, con iones moleculares de m/z 577 (modo positivo).

Pico P6

El compuesto P6 ($\lambda_{\text{máx}} = 276$ nm) es detectado en los viales 0,2BC, 1,0BCSinOx y 1,0BCOx, aunque sólo en 1,0BCSinOx aparece en niveles significativos. La presencia de este producto en estas disoluciones y su no detección en el vial 1,5B (sin adición de catequina), sugiere ya inicialmente que la procianidina B3 no se encuentra implicada en su formación. El valor de m/z 723 coincide con la masa de un aducto que posee restos de pelargonidina 3-glucósido y (+)-catequina unidos mediante un doble enlace interflavánico similar al existente en las proantocianidinas de tipo A (figura VII.15). La formación en disoluciones modelo de este tipo de dímeros incoloros resultantes de la condensación directa entre antocianos y catequinas ha sido observada tanto en nuestro laboratorio (Santos-Buelga *et al.*, 1999) como por otros grupos (Bishop y Nagel, 1984; Remy-Tanneau *et al.*, 2003). Su formación había sido ya especulada por Jurd y Waiss (1965) y la confirmación de su estructura por técnicas espectroscópicas (espectrometría de masas y RMN) fue realizada por Bishop y Nagel (1984) y más recientemente por Remy-Tanneau *et al.* (2003). La figura VII.14 recoge los espectros de masas (ion molecular) y de fragmentación (MS^2) obtenidos para el pico P6. El fragmento principal de m/z 571 resulta de la fisión RDA de la unidad catequina del

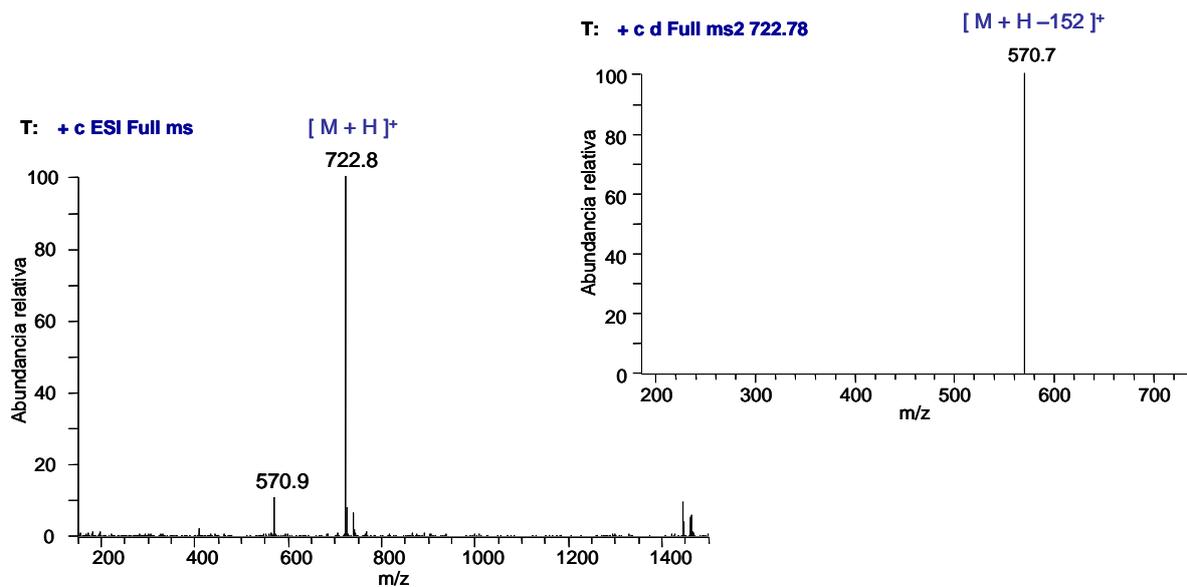


Figura VII.14 – Espectros de masas (ion molecular) y de fragmentación (MS^2) del compuesto P6.

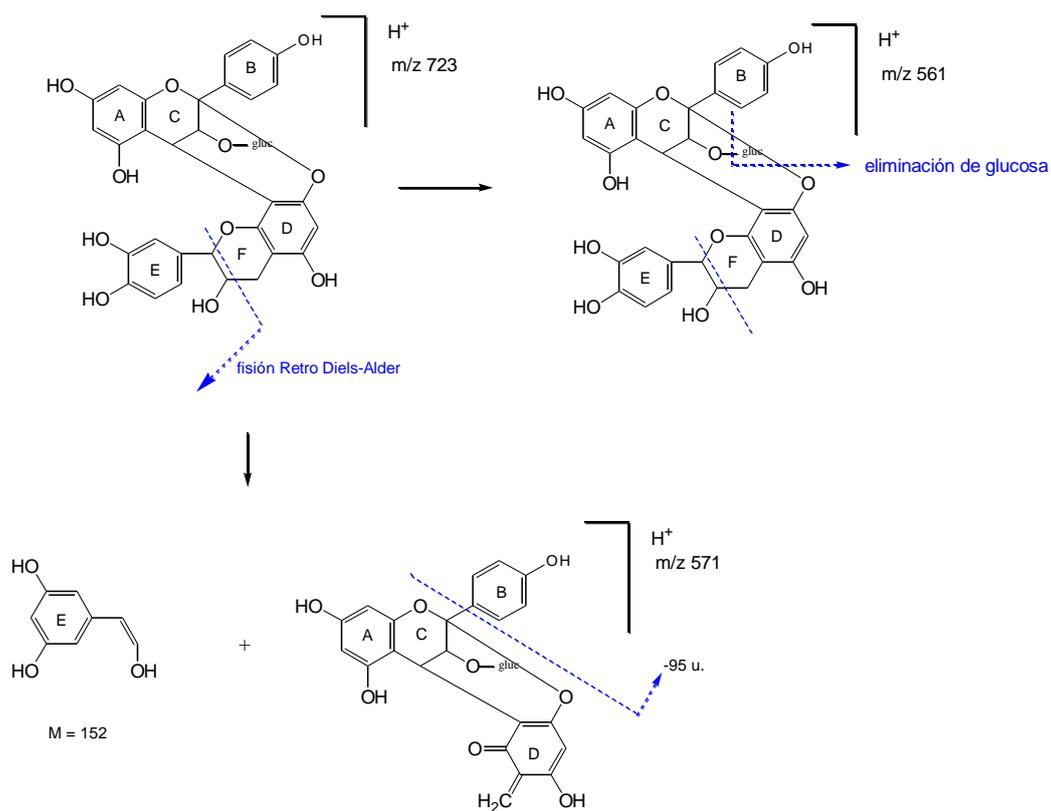


Figura VII.15 – Estructura propuesta para el compuesto P6 y esquema de fragmentación RDA en ESI-MS que da lugar al fragmento principal detectado en MS^2 .

dímero $[M+H-152]^+$ (figura VII.15); adicionalmente, en algunos espectros, se detectan dos señales más débiles de m/z 561 y 628 que corresponden, respectivamente, a la pérdida de la molécula de glucosa $[M+H-162]^+$ del resto antociano y de un grupo fenol C_6H_6O $[M+H-95]^+$, atribuible al anillo B del antociano.

En la figura VII.16 se recoge el mecanismo de formación propuesto por Jurd y Waiss (1965) para este tipo de dímeros antociano-catequina doblemente ligados. El mismo requiere la presencia de la forma flavilio del antociano, que reaccionaría a través de su posición electrófila en C4 con la posición nucleófila C8 (más probable) de una unidad flavanol. Se formaría así, un intermediario condensado en el que el resto

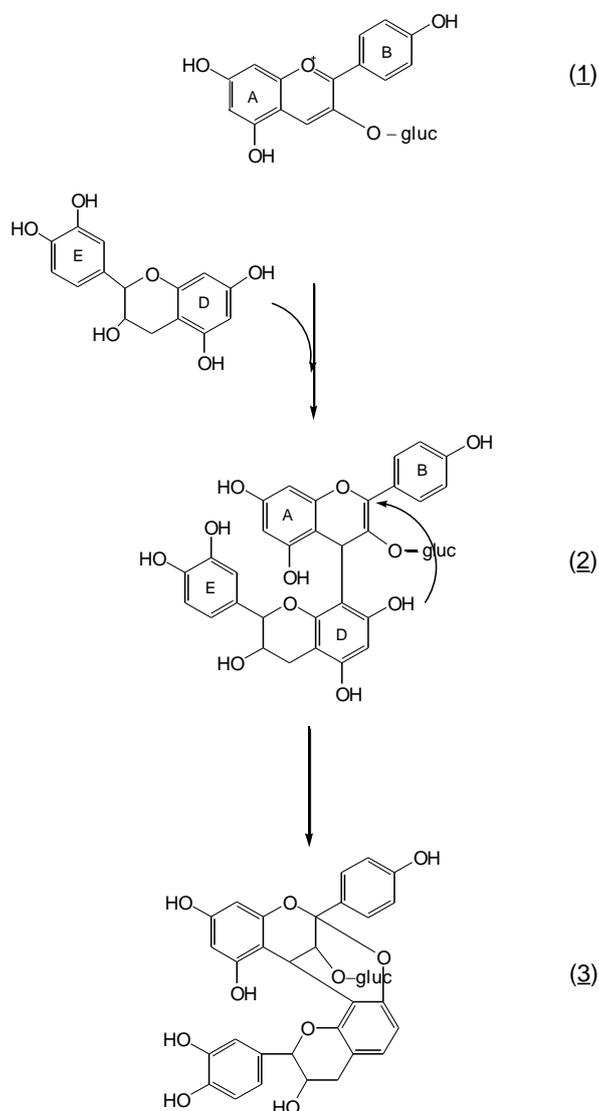


Figura VII.16 – Mecanismo propuesto para la formación del compuesto P6, de acuerdo con lo sugerido por Jurd y Waiss (1965).

correspondiente al antociano se encontraría en forma flaveno (2), con posterior adición intramolecular del grupo hidroxilo del flavanol al doble enlace en C2-C3. Jurd y Waiss (1965) consideran que este tipo de estructura doblemente ligada (3), a través de puentes de tipo éter y carbono-carbono, es más estable y está más favorecida en medio ácido que la forma condensada simple (2). Las mayores cantidades de P6 formadas en la disolución 1,0BCSinOx, mantenida en condiciones anaerobias, que su equivalente 1,0BCOx, apuntan claramente a que la formación del compuesto está favorecida en un medio poco oxidante.

De acuerdo con Somers (1971), en medios oxidantes, también podría esperarse que en la estructura (2) se produjera nuevamente la oxidación de la forma flaveno para regenerar la forma flavilio del antociano, dando lugar de esta forma a un pigmento condensado de tipo A⁺-T para el que cabría esperar un color rojo, estructuras que no han llegado a observarse en nuestros ensayos. Otra posibilidad sería la reorganización del condensado flaveno (2) hacia una estructura xantilio, como propusieron Liao *et al.* (1992) y Santos-Buelga *et al.* (1995), reacción que, como luego se comentará, podría ser el origen de la formación de alguno de los nuevos pigmentos de tonalidad amarilla cuya formación se observa en las disoluciones (como es el caso de P3).

Además de los productos incoloros comentados en los párrafos anteriores, en las disoluciones también se observó la formación de nuevos pigmentos con máximos de absorción en la zona visible del espectro a longitudes de onda comprendidas entre 425-450 nm (figura VII.17). En la figura VII.18 se muestran cromatogramas de las disoluciones registrados a 440 nm donde se pueden observar de manera específica los nuevos pigmentos, entre los cuales destacan por los niveles alcanzados por P2, P3 y P4. Los picos P2 y P3 no aparecen en el sistema 1,5B, lo que indica que en su formación interviene la catequina, mientras que P4 es el principal pigmento formado en la disolución 1,5B y alcanza también niveles relativos relevantes en 1,0BCOx, sugiriendo que la procianidina B3 es uno de sus precursores. Los picos P8 y P9 presentan áreas inferiores a las de los pigmentos anteriores y sólo son importantes en los sistemas 1,5B y 1,0BCOx, sugiriendo también que B3 se encuentra implicado en su formación.

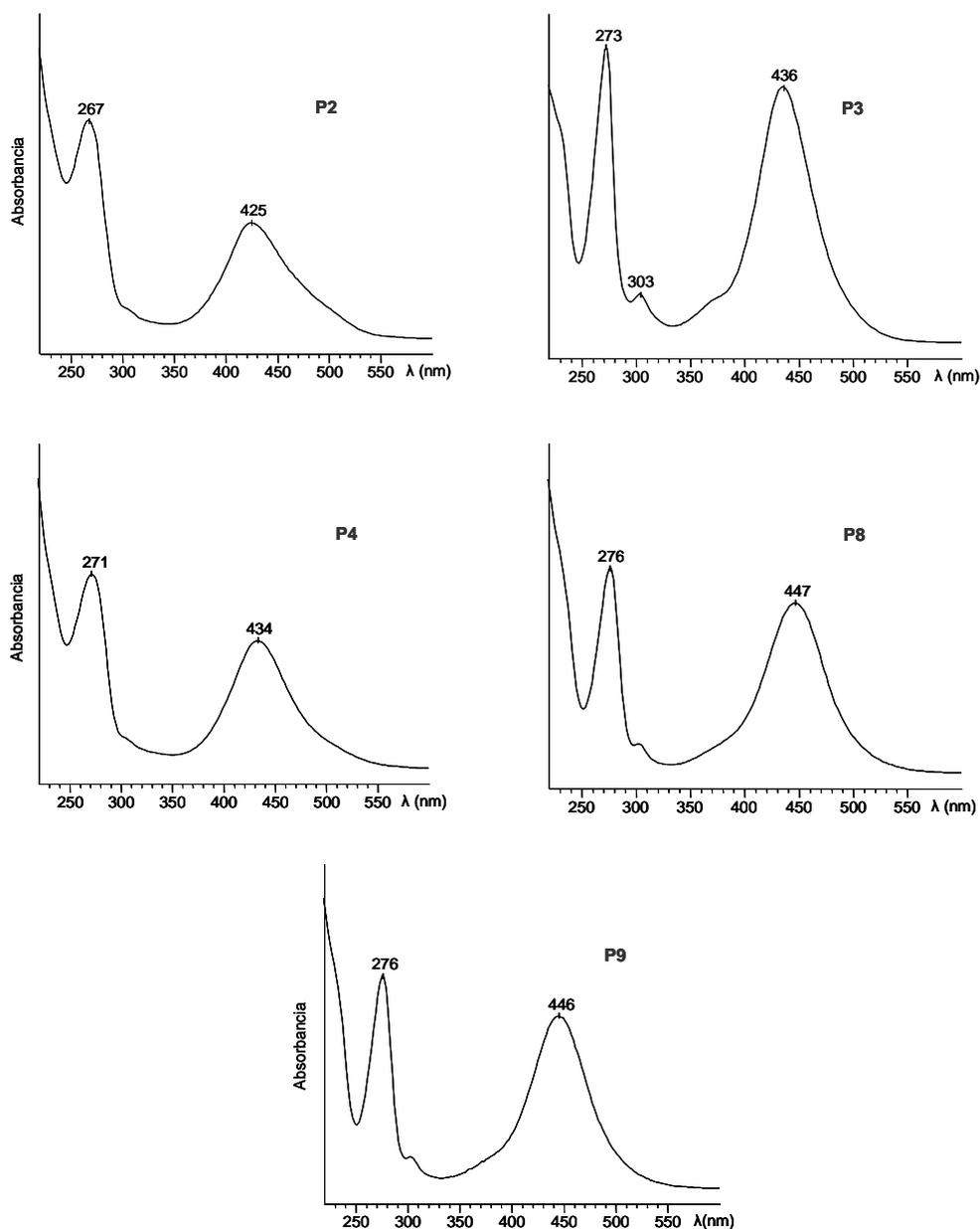


Figura VII.17 – Espectros UV-visible de los principales nuevos compuestos coloreados formados en los sistemas modelo 0,2BC, 1,0BCsinOx, 1,0BCOx y 1,5B.

Pico P3

Este compuesto presenta un ion molecular de m/z 453 (figura VII.19). En MS^2 se observa la formación de un fragmento de m/z 301 que se atribuye al resultado de una fisión RDA $[M+H-152]^+$ sobre una unidad catequina; el fragmento de m/z 257 $[M+H-152-44]^+$ correspondería a la pérdida de un grupo $-COOH$. Los fragmentos de m/z 435 y m/z 283 derivarían de la pérdida de una molécula de agua a partir del compuesto original y del producto de la fisión RDA respectivamente. Estos datos están en

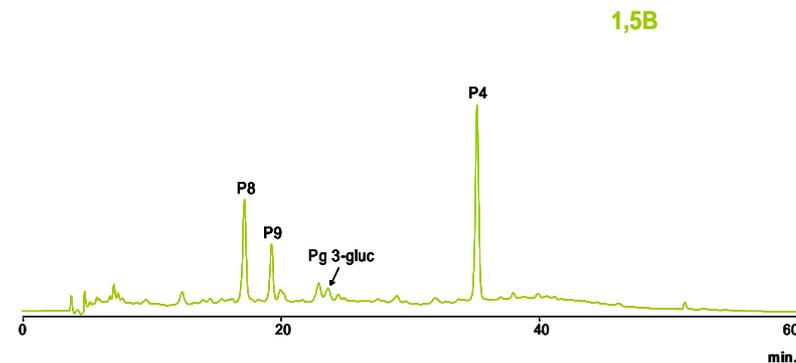
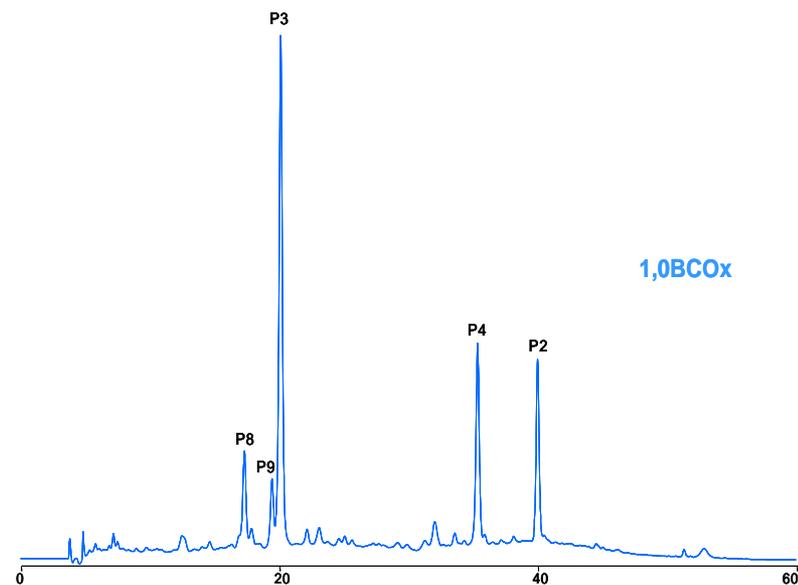
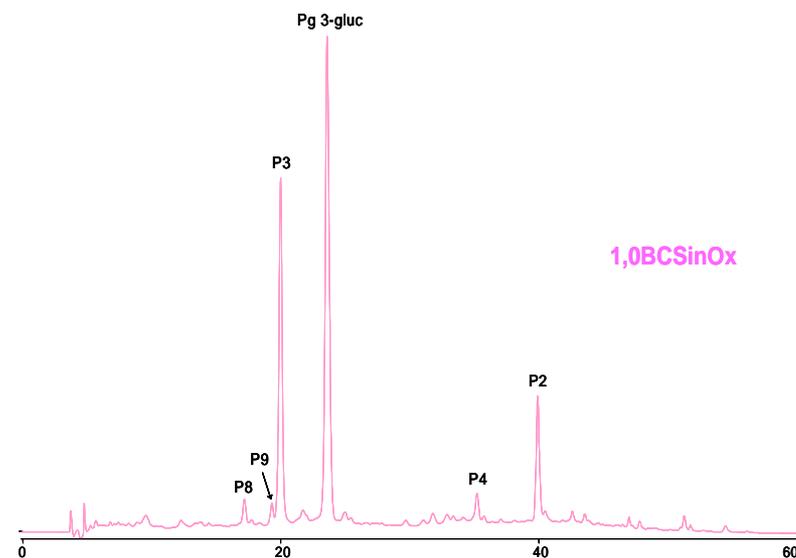
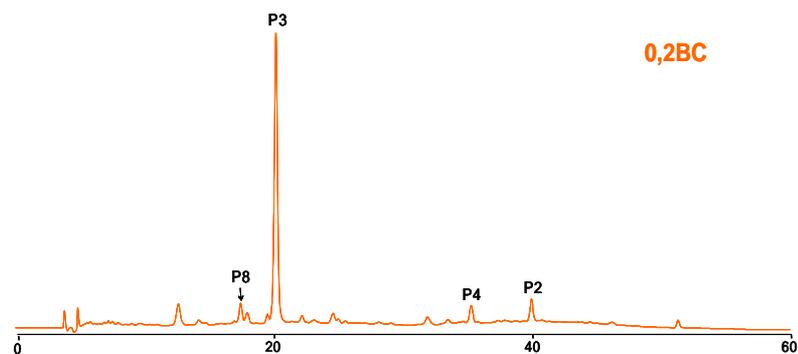


Figura VII.18 – Cromatogramas de HPLC, registrados a 440 nm, de las disoluciones 0,2BC, 1,0BCSinOx, 1,0BCOx y 1,5B al cabo de 78 días de almacenamiento. Las escalas son las mismas en todos los cromatogramas.

consonancia con la estructura de tipo xantilo que se muestra en la misma figura VII.19, estructura que también resulta coherente con el espectro UV-visible obtenido para el compuesto (figura VII.17).

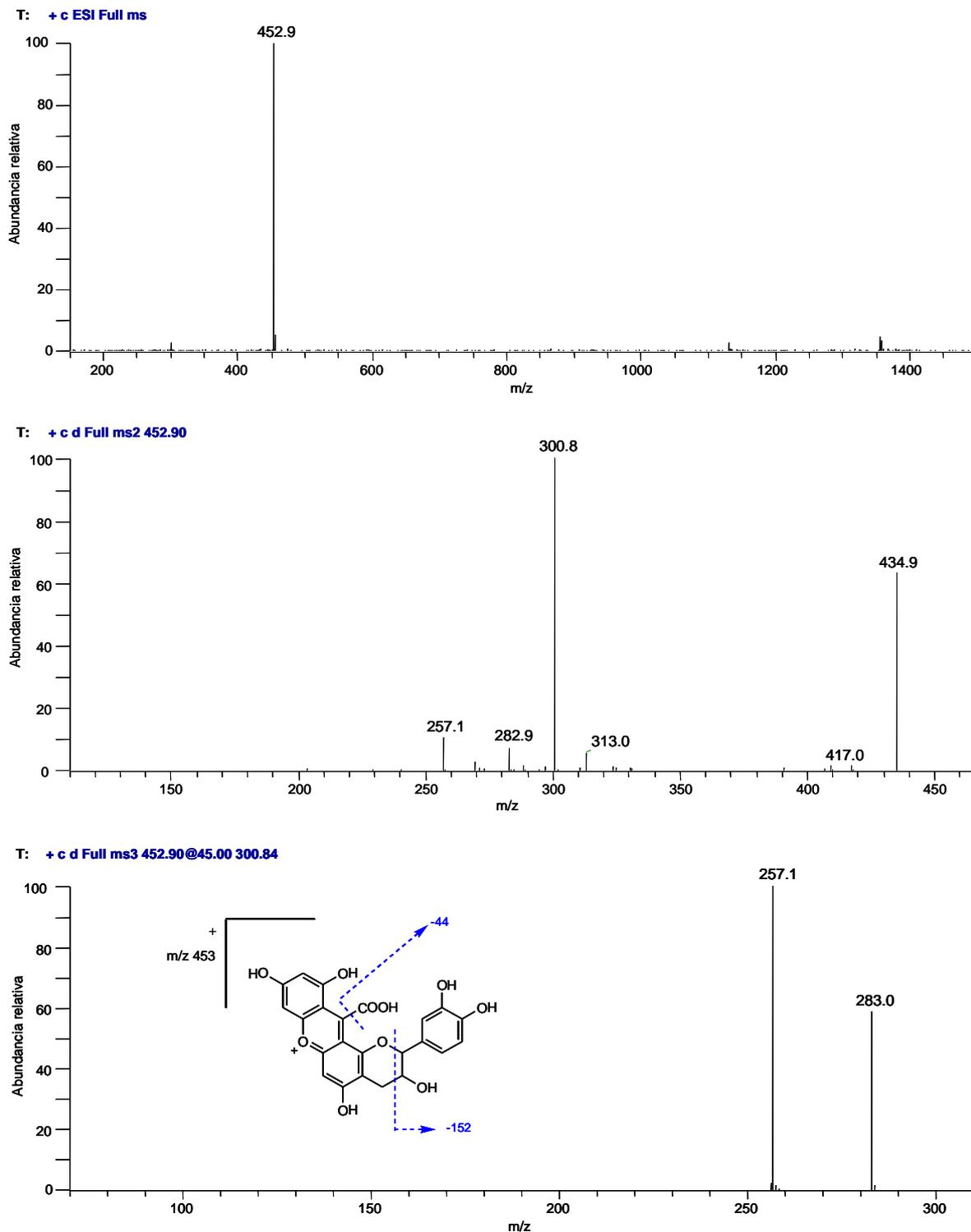


Figura VII.19 – Espectros de masas (ion molecular, MS² y MS³) del producto P3 obtenidos en modo positivo.

La formación de pigmentos de tipo sal de xantilio similares a P3 como resultado de la condensación entre sales de flavilio (antocianos) y estructuras que contienen núcleos floroglucinol (como es el caso de las catequinas), había sido ya recogida por Jurd y Waiss (1965) y Jurd (1969) como uno de los mecanismos para explicar la formación de nuevos pigmentos durante el envejecimiento de vinos tintos.

De acuerdo con esos autores, la reacción de condensación podría tener lugar de manera similar a la anteriormente indicada para la formación del compuesto P6, es decir, el antociano en forma flavilio reaccionaría sobre las posiciones nucleófilas del anillo floroglucinol de la catequina (C6 o, más probablemente, C8) para dar lugar a un intermediario condensado antociano-catequina. Al pH del medio, es de esperar que en este dímero el resto antociano se encuentre parcialmente en forma de base hidratada, en equilibrio con una forma abierta calcona, a partir de la cual se produciría por hidrólisis la pérdida del resto correspondiente al anillo B, en un mecanismo similar al que ocurre en la degradación hidrolítica de antocianos (ver apartado 3.2 y figura VI.4 del Capítulo VI). En algún momento de este proceso se debería producir la separación de la molécula de glucosa; también por similitud con el mecanismo de degradación antociánica, parece lógico suponer que esta pérdida tenga lugar tras la condensación inicial antociano-catequina, como se sugiere en la figura VII.20, lo que favorecería la formación de la calcona y subsecuente separación del anillo B. La pérdida de una molécula de agua daría lugar a un xanteno cuya oxidación posterior conduciría a la formación del catión xantilio (figura VII.20).

La formación de pigmentos xantilio similares a P3, sin intervención de antocianos, fue también encontrada por Fulcrand *et al.* (1997) y Es-Safi *et al.* (2003) como resultado de la condensación entre unidades catequina a través de ácido glioxílico. Basándose en esa reacción, es posible especular otra posible vía para la formación de P3 derivada de la condensación entre catequina y floroglucinol mediada por ácido glioxílico, del modo que se recoge en la figura VII.21.

El floroglucinol podría llegar a formarse en las disoluciones a partir del resto correspondiente al anillo A liberado en la degradación del antociano, como se ha descrito en el capítulo VI. Esta vía, sin embargo, nos parece también poco probable, ya que si hubiese existido una degradación significativa del antociano debería haberse también observado en algún momento la presencia en las disoluciones de otros productos de la misma, como ácido *p*-hidroxibenzoico (derivado del resto correspondiente al anillo B) o 2,4,6-tridroxibenzaldehído (que sería el precursor

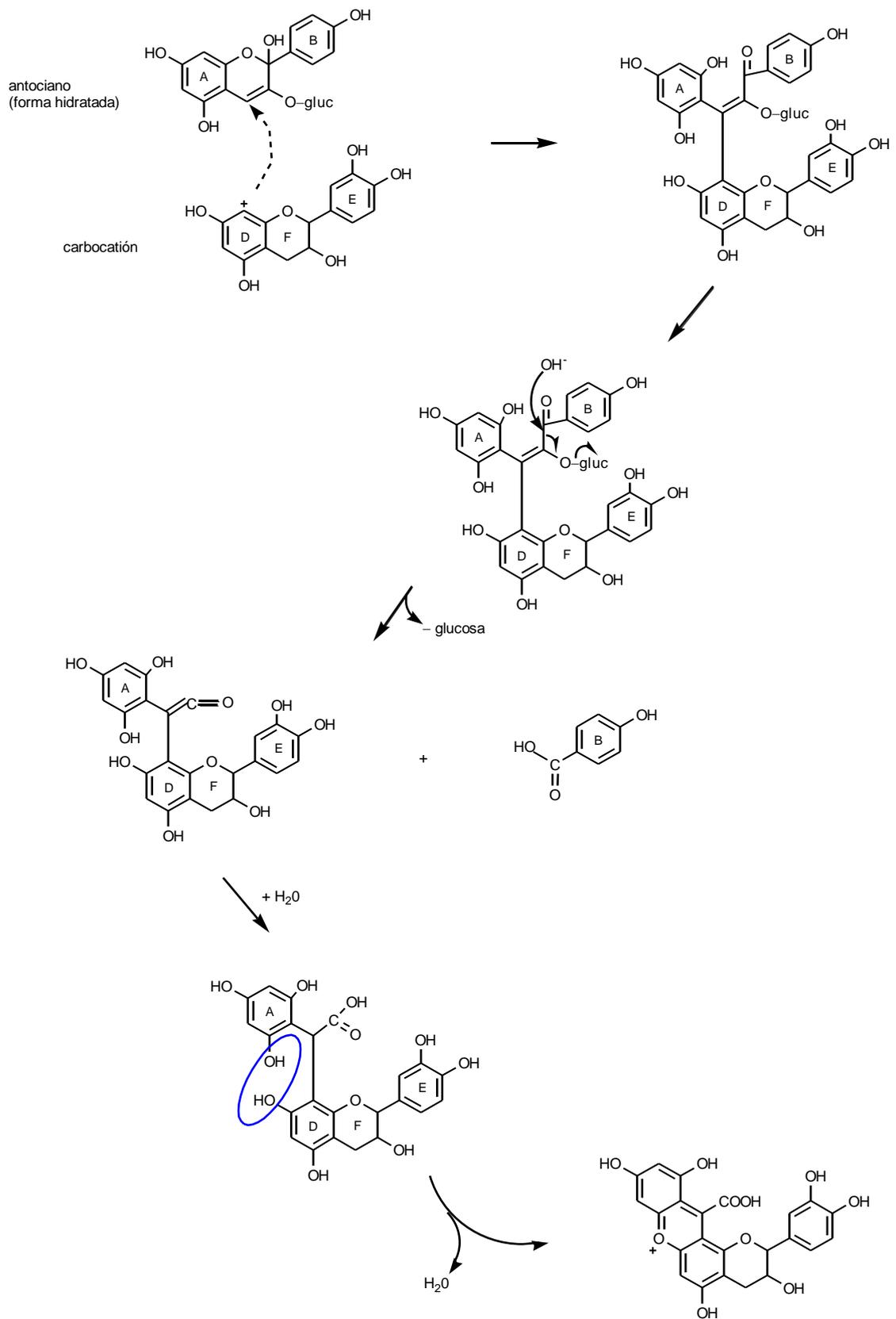
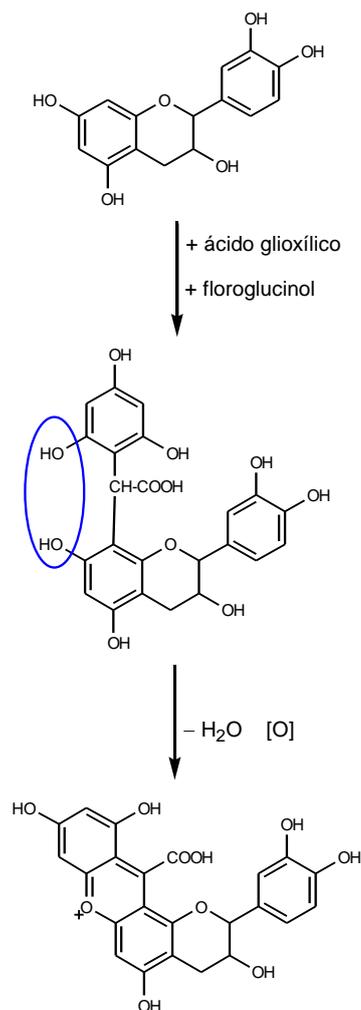


Figura VII.20 – Mecanismo propuesto para la formación del pigmento P3.

Figura VII.21 – Formación de pigmentos xantilio similares a P3 resultantes de la condensación entre unidades catequina a través de ácido glioxílico, basado en lo propuesto por Es-Safi *et al.* (2003).



inmediato del flavoglucinol), circunstancia que no se ha producido. Además, sería también necesario explicar la presencia de ácido glioxílico en el medio. En los estudios de Fulcrand *et al.* (1997) y Es-Safi *et al.* (2003), éste se producía como consecuencia de la oxidación de ácido tartárico, utilizado en la preparación de las disoluciones modelo. En nuestro caso, sólo cabría suponer que pudiera derivar del ácido cítrico y, de hecho, está descrita la formación de ácido glioxílico a partir del mismo, aunque el proceso parece exigir unas condiciones drásticas, que no se dan en nuestras disoluciones. En todo caso, al existir precursores para los mismos, no se puede descartar totalmente la formación en las disoluciones de ciertas cantidades de ácido glioxílico y de flavoglucinol; y, por tanto, tampoco rechazar el mecanismo alternativo de formación de P3 sugerido en la figura VII.21. Por otra parte, como luego se comentará, la presencia de ácido glioxílico en el medio permitiría también proponer un posible mecanismo para la formación de los pigmentos P2 y P4.

La evolución observada en los niveles de Pg 3-gluc (figura VII.3) y de P3 en las disoluciones (figura VII.29) parece apoyar la intervención del antociano (ya sea como

tal o después de su degradación para formar floroglucinol) en el proceso de formación del nuevo pigmento. En la figura VII.29 se puede observar que P3 deja de acumularse una vez que el Pg 3-gluc ha desaparecido del medio (caso de las disoluciones 0,2BC y 1,0BCSinOx), aún cuando en el mismo existe todavía catequina. De hecho, en la disolución 1,0BCSinOx, donde aún hay antociano al final del período de estudio, la acumulación de P3 es continua durante todo el proceso. El hecho de que durante las primeras fases del almacenamiento no se observe formación de P3 (figura VII.29), a pesar de que en ese período se registra una caída acentuada en la concentración del antociano (figura VII.3) sugiere que la formación del pigmento se encuentra en fase de inducción (formación de intermediarios incoloros).

La mayor cantidad de P3 formada en la disolución 1,0BCOx que en la 0,2BC (figura VII.29), resulta lógica por la existencia en la primera de una mayor concentración de catequina, que actúa como precursor del pigmento. La presencia de muy pequeñas cantidades de P3 en la disolución 1,5B, donde no se había añadido catequina, se explicaría a la liberación de este monómero como resultado de la hidrólisis de procianidina B3, como se confirma por la aparición de un pico correspondiente a catequina en los cromatogramas de la disolución 1,5B. Por otra parte, la ausencia de oxígeno en la disolución 1,0BCSinOx justifica que en la misma se acumulen menores niveles de P3 que en 1,0BCOx, al implicar la formación de P3 un proceso oxidativo. Desde este punto de vista, puede parecer contradictorio que este pigmento llegue a formarse en la disolución 1,0BCSinOx, donde existen condiciones anaerobias. Esto podría ser explicado por la actuación como oxidante de la propia forma flavilio del antociano, posibilidad ya apuntada por Jurd y Waiss (1965), al observar que las reacciones de condensación que conducían a la formación de estructuras xantilio se acompañaban de la reducción de ciertas cantidades de catión flavilio. Igualmente, la posible intervención de las formas flavilio de los antocianos como oxidantes en este tipo de reacciones fue también señalada por Somers y Evans (1986), quienes notaron que la oxidación de condensados incoloros para formar pigmentos amarillos podía transcurrir sin el concurso de oxígeno.

Las diferencias en cuanto al potencial oxidativo de las disoluciones 1,0BCSinOx y 1,0BCOx explicarían también las diferencias observadas con relación a los niveles acumulados en cada una de los productos P3 y P6, ya que ambos derivarían de un mismo condensado antociano-catequina, cuya evolución en uno u otro sentido sería dependiente de la distinta capacidad oxidante del medio. De este modo, la mayor tendencia hacia la formación de P3 en 0,2BC y en 1,0BCOx justificaría la práctica

ausencia en las mismas de P6 y, por el contrario, la formación de ciertos niveles de este último en la disolución 1,0BCSinOx explicaría que en la misma se acumulen menores niveles de P3 que en 1,0BCOx.

Picos P8 y P9

Estos dos compuestos poseen idéntico ion molecular (m/z 741) y patrón de fragmentación (tabla VII.2), lo que conduce a suponer que se trata de sustancias isómeras. Su diferencia de masas con relación al pigmento P3 (+288 u.m., correspondiente a una unidad catequina) y el hecho de que se formen preferentemente en las disoluciones 1,0BCOx y 1,5B, hace suponer que se trata de compuestos de estructura similar a P3 pero derivados de procianidina B3 en vez de catequina (figura VII.22). El fragmento principal observado en su espectro MS^2 (m/z 527) correspondería

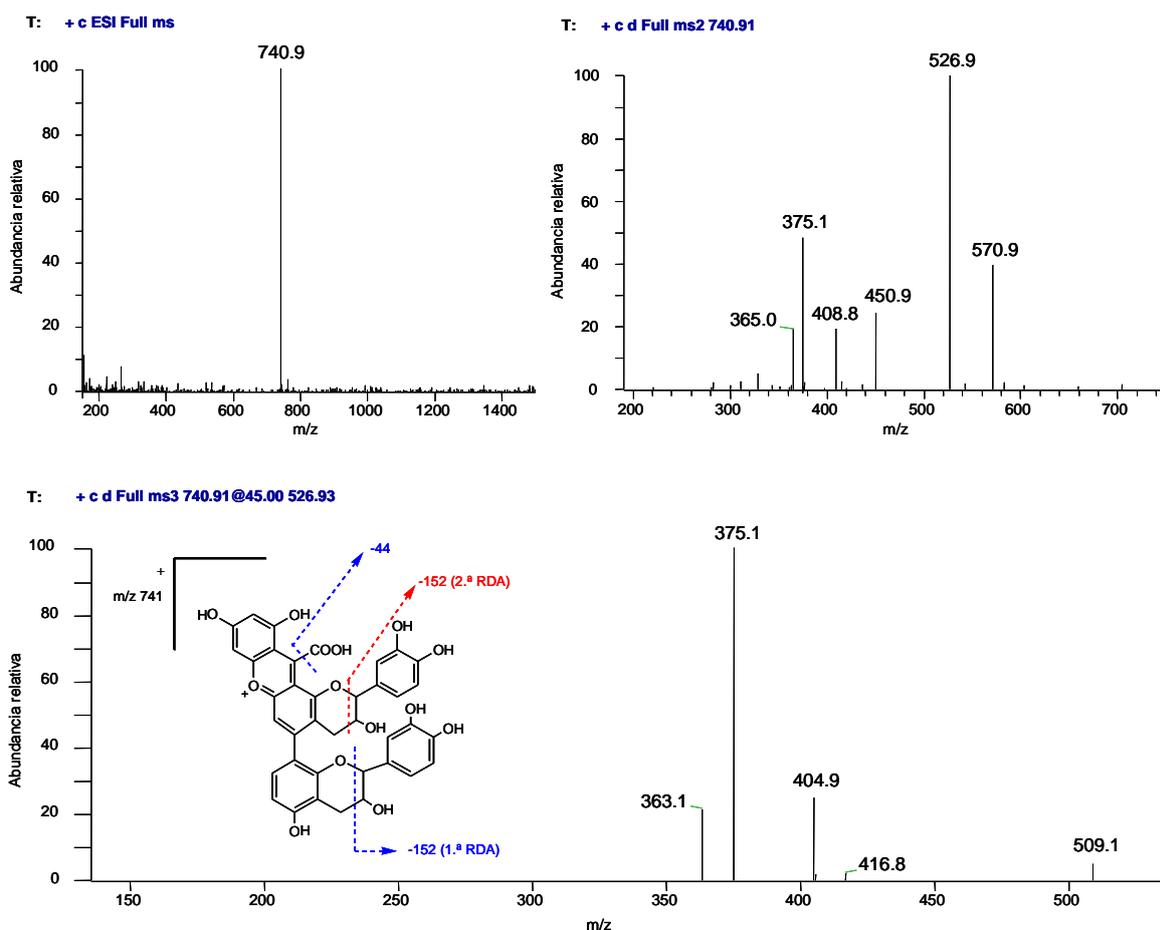


Figura VII.22 – Espectros de masas (ion molecular, MS^2 y MS^3) del producto P8, obtenidos en modo positivo.

a la posible fisión RDA (**1.^a RDA**) de una de las unidades catequina, unido a la pérdida del resto $-\text{COOH}$ y de una molécula de agua $[\text{M}+\text{H}-152-44-18]^+$. La posterior fisión RDA (**2.^a RDA**) de la restante unidad de catequina sería la responsable de la formación del principal fragmento MS^3 (m/z 375).

Queda por establecer la naturaleza concreta de cada uno de los isómeros P8 y P9, aunque se puede especular que la misma debería residir en alguno de los diversos centros de asimetría existentes en la unidad flavanol, es decir, las posiciones C2 y C3 de cada uno de los restos catequina y C4 del enlace interflavánico. Una alternativa podría ser la epimerización de una de las subunidades catequina de la procianidina para formar epicatequina. La epimerización de (+)-catequina a (+)-epicatequina se produce tanto en disoluciones acuosas en caliente como en medios básicos (Kiatgrajai *et al.*, 1982), alcanzándose un equilibrio entre los epímeros aproximadamente a las dos horas de reacción. Si bien nuestras condiciones de temperatura y pH no son las óptimas para que se produzca la epimerización, no podemos descartar que la misma tenga lugar.

Pico P2

La catequina interviene claramente en la formación de este pigmento, ya que éste no se forma en la disolución 1,5B, donde no había sido añadida. La presencia de al menos un núcleo catequina en la estructura de P2 se confirma, además, por la observación de un fragmento derivado de su fisión RDA (-152 u.m.) en el espectro MS^3 (m/z 435 \rightarrow m/z 283). Teniendo en cuenta la similitud de su espectro de absorción con el de P3 (figura VII.17), se puede especular que posee también una estructura de tipo xantilio, aunque su máximo de absorción en el visible se encuentra localizado a una λ más baja (425 nm en P2 frente a 436 nm en P3). En la figura VII.23 se muestran dos posibilidades estructurales que encajan con el ion molecular encontrado para este pigmento (m/z 573). Posibles vías para la formación de estas estructuras, basadas en los mecanismos de reacción recogidos por Es-Safi *et al.* (2003) y que implican la participación de ácido glioxílico, se discuten a continuación y se esquematizan en la figura VII.24.

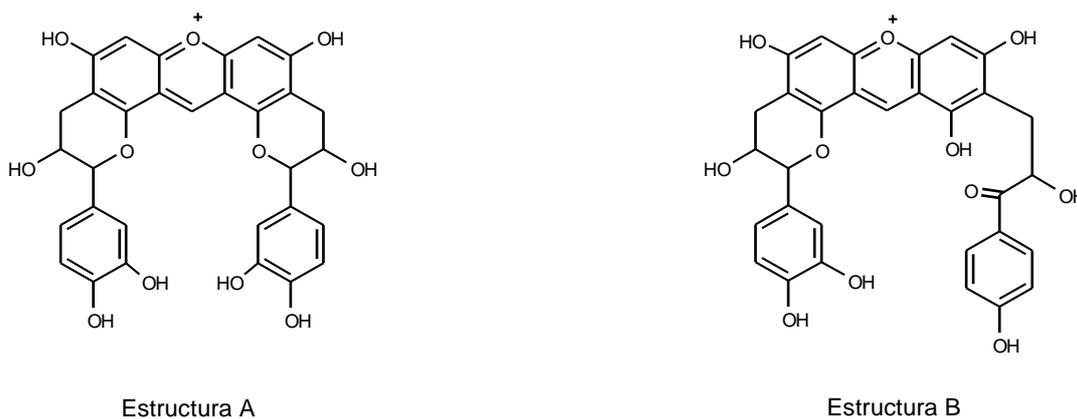


Figura VII.23 – Estructuras propuestas para el compuesto P2.

La estructura A derivaría de la reacción entre catequina y ácido glioxílico sin intervención del antociano, existiendo para ellos dos posibilidades:

- 1 - Condensación entre dos unidades catequina a través de ácido glioxílico, por un mecanismo similar a los procesos de condensación mediados por acetaldehído. Se formaría, así, un intermediario incoloro **I** (figura VII.24), que por posterior deshidratación y oxidación produciría el compuesto **II**. La viabilidad del mecanismo hasta este punto ha sido confirmada por el grupo de Cheynier, que ha identificado los productos **I** (Fulcrand *et al.*, 1997) y **II** (Es-Safi *et al.*, 1999c) en ensayos realizados en sistemas modelo de catequina + ácido glioxílico. Según nuestra propuesta, en esta alternativa, el pigmento P2 resultaría de la descarboxilación del producto **II**.

Se debe indicar que en nuestras disoluciones no hemos llegado a detectar la formación de ninguno de los productos intermedios y creemos que, de ser éste el mecanismo de formación de P2, debería haberse observado al menos la presencia del compuesto **II**, que corresponde a un pigmento estable (Es-Safi *et al.*, 1999).

- 2 - Aducción de ácido glioxílico sobre la posición C8 (o C6) de catequina para formar el producto **III**, que reaccionaría con una segunda unidad catequina, dando lugar al intermediario **IV**, que tras dos deshidrataciones sucesivas llevaría a la formación de P2. La formación del intermediario **III** ha sido establecida anteriormente por Es-Safi *et al.* (2000b) en estudios en sistemas modelo, pero no existen evidencias en la literatura que apoyen los pasos posteriores.

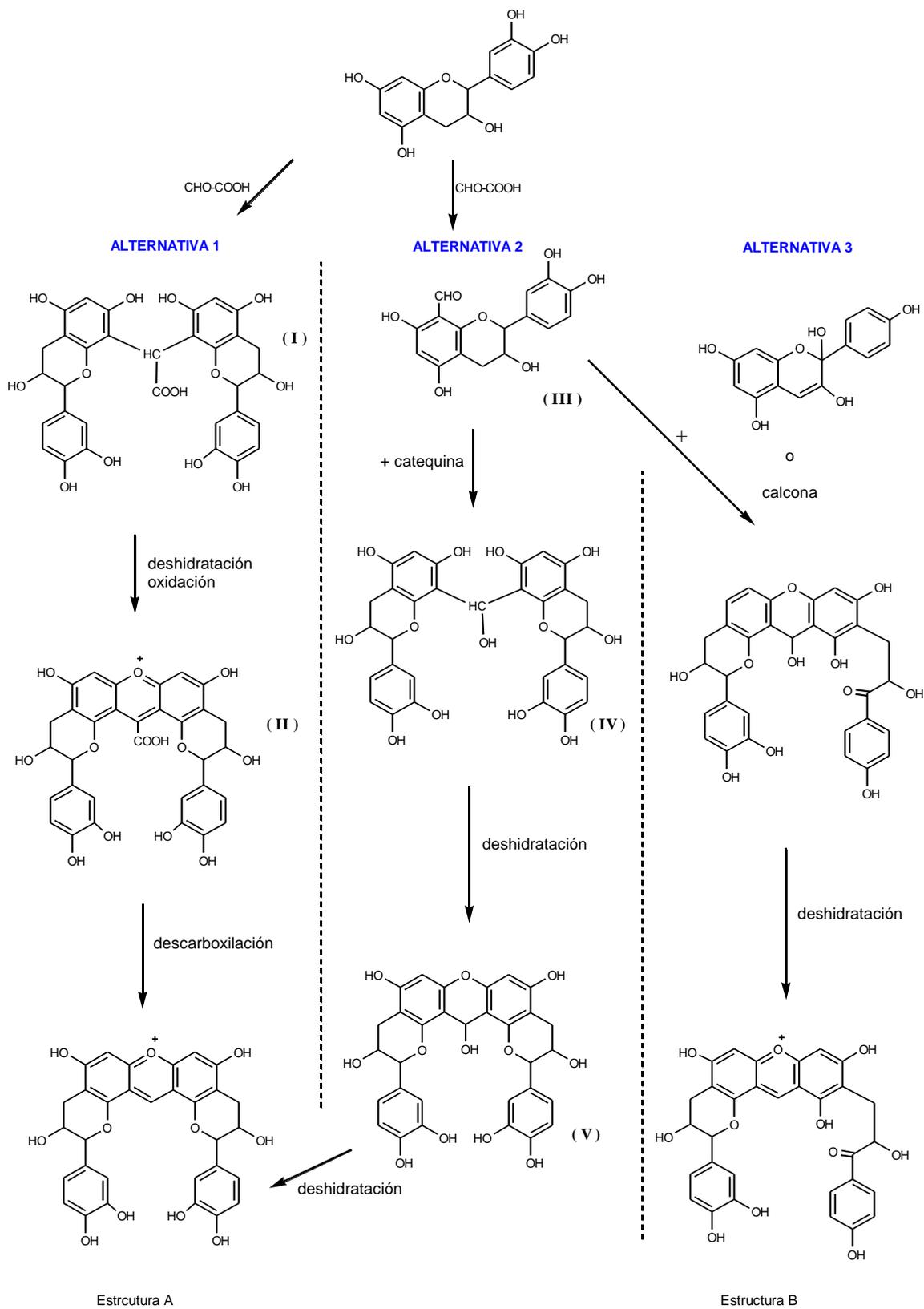


Figura VII.24 – Vías hipotéticas para la formación de las estructuras A y B sugeridas para el pigmento P2, que implican la participación de ácido glioxílico.

La estructura B podría derivar de la reacción de condensación mediada por ácido glioxílico entre catequina y pelargonidina (en forma hidratada o calcona), con el producto **III** como intermediario. En la estructura final de P2, el resto correspondiente al antociano debería encontrarse en forma calcona, por lo que si es la forma hidratada pelargonidina la implicada en la reacción, la apertura del heterociclo se produciría después de la reacción de condensación. El pigmento P2 carece de resto de glucosa, que al igual que en el caso de la formación de P3, podría producirse de forma anterior o posterior a la condensación con catequina.

El principal argumento a favor de la estructura B con relación a la A es que parece explicar mejor el patrón de fragmentación observado en el espectro MS² (figura VII.25). Así, los fragmentos MS² de m/z 453 y m/z 435 podrían corresponder a la separación de un resto fenilcarbonilo (anillo B de Pg + CO, -120 u.m.) y la pérdida adicional de agua (-138 u.m.), respectivamente. Este esquema de fragmentación resulta difícil de justificar en el caso de la estructura A. Por otra parte, la evolución de P2 en las disoluciones (figura VII.28), cuya acumulación deja de producirse una vez que ya no existe antociano en las mismas, aún cuando todavía existen cantidades remanentes de catequina, también parece apoyar la participación del antociano en su formación y, por tanto, la opción por la estructura B.

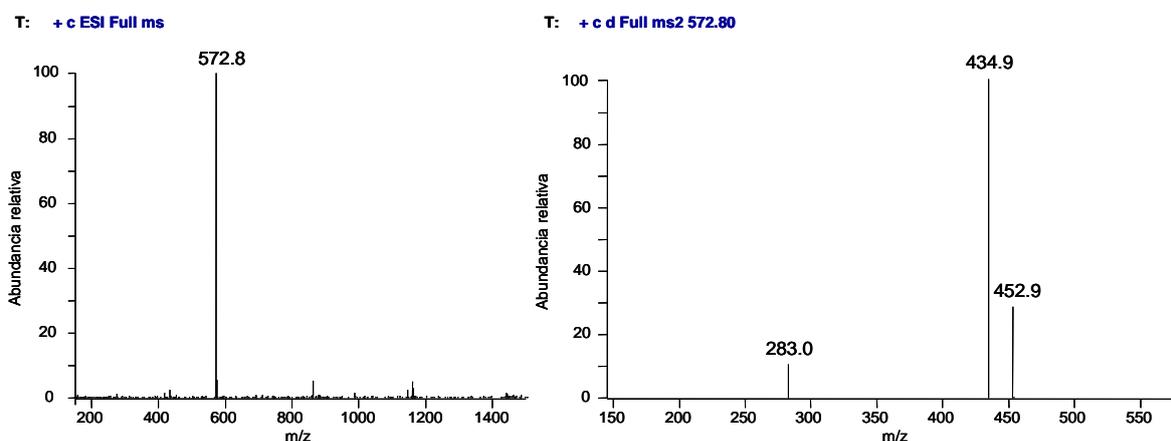


Figura VII.25 – Espectro de masas del compuesto P2 y patrón de fragmentación MS².

En cualquiera de las tres alternativas sugeridas para la formación de P2 sería necesario explicar el origen del ácido glioxílico en las disoluciones, para la cual sólo cabe suponer que pueda derivar del ácido cítrico presente en las mismas. Por tanto, a falta de otras propuestas satisfactorias para explicar la estructura del pigmento P2, se asume tentativamente la posibilidad de que en el medio pudiera formarse ácido

glioxílico, aún cuando su producción a partir del ácido cítrico parezca requerir condiciones de reacción más exigentes que las existentes en nuestros ensayos.

Pico P4

Con relación a este pigmento, el hecho de que la diferencia entre su masa y la de P2 corresponda a una unidad catequina sugiere que se trata de un compuesto de estructura similar, aunque derivado de procianidina B3. Para confirmar de esta suposición están, además, su formación en la disolución 1,5B, su patrón de fragmentación similar a P2 y su $\lambda_{\text{máx}}$ en el visible (434 nm), desplazada batocrómicamente con relación a P2 (425 nm), al igual que ocurría en el caso de P8 y P9 (446 nm) con respecto a P3 (436 nm). La formación de P4 en la disolución 1,5B quizás podría también ir en apoyo de la implicación del antociano en su estructura, ya que hay que tener en cuenta que asumir para P4 una estructura similar a la estructura A de las propuestas para P2, implicaría que en su formación participe la catequina (además de procianidina B3), la cual no se había añadido en las disoluciones y, por tanto, sólo se encuentra en el medio en cantidades menores, como resultado de la hidrólisis de la procianidina.

En la tabla VII.2 se realiza un resumen de las características (longitud de onda de máxima absorción, ion molecular y patrón de fragmentación) de los principales picos cuya formación fue observada en las distintas disoluciones [antociano + flavanoles], junto a una breve descripción de su posible identidad, de acuerdo a la discusión realizada en los párrafos anteriores.

Además de los pigmentos principales ya comentados (P2, P3, P4, P8 y P9), en las disoluciones se aprecia la aparición de otros pigmentos aparentemente menos importantes cuantitativamente, que presentan $\lambda_{\text{máx}}$ en el intervalo 330-460 nm y que aparecen fundamentalmente como picos menores en la parte posterior de los cromatogramas, como se puede observar en la figura VII.18. Al igual que en las disoluciones que solo contenían antociano, discutidas en el capítulo anterior, la mayoría de estos pequeños picos no se detectan de modo constante a lo largo del tiempo, indicando que se trata de sustancias de naturaleza transiente, en previsible evolución hacia pigmentos polímeros que acabarían por precipitar.

Tabla VII.2 – Longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx.}}$), ion molecular y fragmentos MS^2 y MS^3 de los principales compuestos de nueva formación observados en las distintas disoluciones de Pg 3-gluc y flavanoles ensayadas.

Producto	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	Ion molecular (m/z)	Fragmentación (m/z) $\text{MS}^2 \rightarrow \text{MS}^3$	Identidad posible
P1	292	257	257 → 257; 201; 209	Corresponde al pico b en las disoluciones GOx y GsinOx
P2	267, 425	572.8	434.9 → 283.0 452.8	Pigmento de tipo xantilio derivado de la condensación de catequina mediada por ácido glioxílico
P3	273, 436	452.9	300.8 → 257.1; 283.0 434.9 257.1	Pigmento con estructura sal de xantilio derivado de la condensación entre Pg y catequina
P4	271, 434	860.9	722.8 → 552.9; 570.7; 418.8 740.9 571	Pigmento similar a P2, pero que implica también procianidina B3 en su formación
P5	281	577	425 → 407; 299 409 559	Producto de la condensación directa entre un carbocatión flavanólico y Pg
P6	275	723	571 561 628	Producto de condensación directa antociano-catequina con enlace de tipo A
P7	274	577	425 → 407; 299 409 559	Producto isómero de P5
P8	276, 447	741	527 → 375; 363; 405 375	Pigmento con estructura sal de xantilio derivado de la condensación entre Pg y B3
P9	276, 446	741	527 → 375; 405; 363	Pigmento isómero de P8

3.1.3 – CAMBIOS EN EL COLOR

Las cuatro disoluciones antociano/flavanol ensayadas experimentan un cambio de color progresivo a lo largo del tiempo, desde el rojo original hacia un pardo anaranjado, más o menor oscuro y de aspecto algo turbio. Al igual que ocurría en las disoluciones que sólo contenían antociano (ver capítulo anterior) también se apreciaba la presencia de partículas dispersas en el seno de las disoluciones y la acumulación de cierto precipitado pardo en los viales. Como se hizo referencia en el Capítulo VI, apartado 3.2.1, estos fenómenos han sido ya observados por diversos autores en zumos y en disoluciones modelo que contenían antocianos.

Las modificaciones visuales más importantes en el color se producían en las disoluciones 0,2BC y 1,0BCOx entre la segunda y la cuarta semana del almacenamiento, como queda reflejado en sus espectros de absorción, que experimentan un profundo cambio en su forma, experimentando una fuerte caída de la absorbancia en la región de 500 nm, acompañado de un aumento en la zona de los 440 nm, que provoca un desplazamiento hipsocrómico en los máximos de absorbancia en el visible (figura VII.26) y se traduce en un pardeamiento de las disoluciones. Cambios similares se observan también en las disoluciones 1,0BCSinOx y 1,5B, aunque de manera más lenta, especialmente en el caso de la disolución 1,0BCSinOx, protegida del oxígeno.

El cambio en el color de las disoluciones debe atribuirse a la desaparición progresiva del antociano (responsable de la pérdida del color rojo) y la formación de nuevos pigmentos de tonalidad pardo amarillenta. En la figura VII.27 se recoge la evolución del Índice de Pardeamiento en las distintas disoluciones. Se puede observar que hay una primera fase de unas dos semanas, en la que prácticamente no existe pardeamiento y las disoluciones continúan presentando una tonalidad roja, a pesar de que durante ese período se registra una caída acentuada en la concentración del antociano (figura VII.3). En esta etapa no se observa una producción destacada de pigmentos de nueva formación, ya sean mayoritarios (figura VII.28) o minoritarios, los cuales se encuentran posiblemente en fase de inducción, en forma de precursores incoloros.

A partir de la segunda semana de almacenamiento se inicia un incremento en el IP en las disoluciones mantenidas sin exclusión de oxígeno. Este aumento es más rápido en las disoluciones 0,2BC y 1,0BCOx que en 1,5B y coincide con la acumulación en las primeras de los pigmentos P2 y P3, poniendo de manifiesto su influencia sobre

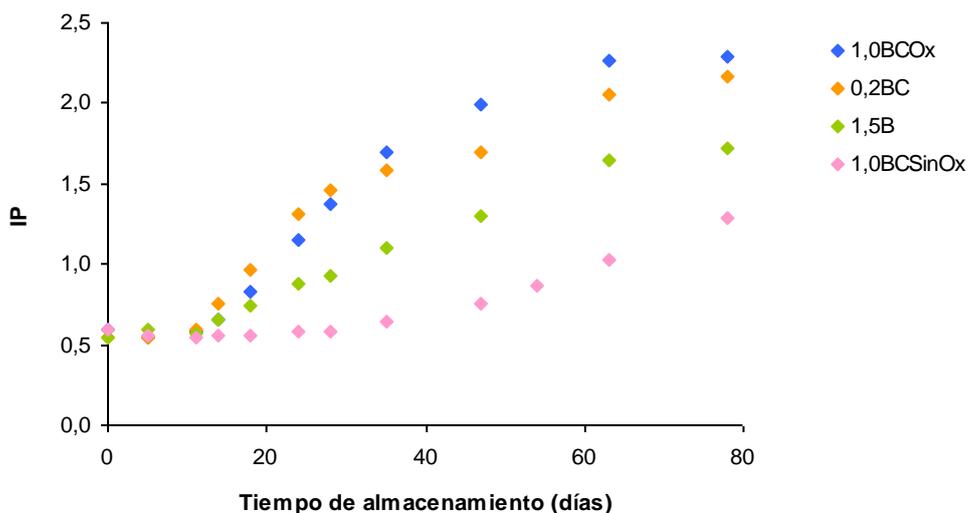


Figura VII.27 – Evolución del Índice de Pardeamiento vs. tiempo en las disoluciones de [Pg 3-gluc + C y/o B3].

el color de las preparaciones. A partir de aproximadamente 40 días, en que ya no se produce acumulación de P2 y P3 en 0,2BC y 1,0BCOx, el aumento en el IP se produce en las mismas ya de forma más lenta. En la disolución 1,0BCSinOx la evolución del IP tiene lugar de forma más contenida, también coincidiendo con la más lenta acumulación de P2 y P3 en la misma, posiblemente como consecuencia aún de la presencia de ciertos niveles antociano hasta el final del período de estudio (figura VII.3), que continuaría aportando color rojo y actuaría como precursor de esos pigmentos de nueva formación.

Los resultados obtenidos en estos ensayos ponen nuevamente de manifiesto la importancia de la exclusión del oxígeno para la evolución del color y la estabilidad del antociano. A las concentraciones ensayadas, similares a las que se podrían encontrar en la fresa y sus productos derivados, los flavanoles no muestran un efecto protector sobre el antociano, el cual se pierde incluso con mayor rapidez que cuando se encuentra solo en disolución (figura VII.3), e inducen asimismo un pardeamiento acelerado, tanto en presencia [comparar en la figura VII.29(a) la evolución del IP en 0,2BC, 1,0BCOx y 1,5B con GOx] como en ausencia de oxígeno [comparar en la figura VII.29(b) la evolución del IP en 1,0BCSinOx con GSinOx]. En las condiciones utilizadas en este estudio, las interacciones antociano-flavanol se muestran, por tanto, como un elemento desestabilizador de los antocianos, al contrario de lo que inicialmente se podía suponer.

No obstante, un aspecto que parece desprenderse de los ensayos realizados es que el aumento en la concentración de flavanoles produce una muy ligera mejora en la estabilidad del antociano y en el color de las disoluciones, como se sugiere al comparar las evoluciones en el contenido de Pg 3-gluc (figura VII.3), espectro de absorción (figura VII.26) e IP (figura VII.27) experimentadas en las preparaciones 0,2BC y 1,0BCOx. Queda, por tanto, por establecer qué es lo que podría ocurrir si se utilizaran

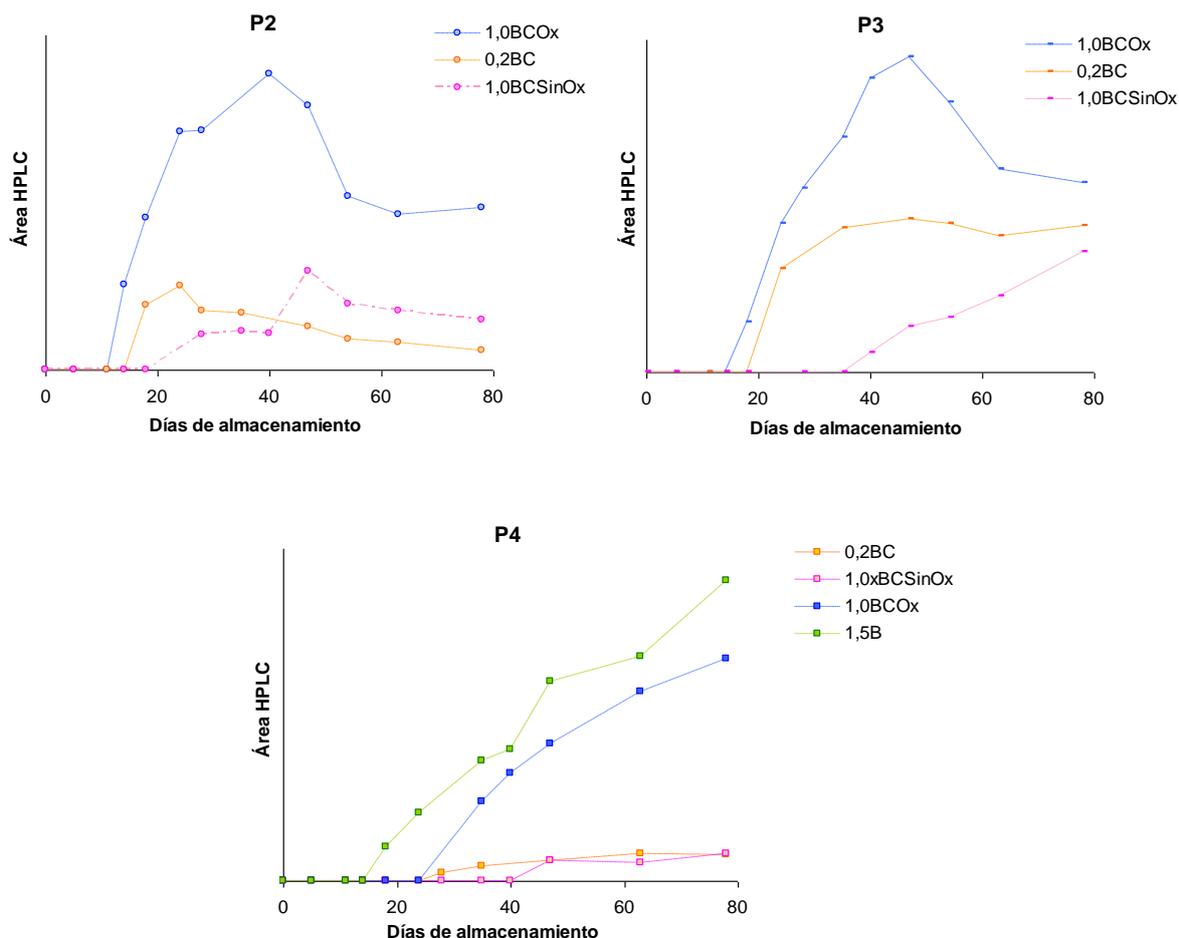


Figura VII.28 – Evolución de las áreas cromatográficas (HPLC) de los picos de los principales compuestos coloreados - P2, P3 y P4 - formados en las disoluciones.

concentraciones de flavanoles superiores a las empleadas en estos ensayos, para evaluar la existencia de un posible efecto protector asociado al aumento de las mismas. Teóricamente, es de esperar que concentraciones de flavanoles superiores sean capaces de producir efectos de copigmentación sobre el antociano, protegiéndolo así frente a las reacciones que conducen a su degradación. En nuestro estudio, este posible efecto de copigmentación no llega a observarse en ninguna de las disoluciones,

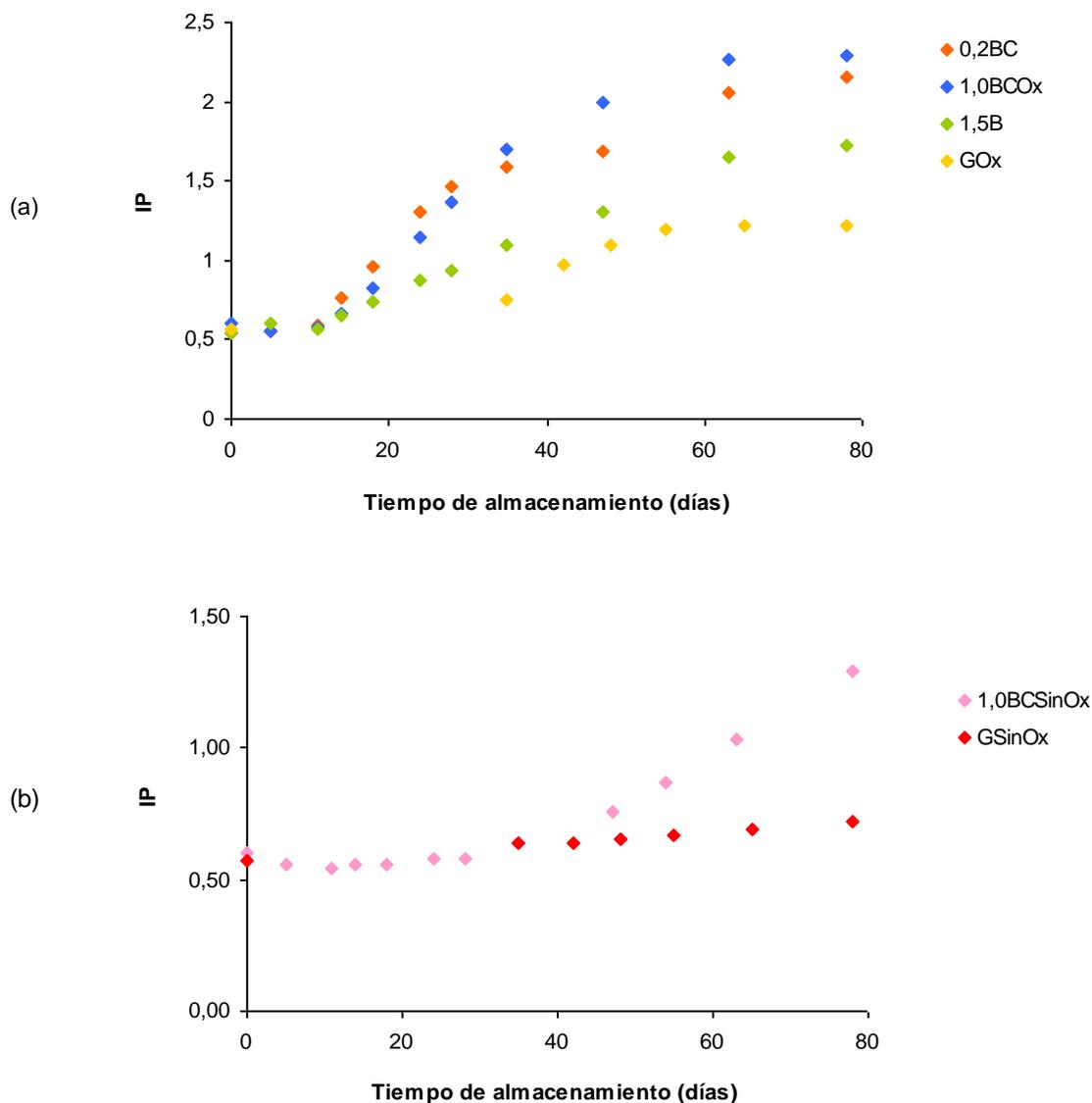


Figura VII.29 – Evolución del Índice de Pardeamiento vs. tiempo en las disoluciones de Pg 3-gluc y [Pg 3-gluc+ C y/o B3].en presencia de oxígeno (a) y en ausencia de oxígeno (b).

ya que su espectro de absorción no experimenta ninguna modificación significativa, cualitativa ni cuantitativa, en la región del visible con relación a lo observado en disoluciones equivalentes que contenían sólo antociano. Hay que tener en cuenta que las proporciones flavanol:antociano utilizadas en estos ensayos (equivalentes a las existentes en la fresa e inferiores a 1:1 en términos molares) eran muy bajas e insuficientes para inducir un efecto significativo de copigmentación, como ya se ha comentado en el apartado 3.1.1. En estudios anteriores (Francia-Aricha *et al.*, 1998), se había visto que en disoluciones de antocianos y flavanoles de pH 3,2, la copigmentación era sólo apreciable en forma de modificaciones espectrales (aumento de la absorbancia en la región del visible y ligero desplazamiento batocrómico en el

máximo de absorción) a partir de relaciones molares flavanol:antociano de 5:1. En este sentido, hay que tener en cuenta que tanto catequina como procianidina B3 son pobres copigmentos de antocianos y que incluso para relaciones molares flavanol:antociano del orden de 30-50:1 (Escribano-Bailón *et al.*, 1999; Malien-Aubert *et al.*, 2002) las modificaciones inducidas en el espectro de absorción no son tan acusadas como las producidas por otros copigmentos, como determinados ésteres hidroxicinámicos o flavonoles (Brouillard *et al.*, 1991).

Otro aspecto que parece deducirse de los ensayos realizados, es que el efecto desestabilizador de los flavanoles sobre el antociano y el color es aparentemente más acusado con catequina que con procianidina B3, como podría inferirse al comparar las evoluciones de antociano (figura VII.3), espectro de absorción (figura VII.26) e IP (figura VII.27) en las disoluciones 0,2BC y 1,0BCOx con los observados en la disolución 1,5B, en la cual los cambios se producen de manera más lenta. Una posible conclusión práctica de esta observación sería que la utilización de materias primas con menor contenido en catequina podría conducir a productos de color más estable.

A pesar de que la pérdida de antociano y las transformaciones de color se desarrollen con mayor rapidez en presencia de flavanoles que en su ausencia, en las condiciones de ensayo utilizadas, hay que tener en cuenta que los tipos de procesos que se producen en cada caso son diferentes. Mientras que en ausencia de flavanoles, el antociano experimenta en gran medida procesos de degradación hacia productos incoloros, en su presencia esas reacciones parecen estar muy limitadas y predominan las reacciones de condensación entre flavanoles y/o antociano, que conducen a la formación de nuevos pigmentos, de tonalidades pardo-amarillentas (y, por tanto, indeseables en productos derivados de la fresa). De este modo, la evolución del color era distinta en cada caso, ya que la apreciación visual del mismo revelaba menor densidad de color y tonalidad más parda en presencia de flavanoles a las concentraciones estudiadas.

4 – CONCLUSIONES

1. En las condiciones de ensayo utilizadas y para concentraciones similares a las que se pueden encontrar en la fresa, la presencia de flavanoles (catequina y/o procianidina B3) conduce a una desaparición más rápida de Pg 3-gluc y a un pardeamiento acelerado en las disoluciones, con relación a lo que se observa cuando el antociano se encuentra solo. Este efecto desestabilizador de los flavanoles sobre el antociano y el color parece más acusado en presencia de catequina que de procianidina B3.
2. En las disoluciones ensayadas, con relaciones molares flavanol:antociano equivalentes a las existentes en la fresa e inferiores a 1:1, no llega a observarse un efecto de copigmentación, lo que resulta lógico teniendo en cuenta que las concentraciones de flavanoles eran muy bajas y tanto catequina como procianidina B3 se comportan como pobres copigmentos de antocianos. La ausencia de copigmentación puede ser una de las razones para que en las mismas no se produzca un efecto de protección del antociano por parte de los flavanoles.
3. En presencia de flavanoles, la pérdida de antociano de las disoluciones tiene lugar por mecanismos diferentes a los observados en su ausencia. Cuando no existen flavanoles, el antociano desaparece en gran medida por degradación hacia productos incoloros; la presencia de flavanoles en las disoluciones limita este proceso, posiblemente por actuar como captadores preferenciales del oxígeno, protegiendo así al antociano de la degradación oxidativa, a la vez que induce la existencia de procesos de condensación, que conducen, entre otros, a la formación de nuevos pigmentos de tonalidades pardo-amarillentas. Este último tipo de reacciones se encuentran limitadas, aunque no impedidas, en ausencia de oxígeno, factor que sigue mostrándose como el más influyente, entre los ensayados, sobre la estabilidad del antociano y los cambios de color.
4. En las disoluciones [antociano + flavanoles] estudiadas se detectó la formación de nueve productos mayoritarios de los cuales cinco correspondían a compuestos coloreados con máximo de absorbancia en la región del visible entre 425 y 450 nm. Además de estos pigmentos principales, se observaba la formación de otros pigmentos menos importantes cuantitativamente, con

máximos de absorbancia en el intervalo 330-460 nm, atribuidos a productos de naturaleza transiente en evolución hacia polímeros que acaban por precipitar.

5. Entre los nuevos compuestos incoloros mayoritarios formados, uno (P1) correspondía a un producto de la transformación no oxidativa del antociano, cuya formación también se observaba en ausencia de flavanoles. Los otros tres eran sustancias derivadas de la condensación del antociano con catequina (P6) o con un carbocatión liberado tras la hidrólisis de procianidina B3 (P5 y P7).

6. Para tres de los nuevos pigmentos mayoritarios se propone una estructura de tipo sal de xantilio, que podría derivar de la condensación directa entre Pg 3-gluc con catequina (P3) o procianidina B3 (P8 y P9). No se ha podido identificar los otros dos pigmentos principales (P2 y P4), aunque los mismos parecen también corresponder a compuestos de tipo xantilio derivados de la condensación flavanol-antociano.

VIII

Ensayos de Intervención en Mermelada de Fresa

1 – Introducción

2 – Metodología

2.1 – Material vegetal

2.2 – Ensayo modelo con pelargonidina-3-rutinósido

2.3 – Elaboración de las mermeladas

2.3.1 – Mermelada de referencia

2.3.2 – Mermeladas con incorporación de ácido pirúvico o de acetaldehído

2.4 – Análisis de pigmentos

2.4.1 – Extracción de las mermeladas

2.4.2 – Análisis por HPLC-DAD y HPLC-MS

2.5 – Análisis de color en las mermeladas

3 – Resultados y Discusión

3.1 – Evolución de antocianos y formación de nuevos pigmentos

3.1.1 – Mermelada de referencia (*MA*)

3.1.2 – Mermelada con incorporación de ácido pirúvico (*MB*)

3.1.3 – Mermelada con incorporación de acetaldehído (*MC*)

3.2 – Evolución del color de las mermeladas

4 – Conclusiones

1 – INTRODUCCIÓN

El interés por impedir o retrasar el deterioro del color de los alimentos reside no sólo en aspectos de orden estético, sino también comercial, pues un alimento cuya apariencia no corresponda a lo que el consumidor espera será rechazado, con el consiguiente perjuicio económico.

La estabilidad del color en mermeladas de fresa representa un problema complejo, que todavía no se encuentra bien resuelto ni científica ni tecnológicamente. Durante el procesado y almacenamiento de las mermeladas se produce la degradación del color rojo original y la aparición de tonalidades más pardas. Como ya se ha indicado en capítulos anteriores, la razón principal de esta modificación reside en la reactividad e inestabilidad intrínseca de los antocianos.

Experiencias llevadas a cabo en sistemas modelo pusieron de manifiesto distintos procesos con influencia sobre el color en medios que contienen antocianos y/o otros compuestos fenólicos. Entre éstas, se encuentran las reacciones de degradación de antocianos (Furtado *et al.*, 1993; Piffaut *et al.*, 1994), el pardeamiento de flavanoles (Francia-Aricha *et al.*, 1998; Guyot *et al.*, 1995) y las reacciones de condensación fenólica, ya sean directas (Jurd, 1967; Santos Buelga *et al.*, 1995 ; Escribano Bailón *et al.*, 1996 Escribano Bailón *et al.*, 2001 y Bridle, 1976) o con intervención del acetaldehído (Bakker *et al.*, 1993; Francia-Aricha *et al.*, 1997; Rivas Gonzalo *et al.*, 1995; Saucier *et al.*, 1997; Timberlake y Bridle, 1976) o de otros productos de baja masa molecular (Bakker *et al.*, 1997; Fulcrand *et al.*, 1996, 1997).

Algunos intentos encaminados a hacer a los antocianos más estables pasan por la modificación de la molécula, mediante reacciones de condensación o copolimerización con otros compuestos presentes en el medio. Hasta el momento, este tipo de reacciones se han utilizado para explicar los cambios de color que se producen en productos naturales, como el vino, pero no han sido todavía aprovechados como colorantes potenciales en formulaciones. De confirmarse la estabilidad de algunos de los pigmentos que se forman en estos procesos, se estaría ante una familia de compuestos con posibilidad de utilización como colorantes alimentarios, que constituirían una alternativa a los antocianos naturales. Esto es particularmente interesante en aquellos alimentos derivados de frutas cuyo color es responsabilidad de los antocianos, como es el caso de la mermelada de fresa.

El objetivo de esta parte del trabajo era intentar influir sobre el color de la mermelada de fresa, en el sentido de estabilizar las tonalidades rojas durante períodos de almacenamiento más prolongados. Para ello, se elaboraron mermeladas de fresa incorporando ácido pirúvico o acetaldehído, con el propósito de intentar dirigir las transformaciones de los antocianos hacia la formación de pigmentos más estables. Las mermeladas obtenidas fueron almacenadas a 25°C y se realizó un seguimiento de la materia colorante y de índices y parámetros del color durante tres meses. Los resultados obtenidos, se compararon con los proporcionados por una mermelada de fresa elaborada de forma convencional. En paralelo, se desarrolló un ensayo con una disolución modelo que contenía Pg 3-rut y ácido pirúvico, a fin de monitorizar en un medio más sencillo el proceso que se suponía que estaba ocurriendo en las mermeladas de nueva formulación. No se realizó un ensayo similar utilizando acetaldehído, ya que se disponía de amplia información previa acerca de las reacciones de condensación antociánica inducidas por este compuesto (Rivas-Gonzalo *et al.*, 1995; Escribano Bailón *et al.*, 1996; Francia-Aricha *et al.*, 1997).

2 – METODOLOGIA

2.1 – MATERIAL VEGETAL

Para la elaboración de mermeladas se partió de fresas de la variedad *Camarosa*, procedentes de Huelva (España), recogidas en óptimas condiciones de madurez, desrabadas y congeladas. Las fresas fueron suministradas por *Dulces y Conservas Helios* y eran las mismas que se utilizaban para procesado en esa empresa.

2.2 – ENSAYO MODELO CON PELARGONIDINA-3-RUTINÓSIDO

Con el objeto de monitorizar la reacción entre Pg 3-rut y ácido pirúvico, para poder interpretar mejor el comportamiento observado en las mermeladas elaboradas con incorporación de este ácido, se preparó una disolución modelo de Pg 3-rut de concentración $1,8 \times 10^{-3}$ M, en tampón citrato 0,1 M a pH 3,5, a la que se añadió ácido pirúvico en proporción molar antociano:ácido pirúvico 1:100. La disolución se almacenó en un vial de vidrio cerrado con un *septum* de goma y en oscuridad, en cámara termostaticada a 25°C durante 40 días, a lo largo de los cuales se realizaron análisis periódicos por HPLC.

El Pg 3-rut utilizado para estos ensayos fue aislado a partir de un extracto de antocianos de fresa obtenido del modo que se describe en el Capítulo IV, apartado 2.2.1. Para su aislamiento se utilizó la primera fracción (fracción A) resultante del fraccionamiento del extracto bruto por cromatografía en columna, por ser la más rica en el antociano. Esta fracción fue concentrada y sometida a cromatografía líquida de alta eficacia a escala semipreparativa, utilizando las mismas condiciones de separación e igual procedimiento posterior que para el aislamiento de Pg 3-gluc (Capítulo VI, apartado 2.1). La pureza del pigmento aislado, estimada a partir del perfil cromatográfico obtenido en el registro realizado a 280 nm, fue del 95%.

2.3 - ELABORACIÓN DE LAS MERMELADAS

2.3.1 – MERMELADA DE REFERENCIA (MA)

La **mermelada de fresa de referencia (MA)** se elaboró utilizando la formulación proporcionada por la empresa colaboradora, que se recoge en la tabla siguiente:

Tabla VIII.1 – Formulación utilizada en la elaboración de la mermelada de fresa de referencia (MA).

<i>Componente</i>	<i>Cantidad (%)</i>
Fresa	52
Sacarosa	24
Jarabe de glucosa	20
Pectina	0,5
Ácido cítrico	0,2
Cloruro cálcico	0,04
Sorbato potásico	0,07
Agua	3,19

En un recipiente de acero inoxidable con fresas congeladas (300 g) se añadía aproximadamente el 50% de la sacarosa. La mezcla obtenida se sometía a calentamiento bajo agitación a temperatura de ebullición. Una vez que las fresas habían descongelado, se incorporaba el ácido cítrico y el azúcar restante mezclado con la pectina. Estas operaciones se llevaban a cabo en continua agitación con el fin de favorecer la disgregación de la fruta y la mezcla de todos los ingredientes. Cuando la mezcla comenzaba a hervir, se retiraba de la fuente de calor y se medía la concentración de sólidos solubles (°Brix) a 20°C. Seguidamente, se añadía cloruro cálcico disuelto en mayor o menor proporción de agua con el fin de obtener un valor de 47°Brix. Por último, se incorporaba el sorbato potásico. La mermelada se envasaba en caliente en frascos de cristal de 250 mL de capacidad completamente llenos, para evitar la formación de un espacio de cabeza, que se cerraban herméticamente con tapas de rosca. Después de enfriar, se almacenaban en cámara termostaticada a 25°C.

2.3.2 - MERMELADAS CON INCORPORACIÓN DE ÁCIDO PIRÚVICO (*M_B*) O DE ACETALDEHÍDO (*M_A*)

Para la elaboración de la **mermelada con incorporación de ácido pirúvico (*M_B*)** se utilizó el mismo procedimiento y la formulación base utilizada en la elaboración de la mermelada *M_A*, pero se redujo el porcentaje de agua añadida sustituyéndolo por el volumen necesario de ácido pirúvico para obtener una relación molar entre antocianos totales y ácido pirúvico de 1:100.

En la **mermelada con incorporación de acetaldehído (*M_A*)**, éste fue añadido a la mermelada una vez elaborada y enfriada debido a su elevada volatilidad (punto de ebullición a presión de 1 atm = 21°C). Se añadió el volumen necesario de acetaldehído para obtener una relación molar entre contenido de antocianos totales y acetaldehído de 1:20.

Las proporciones de ácido pirúvico y de acetaldehído incorporadas en las mermeladas se eligieron de acuerdo a lo establecido en ensayos previos realizados en nuestro laboratorio utilizando sistemas modelo (Escribano Bailón *et al.*, 2002). Para establecer las cantidades a añadir de cada compuesto se consideró un contenido de antocianos de 640 mg Pg 3-gluc.kg⁻¹, correspondiente a la concentración media de antocianos en las fresas de partida (637 ± 23 mg Pg 3-gluc.kg⁻¹ fresa, n = 3), determinado como se describe en los apartados 2.2 y 2.4 del Capítulo IV.

2.4 – ANÁLISIS DE PIGMENTOS

2.4.1 – EXTRACCIÓN DE LAS MERMELADAS

Una muestra de 2 g de mermelada se interponía con metanol al que se había incorporado 0,1% de HCl. La mezcla obtenida se introducía en baño de ultrasonidos durante 5 min y posteriormente era mantenida durante 24 h en congelador. Tras este período, se centrifugaba en una centrífuga refrigerada (2°C) durante 15 min a 4000xg. Se recogía el sobrenadante y el residuo sólido se volvía a extraer con metanol/HCl otras dos veces más. Los sobrenadantes se reunían, se les incorporaba un pequeño volumen de agua y se procedía a concentrar en evaporador rotativo a 30°C hasta eliminar todo el metanol. Este extracto concentrado era purificado haciéndolo pasar por

cartuchos Sep-Pak® de fase reversa C18 para extracción en fase sólida (SPE) (como se describe en el Capítulo IV, apartado 2.2), a fin de eliminar fundamentalmente ácidos y azúcares, presentes en la mermelada. Al extracto purificado se le añadía un pequeño volumen de agua y se evaporaba en evaporador rotatorio a temperatura <30°C hasta eliminación del metanol. El extracto acuoso obtenido se ajustaba con agua ultrapura a un volumen de 2 mL, para posterior análisis por HPLC.

2.4.2 – ANÁLISIS POR HPLC-DAD Y HPLC-MS

Las condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de HPLC-DAD corresponden a las optimizadas para el análisis de antocianos de la fresa descritas en el Capítulo IV, apartado 2.4. La cuantificación se realizó a partir de las áreas de los picos obtenidos en los cromatogramas registrados a 520 nm. Para el análisis de HPLC-MS se emplearon las condiciones de separación cromatográfica y de detección por espectrometría de masas descritas en el apartado 2.3.2, capítulo VI.

2.5 – ANÁLISIS DEL COLOR EN LAS MERMELADAS

Este análisis se llevó a cabo utilizando un colorímetro triestímulo que realiza la medida del color por reflexión. El colorímetro consta de un cabezal de medida que utiliza iluminación difusa, con geometría de observación con ángulo de 0°. Se utilizó el iluminante D₆₅. Los valores correspondientes a las coordenadas cromáticas L^* , a^* , b^* del espacio de color CIELAB, así como el Croma (C^*_{ab}) y el Tono (h_{ab}), eran proporcionados por el procesador de datos del colorímetro. Para cada una de las mermeladas, se efectuaban mediciones de color semanalmente y por quintuplicado.

3 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 – EVOLUCIÓN DE ANTOCIANOS Y FORMACIÓN DE NUEVOS PIGMENTOS

3.1.1 – MERMELADA DE REFERENCIA (MA)

La figura VIII.1 muestra un cromatograma con el perfil antociánico inicial de la mermelada (obtenido dos días tras su elaboración).

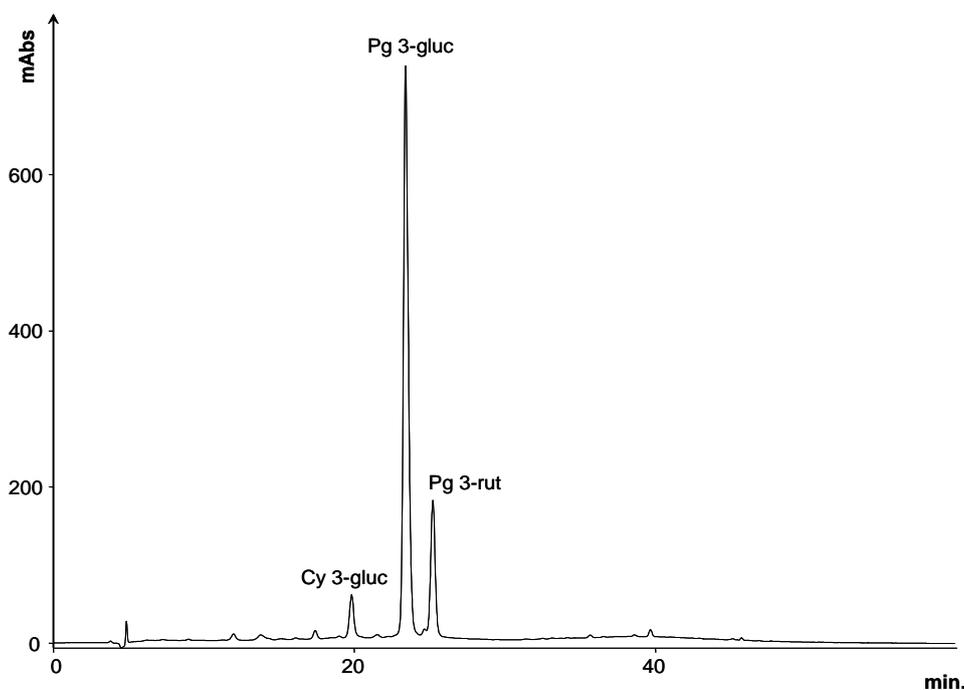


Figura VIII.1 – Cromatograma de HPLC registrado a 520 nm correspondiente a la mermelada MA obtenido dos días después de su elaboración.

El perfil de pigmentos es análogo al de fresas no procesadas (ver capítulo IV), con la presencia de los tres antocianos mayoritarios: cianidina 3-glucósido, pelargonidina 3-glucósido y pelargonidina 3-rutinósido. Las proporciones en las que se encuentran estos antocianos en la mermelada difieren ligeramente de las existentes en las fresas utilizadas para su elaboración (figura VIII.2), en el sentido de presentar porcentajes relativamente inferiores de los glucósidos y superiores del rutinósido de

pelargonidina, lo que sugiere una mayor estabilidad de este último frente al choque térmico y las condiciones de procesamiento empleadas para la obtención de la mermelada. En todo caso, Pg 3-gluc continúa siendo el antociano ampliamente mayoritario en el producto.

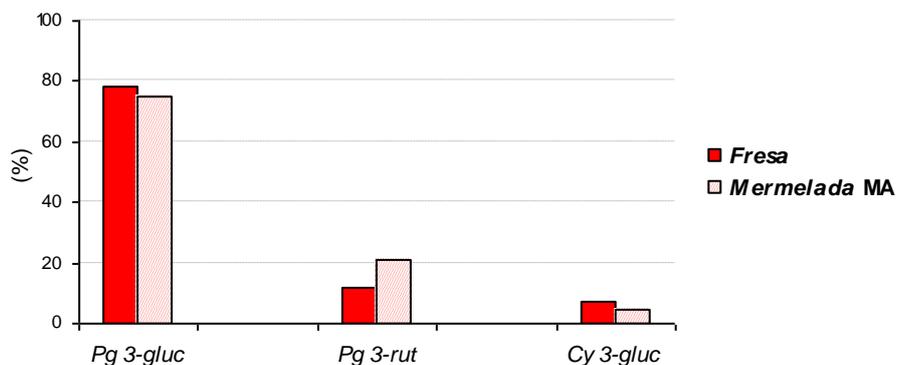


Figura VIII.2 – Porcentajes medios de los tres antocianos mayoritarios en fresas (cv Camarosa) y la mermelada obtenida a partir de las mismas.

La evolución del contenido y proporciones de estos pigmentos fue seguida a lo largo de 3 meses en almacenamiento a 25°C, tiempo en el que se producía la pérdida casi completa de los antocianos libres en el producto (figura VIII.3). Al cabo de ese tiempo, en la mermelada queda aproximadamente el 8% de la concentración inicial de antocianos. Este declive gradual a lo largo del periodo de almacenamiento está en

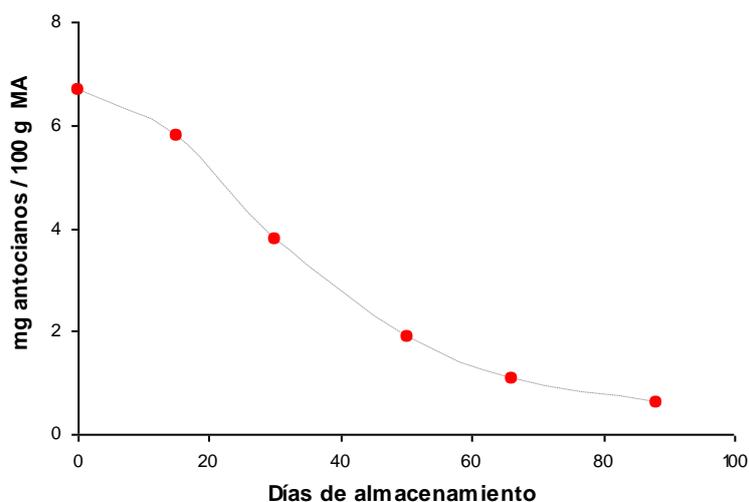


Figura VIII.3 – Evolución en el contenido de antocianos totales a lo largo del tiempo de almacenamiento en la mermelada de referencia (MA).

concordancia con lo encontrado por otros autores (Withy *et al.*, 1993; García-Viguera *et al.*, 1999).

Al fin de período de estudio considerado, en el perfil cromatográfico de la mermelada continúan destacando los picos de Pg 3-gluc y Pg 3-rut (figura VIII.4), aunque con relación a las proporciones iniciales entre ambos hay un aumento relativo del rutinósido (relación Pg 3-gluc / Pg 3-rut de 3,4 frente a 4,5 en el día 2 de ensayo), confirmando su mayor estabilidad con relación a los antocianidin-glucósidos. Por otra parte, en la zona inicial del cromatograma (figura VIII.4) es también evidente la presencia de tres picos menores (1, 2 y 3), cuyas masas y tiempos de retención confirman que se trata de pigmentos condensados antociano-flavanol previamente identificados en fresas (ver capítulo IV). Estos pigmentos estaban presentes en la fresas de partida y se detectan en los cromatogramas de la mermelada recién elaborada (figura VIII.1), sin embargo, en los mismos, esos picos poseen muy poca importancia relativa, al estar la escala cromatográfica determinada por el elevado contenido de antocianos.

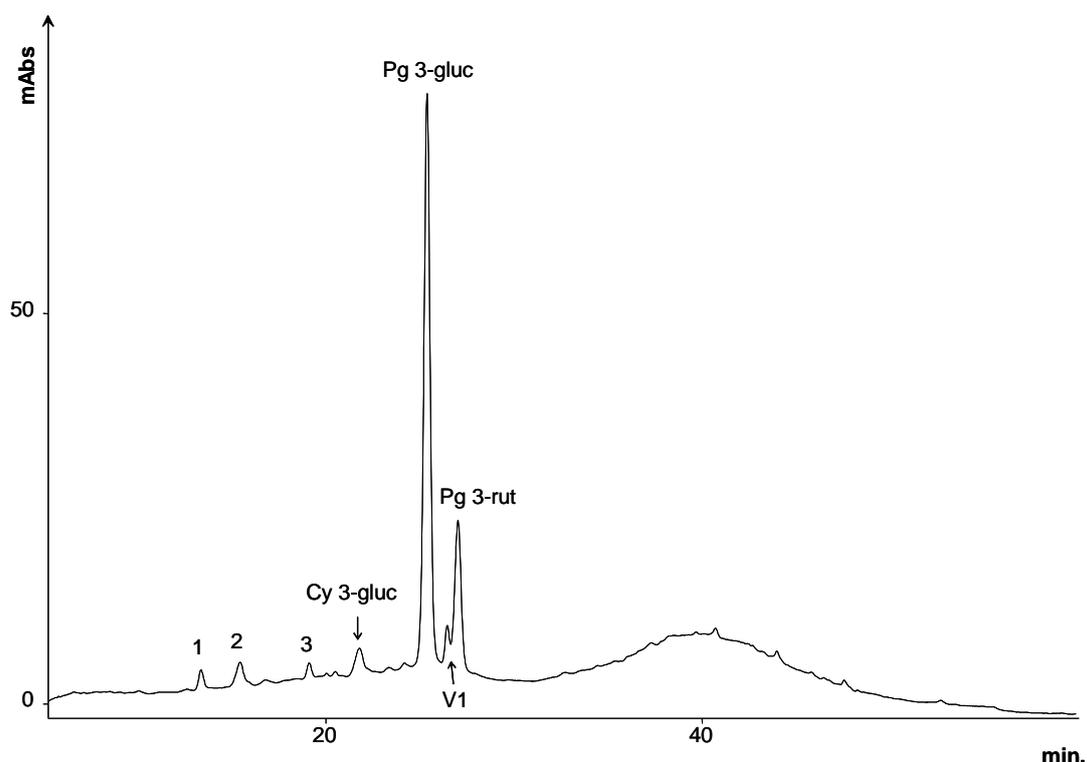


Figura VIII.4 – Cromatograma de HPLC, registrado a 520 nm, correspondiente a la mermelada *MA* después de tres meses de almacenamiento. La tentativa de identificación de los picos 1, 2 y 3 se encuentra en el Capítulo IV.

El hecho de que su importancia en los cromatogramas aumente con el almacenamiento pone de manifiesto que se trata de compuestos menos inestables que los antocianos monómeros y que, por tanto, su influencia sobre el color va a ser mayor con el paso del tiempo.

Con un tiempo de retención ligeramente inferior al de pelargonidina 3-rutinósido aparece un compuesto (V1 en figura VIII.4) cuyos espectros UV-visible y de masas obtenidos por análisis de HPLC-DAD-MS indican que se trata del piranoantociano formado a partir de la reacción entre pelargonidina 3-glucósido y ácido pirúvico, cuya estructura se muestra en la figura VIII.9. Aunque en esta mermelada no se había incorporado ácido pirúvico, ciertas cantidades del mismo pueden existir de forma natural en la misma procedentes de la materia prima, o formarse a partir de los azúcares. Este tipo de pigmentos poseen tonalidades más anaranjadas que los antocianos y su color está poco influido por la acidez del medio, por lo que manifiestan color a valores de pH > 3, como los existentes en la mermelada, a los que los antocianos deben existir en un porcentaje significativo en formas incoloras (ver capítulo I). De este modo, su influencia sobre el color en productos insuficientemente ácidos es mayor que el que podría suponerse a partir de sus bajos niveles y puede llegar a ser incluso superior al de los antocianos aunque estos se encuentren presentes en concentraciones mucho más elevadas (Vivar-Quintana *et al.*, 2002). Una discusión más detallada sobre las características y propiedades de estos pigmentos de nueva formación se realizará en el apartado siguiente, relativo a la mermelada *M.B.*, en la que se indujo su formación.

En el perfil cromatográfico de la mermelada evolucionada es asimismo patente la existencia de una elevación en la línea base en la zona final del cromatograma (figura VIII.4). Dicha elevación existía ya en los cromatogramas de la mermelada recién elaborada aunque apenas era observable, al estar la escala cromatográfica determinada por la magnitud de los picos de los antocianos (figura VIII.1). No ha sido posible, sin embargo, obtener ningún dato concluyente que nos permitiera establecer la naturaleza de los productos que determinan el aumento de la absorbancia en la parte final del cromatograma, para decidir en que medida contribuyen al mismo compuestos ya existentes en la mermelada inicial y los posiblemente formados en el curso del almacenamiento a medida que se pierde la materia colorante original.

Cuando los cromatogramas correspondientes a muestras de mermelada en etapas avanzadas del almacenamiento se registran a 440 nm (figura VIII.5), se aprecia que la elevación en la línea base cromatográfica es relativamente mayor que la

observada al realizar el registro a 520 nm (figura VIII.4). Aunque no se han podido obtener espectros UV-visible claros en esa zona de los cromatogramas, al no existir en la misma picos definidos, este hecho indica que al menos parte de los compuestos que eluyen ahí muestran absorbancia máxima a longitudes de onda en torno a 440 nm, como ocurría con los pigmentos derivados de procesos de condensación antociánica y/o pardeamiento, cuya formación era observada en las disoluciones modelo estudiadas en los capítulos VI y VII. Esta circunstancia aporta cierta evidencia de que los responsables de la elevación de la línea base en las mermeladas evolucionadas corresponden, al menos en parte, a pigmentos de nueva formación.

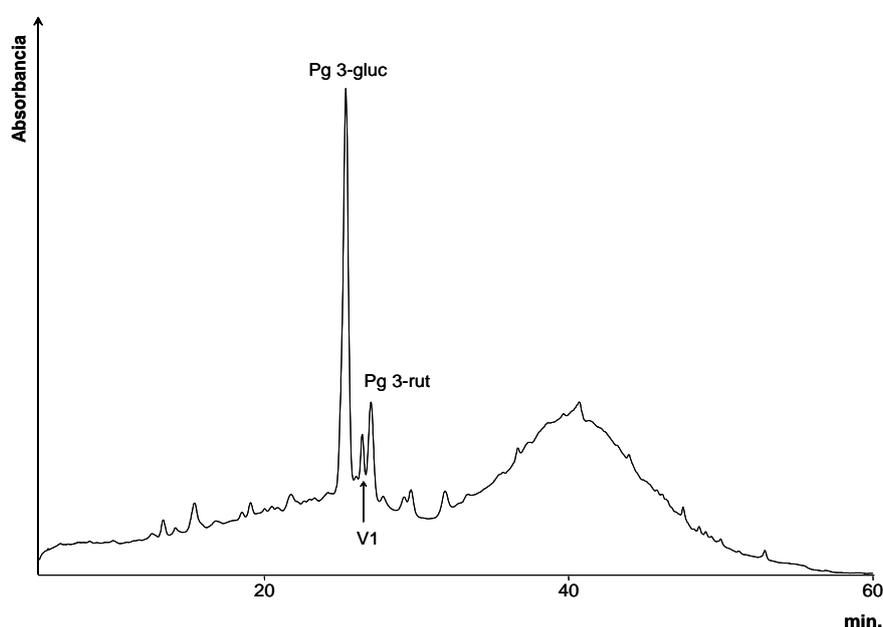


Figura VIII.5 – Cromatograma de HPLC, registrado a 440 nm, correspondiente a la mermelada *MA* después de tres meses de almacenamiento.

Perfiles cromatográficos similares a los obtenidos en este estudio son también encontrados en otros sistemas alimentarios evolucionados que contienen antocianos, como es el caso de los vinos tintos envejecidos. En este último tipo de producto es común referirse la presencia de “pigmentos poliméricos” o “antocianos polimerizados” como responsables de la elevación en la línea base en los cromatogramas, aunque su naturaleza concreta tampoco se encuentra totalmente esclarecida. En los vinos tintos se ha llegado a identificar diversos pigmentos de nueva formación derivados de antocianos, aunque de naturaleza no estrictamente polimérica y que aparecen en los cromatogramas como picos de elución definida (Vivar-Quintana *et al.*, 1999, 2002; Mateus *et al.*, 2001, 2002; Alcalde-Eon *et al.*, 2004), por lo que no explican la

producción de las “montañas” cromatográficas. Algunas observaciones realizadas nos hacen pensar que al menos una parte de los compuestos que producen el aumento de la línea base en los vinos podrían corresponder a antocianos ligados, probablemente en forma no covalente, con otros compuestos que entran a formar parte de la composición del producto, como proteínas, polisacáridos o sustancias fenólicas, encontrándose de este modo más protegidos frente a procesos de degradación o condensación. Entre las razones que apoyan esta suposición está el hecho de que al desplazar el cursor del detector de masas sobre esa zona del cromatograma, junto a iones moleculares desconocidos, se detectan repetitivamente iones correspondientes a los antocianos monómeros, a tiempos de retención variables y distintos a los esperables para los mismos. Asimismo, cuando se recoge el eluato correspondiente a esa parte, se somete a un cambio de pH y se vuelve a analizar por HPLC se puede observar nuevamente la liberación parcial de antocianos libres, que aparecen ahora como picos definidos a sus tiempos de retención característicos. La formación de ese tipo de “aglomerados estables” podría también justificar parcialmente la elevación de la línea base cromatográfica observada en las mermeladas desde una fase temprana de su evolución, a la que se uniría la formación, con el curso del tiempo, de nuevos pigmentos no establecidos, como antes se ha comentado.

En ningún caso, llegó a observarse en los cromatogramas de las mermeladas la presencia de picos definidos que pudieran corresponder a alguno de los pigmentos o sustancias incoloras previamente encontrados en las disoluciones modelo estudiadas en los capítulos VI y VII. Con el objeto de comprobar si podría haberse formado alguno de esos compuestos en cantidades no detectables al realizar los registros mediante el detector de diodos, se realizó una búsqueda de sus iones moleculares en los cromatogramas obtenidos en la detección por espectrofotometría de masas. De este modo, pudo llegar a detectarse la presencia en la mermelada de cantidades mínimas de los compuestos correspondientes a los picos **d** y **f** ($m/z = 487$), cuya formación era encontrada en los ensayos descritos en el capítulo VI a partir del antociano mayoritario de la fresa (Pg 3-gluc). Asimismo, fue también detectada la presencia de los productos P6 ($m/z = 723$) y P2 ($m/z = 573$), formados en los sistemas modelo que contenían Pg 3-gluc y flavanoles, estudiados en el capítulo VII. El hecho de que sólo pudieran llegar a detectarse estos pocos compuestos y en cantidades tan bajas que impedían su detección fotométrica, pone de manifiesto que en las mermeladas se encuentran muy limitados los procesos que conducen a la pérdida de antocianos en las disoluciones modelo, posiblemente al estar favorecida la existencia de otro tipo de reacciones debido a la mayor complejidad de la composición. Esta misma complejidad de las

mermeladas dificultaba la obtención de cromatogramas “limpios” en los registros fotométricos en el UV (250 y 280 nm), por lo que no se pudo realizar una detección satisfactoria de los productos correspondientes a la degradación hidrolítica de los antocianos (p.ej., ácido *p*-hidroxibenzoico o 2,4,6-trihidroxibenzaldehído) y, de este modo, realizar un seguimiento que nos pudiera dar una idea de la extensión de este proceso y su influencia sobre la tasa de desaparición de antocianos en las mermeladas. Este tipo de productos no eran bien detectados por espectrometría de masas en las condiciones utilizadas en este trabajo, por lo que tampoco fue posible establecer la presencia de los mismos en las mermeladas por búsqueda de sus iones moleculares.

Al igual que ocurría en las disoluciones modelo, la cinética de desaparición de Pg 3-gluc en la mermelada *MA* se ajustaba mejor a una ecuación de tipo exponencial que a una cinética de primer orden, aunque también era aceptable el ajuste obtenido en la regresión lineal. Por ello y teniendo en cuenta las mismas razones que ya se han comentado en el capítulo VI, con el objeto de comparar con los resultados obtenidos en los ensayos modelo, se ha considerado este último modelo para el cálculo del tiempo de media vida en la degradación del antociano en las mermeladas (tabla VIII.2).

Tabla VIII.2 – Tiempo de media vida, estimado por interpolación, para Pg 3-glucósido en los sistemas modelo GOx, GsinOx, GZ, 0,2BC, 1,0BCSinOx, 1,0BCOx y 1,5B (calculados en los Capítulos VI y VII), y para la mermelada *MA*.

<i>Medio</i>	<i>Tiempo de media vida, $t_{1/2}$ (días)</i>
GsinOx	48,0
Mermelada <i>MA</i>	39,7
1,0BCSinOx	16,9
GZ	15,9
1,5B	14,2
GOx	13,6
0,2BC	12,7
1,0BCOx	12,5

Como se puede observar, el tiempo estimado de media vida de Pg 3-gluc en la mermelada fue de 39,7 días. Este resultado acerca más el comportamiento del Pg 3-gluc en la mermelada al del ensayo modelo en el que el antociano se encuentra solo y en ausencia de oxígeno que a los observados modelos en presencia de oxígeno, azúcares o flavanoles. Se debe indicar que las mermeladas se mantenían tapadas

durante el almacenamiento, pero no se procedía a rellenar el espacio de cabeza con atmósfera inerte después de cada toma de muestra, por lo que las condiciones en las mismas, tras la primera apertura (5 días después de su preparación), no eran anaeróbicas. Aunque se asume que el acceso de oxígeno en las mermeladas es más limitado que en los ensayos en disoluciones modelo realizados en presencia de oxígeno, el notable aumento en el tiempo de media vida pone de manifiesto la importancia del sistema alimentario sobre la estabilidad antociánica, como ya habían observado Garzón y Wrolstad (2001, 2002). En este sentido, hay que tener en cuenta la existencia de mayores cantidades de azúcar y de un menor contenido acuoso en las mermeladas que en los ensayos modelo, con la consecuente existencia de una menor actividad de agua (a_w), así como la presencia en el producto de otras sustancias que podrían estabilizar los antocianos vía procesos de copigmentación o por actuar eventualmente como antioxidantes. Hay que tener en cuenta que, en las mermeladas, además de flavonoides, existen compuestos de otras familias fenólicas, que podrían contribuir a este último efecto; en particular, las fresas contienen cantidades relativamente elevadas de ácido elágico y elagitaninos (Kahkonen *et al.*, 2001), con reconocida actividad antioxidante (Festa *et al.*, 2001; Mullen *et al.*, 2002).

3.1.2 – MERMELADA CON INCORPORACIÓN DE ÁCIDO PIRÚVICO (*MB*)

El ácido pirúvico es una sustancia capaz de reaccionar con los antocianos 3-glicósido dando lugar a la formación de pigmentos con estructura de tipo piranoantociano, de color más estable que el de los antocianos originales (Fulcrand *et al.*, 1998). Por esta razón, se pensó en la posibilidad de incorporar este ácido durante la elaboración de la mermelada como modo de estabilización de los antocianos naturales. El ácido pirúvico está presente como componente habitual en diversos sistemas alimentarios, es un producto intermediario en la fermentación alcohólica y también un componente natural del organismo humano, al ser un subproducto del metabolismo de los hidratos de carbono. Además, se utiliza en la suplementación nutricional deportiva en dosis de aproximadamente 80 a 100 mg por kg de peso corporal. Es de suponer, por tanto, que su incorporación a la mermelada en las cantidades utilizadas en el ensayo, y siempre que se hiciese un uso normal del producto, no plantee ningún problema ni recelo en cuanto a seguridad alimentaria.

En la mermelada *MB* no se pudo establecer adecuadamente la cinética de desaparición de Pg 3-gluc a lo largo de todo el tiempo de almacenamiento, ya que en las condiciones cromatográficas utilizadas el antociano mostraba el mismo tiempo de retención que uno de los pigmentos de nueva formación (V3), por lo que, una vez que este último empezaba a formarse, los picos de ambas sustancias eluían solapados y no se podía realizar un seguimiento adecuado de la evolución de sus contenidos. No obstante, se pudo determinar que en los primeros 10 días de almacenamiento, la concentración de Pg 3-gluc en la mermelada había ya disminuido en al menos un 82% con relación al valor inicial. La desaparición del antociano es, por tanto, mucho más rápida que en la mermelada *MA*, poniendo de manifiesto la existencia de una pronta reacción con el ácido pirúvico. El hecho de que en este proceso se produzca la formación de nuevos pigmentos hace, sin embargo, que el descenso en el contenido de antocianos no se acompañe de un cambio en el color equivalente al que podría esperarse de acuerdo a lo observado en la mermelada *MA*, como luego se discutirá en el apartado 3.2 de este Capítulo.

En la mermelada *MB* se observó, efectivamente, la aparición de nuevos pigmentos, cuya formación no había sido tan evidente en la mermelada *MA*. Entre ellos, el más importante correspondía al pigmento designado como V1 (figura VIII.7), cuyo

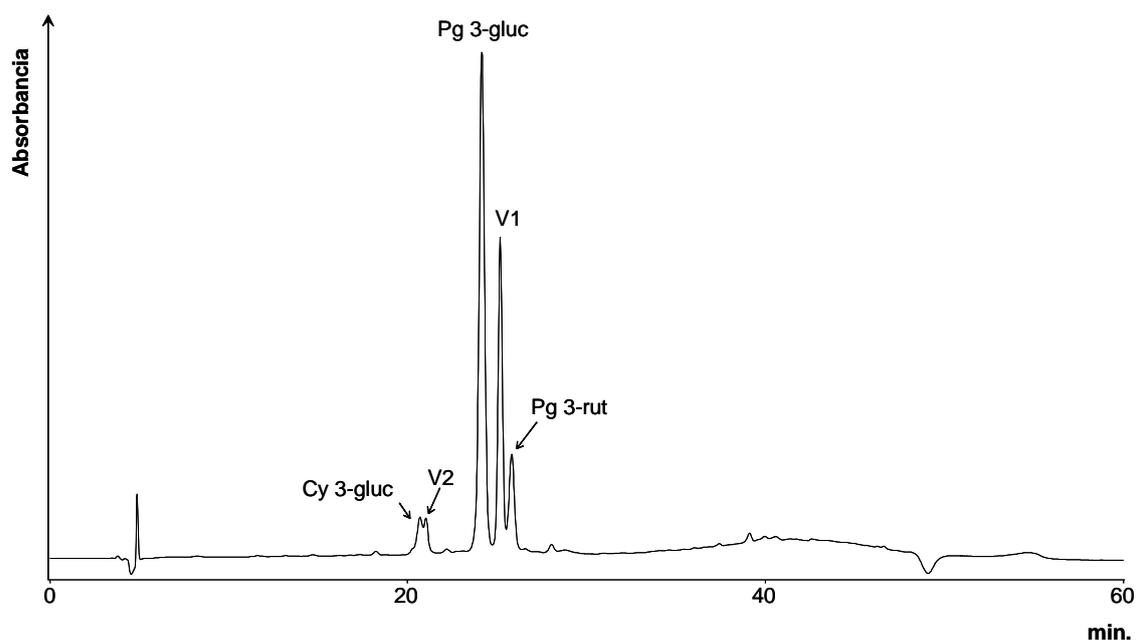


Figura VIII.7 – Cromatograma de HPLC, registrado a 520 nm, correspondiente a la mermelada *MB* obtenido tras 15 días de almacenamiento a 25°C. Los picos señalados como V1 y V2, corresponden a pigmentos de nueva formación. Un tercer pigmento (V3) eluye solapado con el pico del Pg 3-gluc. análisis por espectrometría de masas reveló un ion molecular $[M^+]$ de m/z 501, que daba un único fragmento m/z 339 correspondiente a la pérdida de un resto glucosa (figura VIII.8). Este ion molecular y patrón de fragmentación son coherentes con la estructura que se muestra en la figura VIII.9, correspondiente a un compuesto de tipo piranoantociano derivado de la reacción entre Pg 3-gluc y ácido pirúvico. Su espectro UV-Vis (figura VIII.10) está también de acuerdo con lo esperado para este tipo de pigmentos, en el sentido de presentar su longitud de onda de máxima absorción en el visible desplazada hipsocrómicamente con relación a la del antociano de partida, es decir hacia tonalidades más anaranjadas, y mostrar un aumento de la absorbancia en torno a 350-370 nm, característico de los antocianos con la posición 4-sustituida. La formación de pigmentos similares se ha detectado repetidamente en vinos (Alcalde-Eon *et al.*, 2003; Bakker *et al.*, 1977; Bakker y Timberlake, 1997; Mateus *et al.*, 2002; Vivar-Quintana *et al.*, 2002) y en disoluciones modelo que contenían antocianos y ácido pirúvico a pH ácido (Fulcrand *et al.*, 1996). Los mismos resultan de la cicloadición del

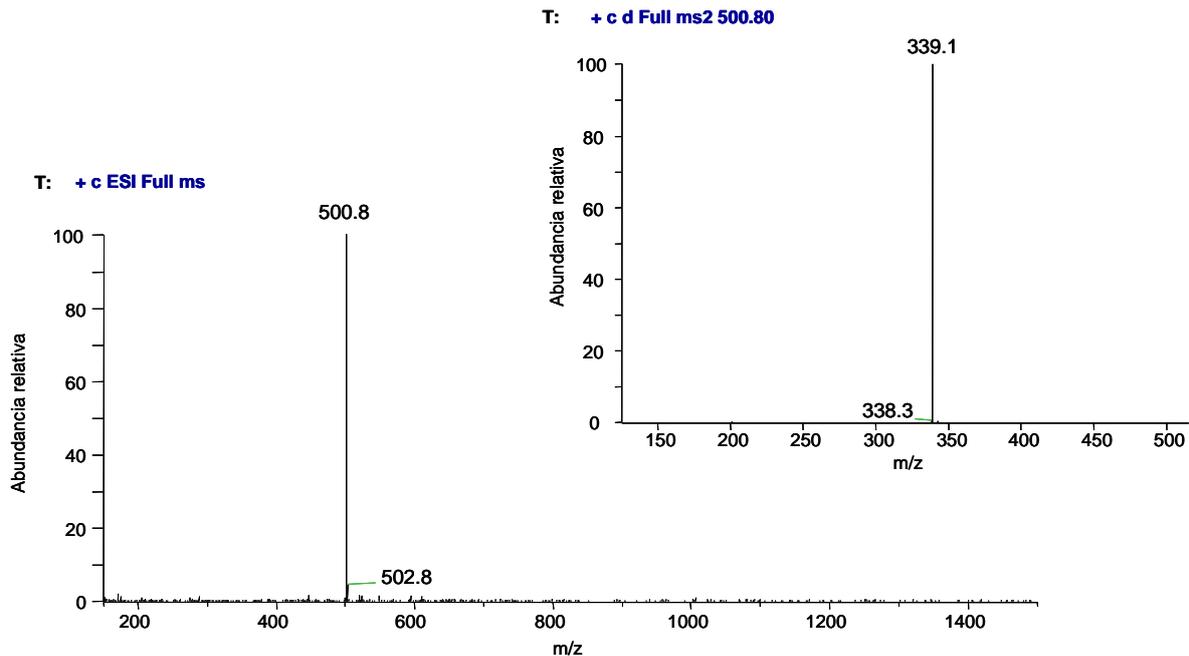
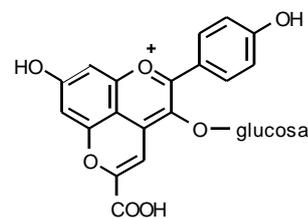


Figura VIII.8 – Espectros de masas (*full mass* y MS^2) del pico V1.

Figura VIII.9 – Estructura propuesta para el pigmento V1.



doble enlace de la forma enólica del ácido pirúvico sobre el C4 y el grupo hidroxilo en posición 5 del antociano, seguido de deshidratación.

La aparición del pigmento V1 era muy rápida, presentándose ya como un pico importante en los cromatogramas en el primero de los análisis realizados a la mermelada tras su elaboración (día 5). Posteriormente sus niveles continuaban aumentando durante los 50 primeros días de almacenamiento, para luego iniciar un ligero descenso hasta el final del estudio (figura VIII.11), poniendo de manifiesto su mayor estabilidad en el medio con relación a los antocianos.

En los cromatogramas se observaba también la aparición de otros dos nuevos pigmentos (V2 y V3 en las figuras VIII.7 y VIII.12), cuyas características espectrales (figura VIII.13) y de masas (figura VIII.14) eran consistentes con estructuras

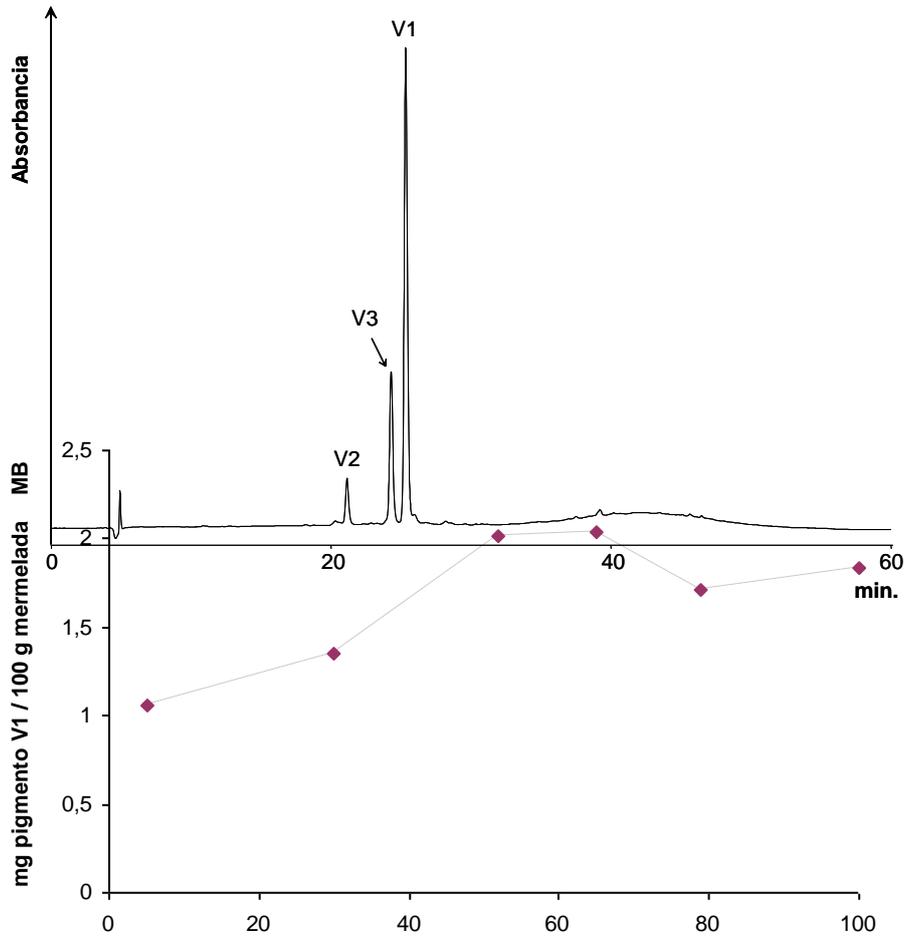


Figura VIII.10 – Espectro UV-Vis correspondiente al pigmento V1.

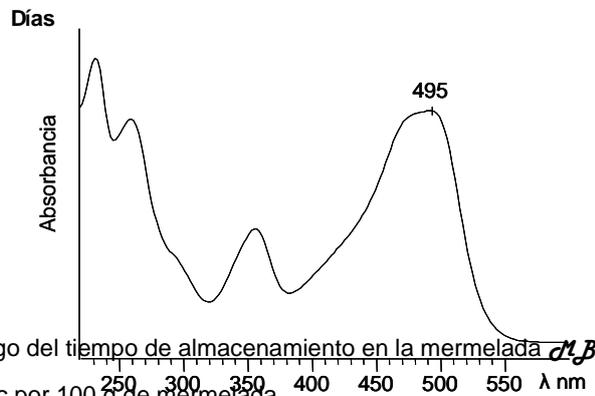
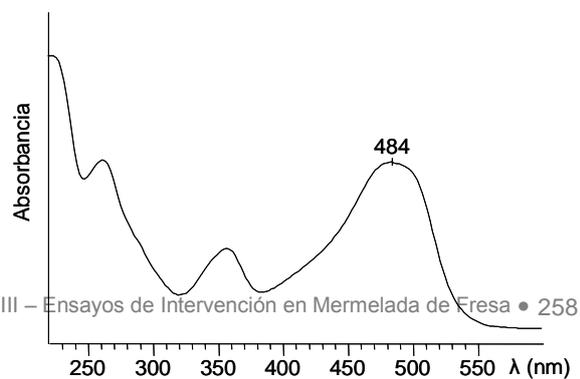


Figura VIII.11 – Evolución del pigmento V1 a lo largo del tiempo de almacenamiento en la mermelada MB. La concentración se expresa como mg de Pg 3-gluc por 100 g de mermelada.

Figura VIII.12 – Cromatograma HPLC, registrado a 520 nm, correspondiente a un extracto antocianico de la mermelada MB obtenido tras 100 días de almacenamiento a 25°C. Los picos V1, V2 y V3 corresponden a pigmentos de nueva formación.

Figura VIII.13 – Espectro UV-Vis correspondiente al pico V3.



correspondientes a los aductos pirúvicos de los otros dos antocianos mayoritarios de la fresa, Cy 3-gluc (pigmento V2 con ion molecular de m/z 517) y Pg 3-rut (pigmento V3 de m/z 647). La estructura propuesta para los mismos se encuentra representada en la figura VIII.15.

Atendiendo a lo recogido en la bibliografía y a las observaciones de nuestro propio grupo en estudios realizados en vinos y en sistemas modelo, este tipo de derivados pirúvicos de los antocianos suelen poseer tiempos de retención en las columnas de C18 ligeramente superiores a los de los antocianos de partida. En el caso de los pigmentos detectados en la mermelada *MB* esto se cumplía para los picos V1 y V2, pero no para V3, por lo que a pesar de sus espectros de masas y absorción, se nos planteó la duda de si el mismo derivaba realmente del Pg 3-rut. Con el fin de confirmar este último aspecto, se preparó una disolución modelo de Pg 3-rut, previamente aislado de la fresa, en presencia de ácido pirúvico, en las condiciones que se describen en el apartado 2.2 de la sección de metodología de este capítulo. Se comprobó que a medida que desaparecía el antociano tenía lugar la formación de un nuevo pigmento con las mismas características espectrales ($\lambda_{\text{máx}}$ a 484 nm) y de masas (ion molecular de m/z = 647) que V3, confirmando que el papel de Pg 3-rut como precursor del mismo.

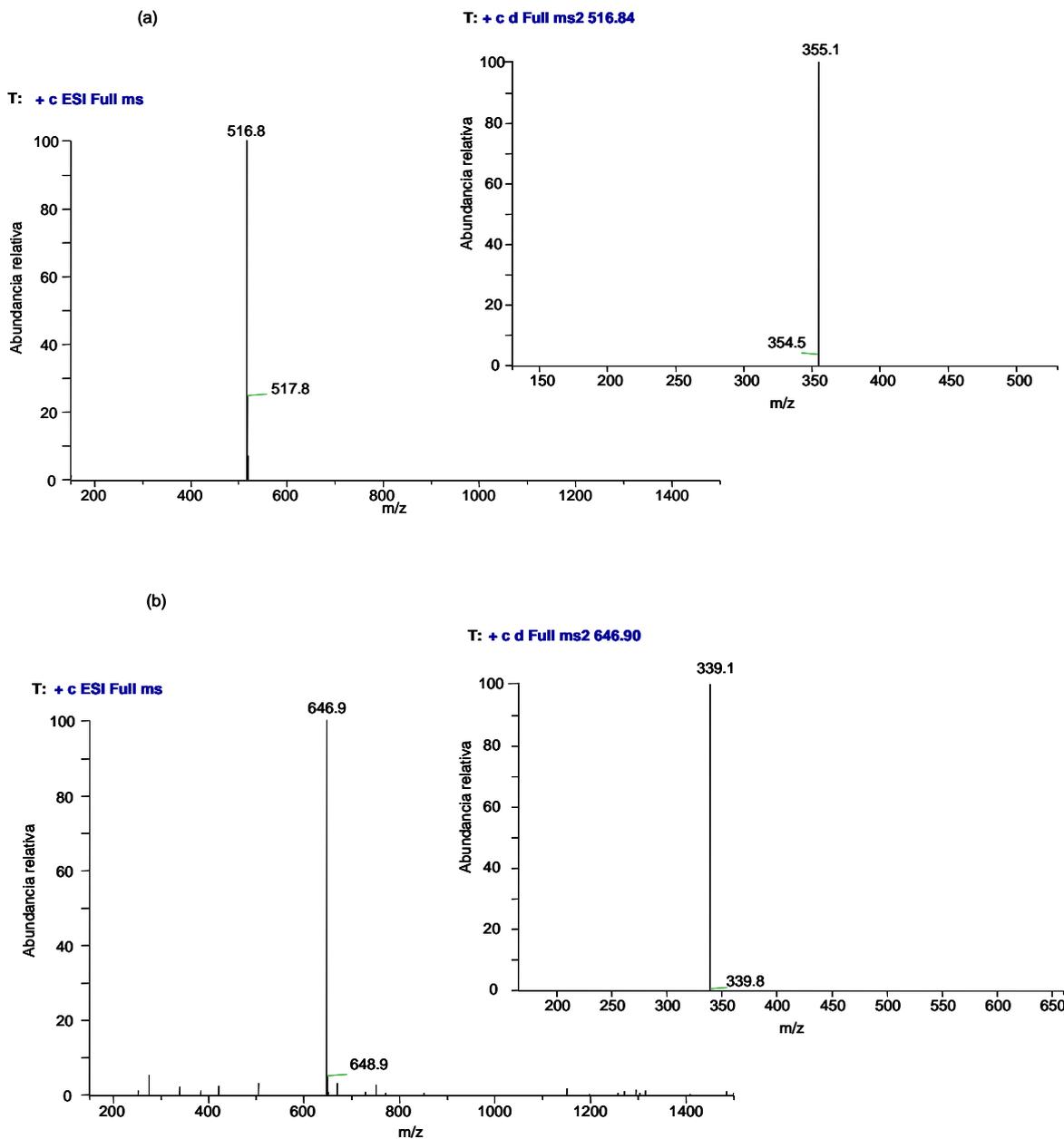
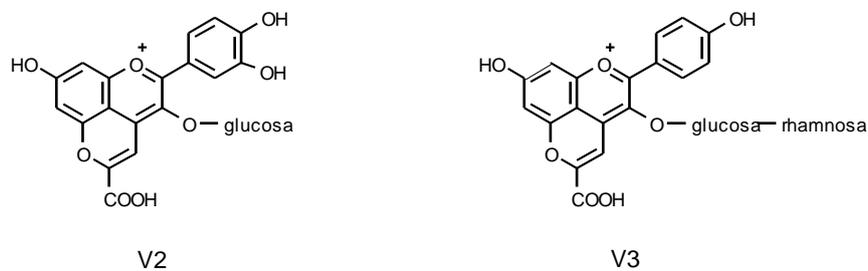


Figura VIII.14 – Espectros de masas y respectivos patrones de fragmentación (*full mass* y MS^2) de los



picos V2 (a) y V3 (b).

Figura VIII.15 – Estructuras propuestas para los pigmentos V2 y V3, formados en la mermelada *M.B.*

En la figura VIII.16 se muestran cromatogramas de la disolución modelo obtenidos en el día de su preparación y después de 31 días de reacción, donde se puede comprobar la práctica desaparición de Pg 3-rut y la presencia del pico V3, confirmado que efectivamente posee un tiempo de retención inferior al del antociano, al contrario de lo observado para los pigmentos equivalentes derivados de otros antocianos. En la figura VIII.16 se puede observar que en el cromatograma del día 31 se detecta también la presencia de cantidades menores del derivado pirúvico de Pg 3-gluc (V1). La formación de este pigmento en la disolución puede tener su origen en la pequeña impureza de Pg 3-gluc que acompañaba al Pg 3-rut, así como en la formación de ciertas cantidades 'in situ' del primero a partir de este último. Igualmente, V1 podría también formarse por pérdida del resto ramnosa directamente a partir del pigmento V3. Se debe indicar que la separación del resto de ramnosa es un proceso observado con cierta frecuencia en nuestro laboratorio en disoluciones de antocianidin 3-rutinósidos.

Los tres pigmentos V1-V3 eran los únicos productos coloreados relevantes que pudieron ser detectados en la mermelada *MB* una vez que los antocianos originales habían desaparecido (figura VIII.12) y deben ser, por tanto, los principales responsables del color mostrado por la mermelada en esos momentos. En ensayos realizados por diversos autores (Bakker y Timberlake, 1997; Romero y Bakker, 1999; Sarni-Manchado *et al.*, 1996a; Vivar-Quintana *et al.*, 2002) se ha puesto de manifiesto que los pigmentos de estructura piranoantociano poseen un color más estable a los cambios de pH y a la decoloración por SO₂ que los antocianos originales. Esto se atribuye a que tienen sustituida la posición 4 del antociano, lo que dificulta la reacción de hidratación, que lleva a la formación de pseudobases incoloras, estabilizando así las formas coloreadas. La existencia de una mayor estabilidad de estos nuevos pigmentos se puede también deducir de las observaciones realizadas en estos ensayos, ya que, una vez que no quedan cantidades relevantes de antocianos en el medio, las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a los nuevos pigmentos permanecen relativamente estables o experimentan descensos muy ligeros. Es de esperar, por tanto, que mermeladas elaboradas con incorporación de ácido pirúvico tengan también un color más estable en el tiempo que mermeladas convencionales. Existe, sin embargo, el problema de que el color aportado por los nuevos pigmentos muestra un matiz anaranjado, distinto al rojo característico de la mermelada de fresa, y que podría considerarse impropio para este tipo de productos, aspecto que se discutirá en el apartado siguiente. Será, en todo caso, necesario profundizar en este tipo de ensayos, para ver si es posible llegar a optimizar dosificaciones adecuadas de ácido pirúvico que

permitan la justa formación de nuevos pigmentos, y eventualmente complementar las mismas con otras operaciones que conduzcan a un color satisfactorio y más estable.

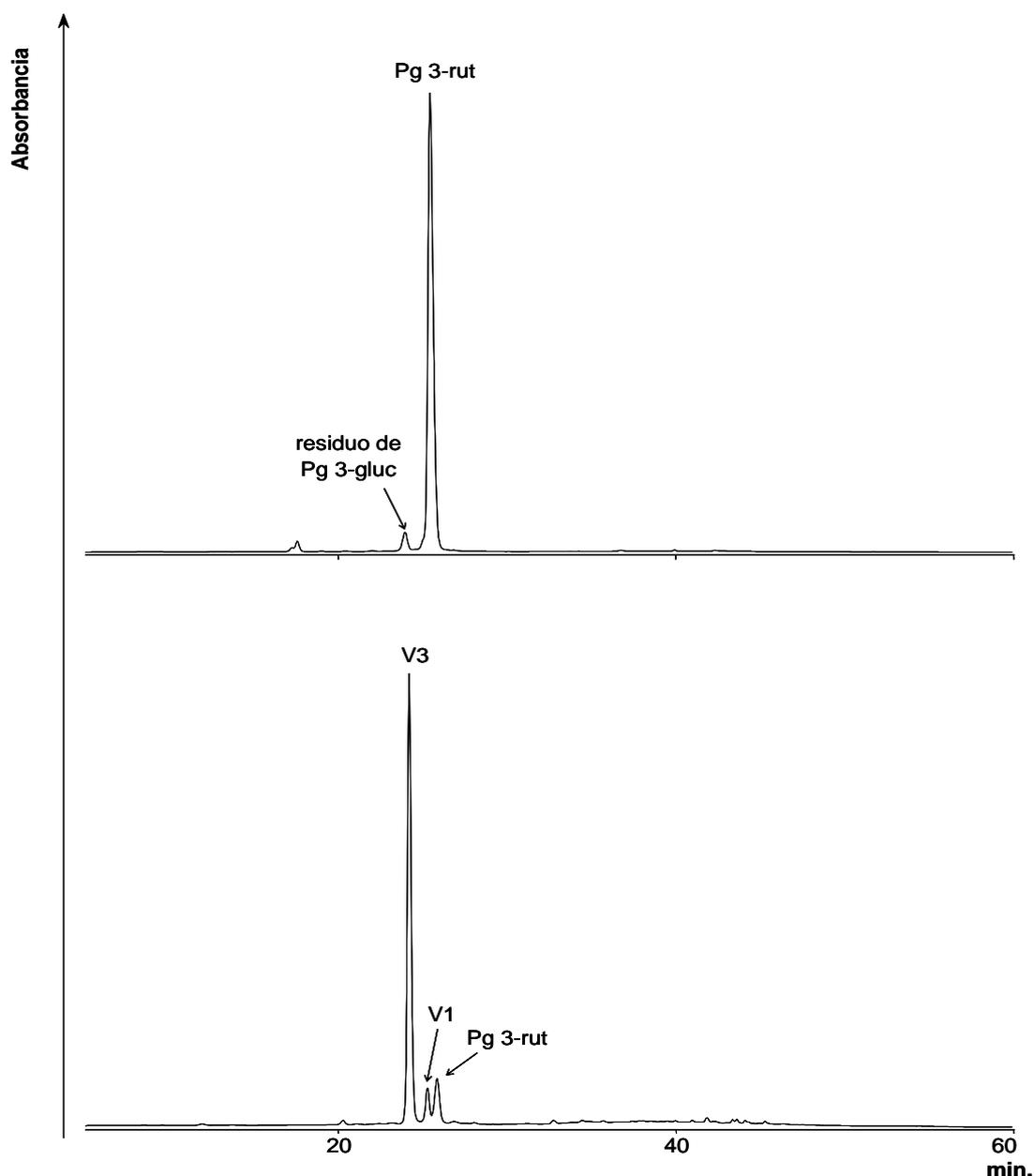


Figura VIII.16 – Cromatogramas de HPLC, registrados a 520 nm, de una disolución modelo de pelargonidina 3-rutinósido y ácido pirúvico de pH 3,5, al cabo de 0 y 31 días de almacenamiento a 25°C.

Como se ha señalado anteriormente, la formación de piranoantocianos similares a los aquí detectados ya había sido inducida en disoluciones modelo simples que contenían antocianos purificados y ácido pirúvico (Fulcrand *et al.*, 1998, Romero y Bakker 1999), básicamente con el fin de proceder su caracterización y estudiar sus características de formación y estabilidad, pero, según nuestro conocimiento, es la

primera vez que este proceso se induce directamente en un medio relativamente complejo y semisólido como es la mermelada y con un objetivo tecnológico.

3.1.3 – MERMELADA ELABORADA CON INCORPORACIÓN DE ACETALDEHÍDO (*ME*)

El acetaldehído es un componente natural de diversos productos alimenticios que se forma como compuesto intermediario durante procesos fermentativos y/o por oxidación química del etanol en bebidas alcohólicas. Está clasificado como sustancia GRAS ('generalmente reconocida como segura') por la FDA (*Food and Drug Administration, USA*) por lo que, en principio, su incorporación racional, de acuerdo a buenas prácticas de elaboración y en una dosificación adecuada, debería constituir una práctica segura.

Desde los estudios de Timberlake y Bridle (1976) se sabe que el acetaldehído es capaz de inducir la copolimerización entre flavanoles y con antocianos en medio ácido, dando lugar a pigmentos de tonalidad rojo-azulada. El mecanismo de las reacciones de condensación mediada por acetaldehído se conoce bien y comporta la reacción previa entre el acetaldehído en forma protonada y el flavanol para dar lugar a un aducto que, con posterioridad, reacciona sobre las posiciones 6 u 8 nucleófilas del anillo A de otro flavanol o antociano, quedando como puente de unión entre ambos un resto etilo ($\text{CH}_3\text{-CH-}$) (Timberlake y Bridle, 1976). Este tipo de reacciones han sido extensamente estudiadas en sistemas modelo y se supone que están relacionadas con la estabilidad coloidal y algunos de los cambios de color observados en vinos tintos (Bakker *et al.*, 1993; Escribano-Bailón *et al.*, 1996; Es-Safi *et al.*, 1996, 1999; García-Viguera *et al.*, 1994; Rivas-Gonzalo *et al.*, 1995; Saucier *et al.*, 1997).

Al igual que en el ensayo con ácido pirúvico, el objeto de esta prueba era estudiar la influencia de la incorporación de acetaldehído sobre la formación de nuevos pigmentos derivados de antocianos, que pudieran eventualmente conferir una mayor estabilidad al color de las mermeladas.

En la figura VIII.17 se compara la evolución del contenido en antocianos totales en las mermeladas *MA* y *ME*. Como se puede observar, la incorporación de acetaldehído produjo una rápida caída en la concentración antociánica, con una tasa de pérdida superior a la observada en la mermelada *MA*. Así, el $t_{1/2}$ estimado por

interpolación para la mermelada *MC* fue de 11,4 días frente a los 39,7 días encontrados para la mermelada *MA*. La rápida pérdida de antocianos en la mermelada *MC* es atribuible a su implicación en reacciones de condensación mediada por acetaldehído en las que también intervienen flavanoles.

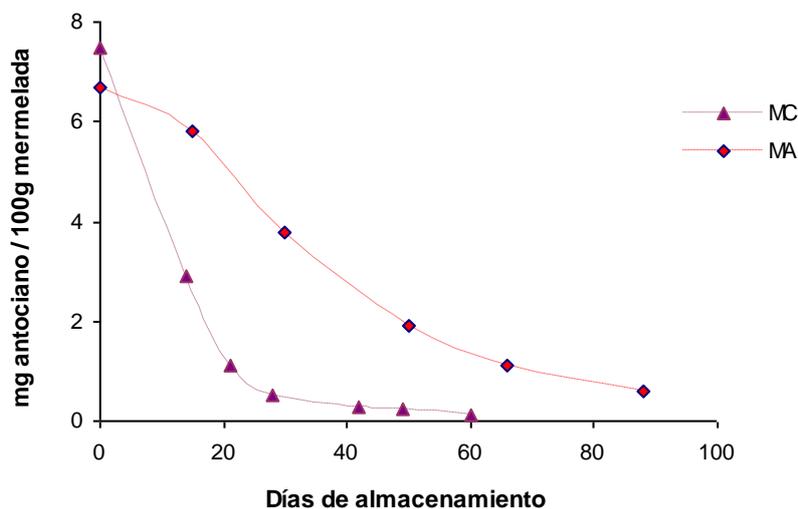


Figura VIII.17 - Evolución del contenido de antocianos totales en las mermeladas *MA* y *MC*.

En la figura VIII.18 se compara la evolución en la mermelada *MC* de los dos antocianos mayoritarios, pelargonidina 3-glucósido y pelargonidina 3-rutinósido. La tasa de degradación de ambos pigmentos es muy similar, con valores de $t_{1/2}$, estimados por interpolación, de 11,5 días para Pg 3-gluc y de 12,4 para Pg 3-rut. El estudio realizado no permite establecer si esta diferencia es significativa y, por tanto, si existen realmente diferencias de reactividad entre ambos antocianos frente a la condensación con flavanoles mediado por acetaldehído. De ser así, puede especularse que en el caso del Pg 3-rut podrían existir mayores impedimentos estéricos para la aproximación del aducto etil-flavanol y subsecuente formación de pigmentos condensados que en el del Pg 3-gluc.

En lo que respecta a nuevas sustancias, se observó en los cromatogramas (figura VIII.19) la rápida aparición de dos pigmentos principales de nueva formación, designados T1 y T2, cuyo espectro UV-Vis presentaba una longitud de onda de máxima absorción en el visible desplazada batocrómicamente 18 nm con relación a la de Pg 3-gluc; se trata, por tanto, de pigmentos con una tonalidad más azulada que este antociano. Ambos compuestos presentaban iones moleculares en modo positivo de m/z

749, poniendo de manifiesto que se trata de pigmentos derivados de la condensación entre Pg 3-gluc con un flavanol monómero (seguramente (+)-catequina, al ser

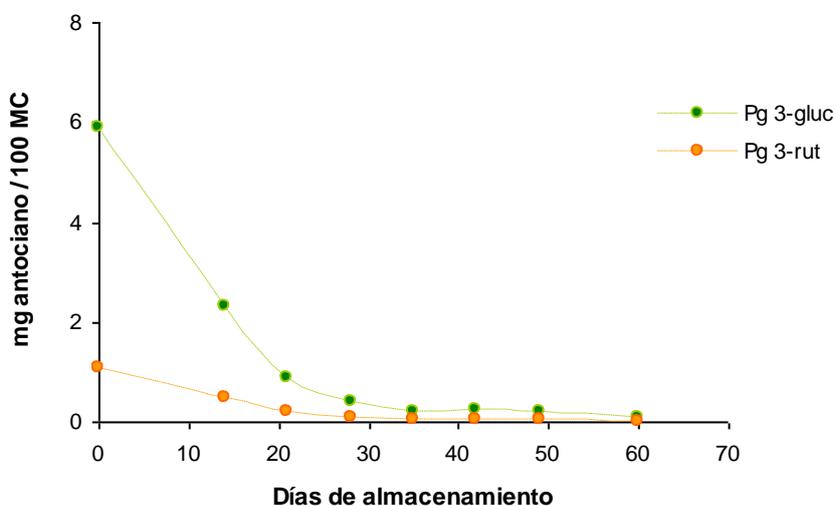


Figura VIII.18 - Evolución de las concentraciones de Pg 3-gluc y Pg 3-rut en la mermelada *ME*.

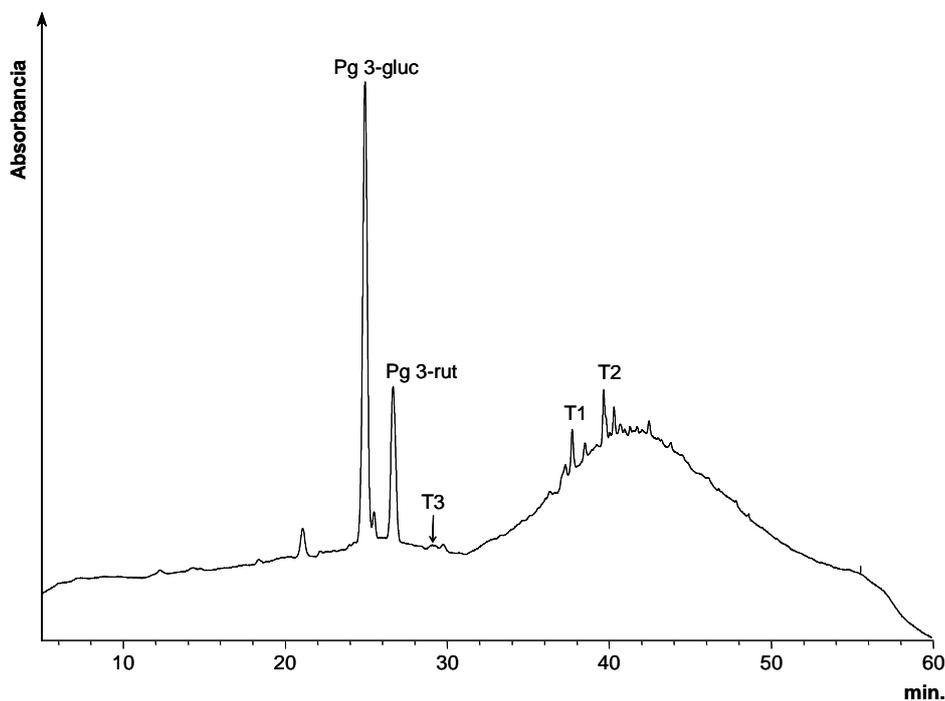
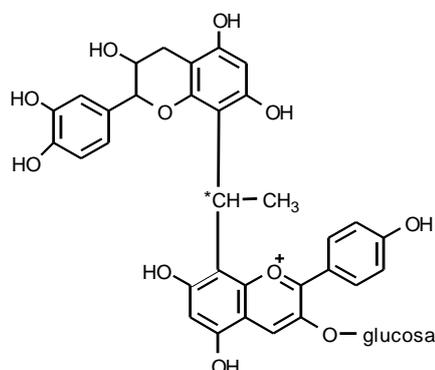


Figura VIII.19 –Cromatograma de HPLC, registrado a 520 nm, correspondiente a la mermelada *ME* obtenido tras 30 días de almacenamiento a 25°C.

mayoritario en la fresa) a través de un puente etilo (figura VIII.20). La formación de este tipo de pigmentos en sistemas que contienen antocianos y flavanoles en presencia de acetaldehído es un proceso bien conocido, que ha sido extensamente estudiado en nuestro laboratorio, tanto en medios modelo (Rivas Gonzalo *et al.*, 1995; Escribano-

Bailón *et al.*, 2001; Francia-Aricha *et al.*, 1997) como en vinos tintos (Alcalde-Eon *et al.*, 2004; Vivar-Quintana *et al.*, 1999; Pissarra *et al.*, 2003, 2004). La formación de dos productos de igual masa molecular se explica por la existencia de dos isómeros, debido al carbono asimétrico existente en el puente etilo (Escribano-Bailón *et al.*, 1996; Rivas Gonzalo *et al.*, 1995).

Figura VIII.20 – Estructura propuesta para los pigmentos T1 y T2 formados en la mermelada C. La existencia de un carbono asimétrico, C*, da lugar a la formación de los dos isómeros.



Los pigmentos T1 y T2 son de aparición bastante rápida, a pesar de que la acidez de la mermelada (pH 3,5) no es la óptima para su formación, que se encuentra más favorecida a pHs más ácidos (García-Viguera *et al.*, 1994), por la necesidad de protonación del acetaldehído para que la reacción tenga lugar (Rivas Gonzalo *et al.*, 1995). En todas las muestras analizadas el pico T2 presentaba mayor área cromatográfica que el pico T1. La formación preferencial de uno de los isómeros ha sido ya observada en nuestro laboratorio en diversos estudios realizados en sistemas modelo con otros antocianos y flavanoles (Escribano Bailón *et al.*, 2001; Francia-Aricha *et al.*, 1997; Rivas Gonzalo *et al.*, 1995).

Los mayores niveles de ambos pigmentos se alcanzan el día 15 de estudio y a partir de ese momento se observa un también rápido descenso en sus concentraciones (figura VIII.21); lógicamente, su formación cesa una vez que no existe disponibilidad de antociano y/o acetaldehído (que se pierde, además de por su implicación en las reacciones de condensación, por volatilización). En estudios anteriores, ya habíamos demostrado que este tipo de productos son bastante inestables. Por una parte, mientras existe acetaldehído disponible, continúan aumentando de tamaño por incorporación de nuevas unidades flavanol (Rivas-Gonzalo *et al.*, 1995); por otra, tienen también tendencia a despolimerizar, liberando formas etil-flavanol reactivas que pueden ser captadas nuevamente por los propios condensados y/o por otros flavanoles presentes en el medio (Escribano-Bailón *et al.*, 2001). De este manera, se producen reorganizaciones estructurales y se forman productos de tamaño progresivamente

mayor, dando lugar a mezclas complejas de pigmentos de difícil separación cromatográfica y que dan lugar a un aumento en la absorbancia de la línea base en la zona final del cromatograma (figura VIII.22). La presencia de estas mezclas de pigmentos está avalada por la observación de que al desplazar el cursor del detector de diodos a lo largo de la “montaña” se registran repetidamente espectros UV-Vis similares a los de los pigmentos T1 y T2.

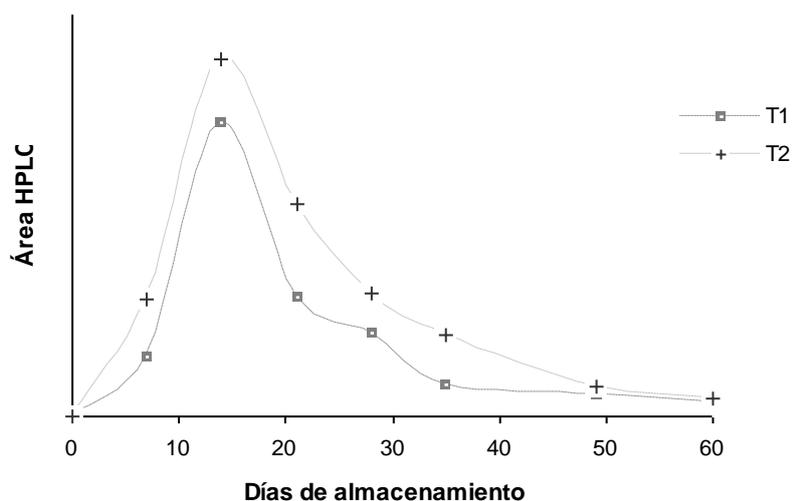


Figura VIII.21 - Evolución de las áreas cromatográficas de los picos T1 y T2 en la mermelada *ME* a lo largo del tiempo de estudio.

Al igual que ocurría en la mermelada *MA*, en *ME* se observó la formación del pigmento V1 (figura VIII.12), derivado de la reacción entre Pg 3-gluc y ácido pirúvico, aún cuando éste no se había incorporado. La explicación a este hecho es la misma que se había ofrecido en el caso de *MA*. Además de V1, en la mermelada *ME* se detectó también la formación de cantidades mínimas de otro pigmento con espectro UV-Vis de tipo piranoantociano, marcado como T3 en el cromatograma de la figura VIII.19. El espectro de masas de este compuesto (ion molecular de m/z 457, que da lugar a un fragmento MS² de m/z 295 - pérdida de una glucosa-, figura VIII.24) concuerda con la estructura que se muestra en la figura VIII.25, similar a la de la denominada vitisina B (Bakker y Timberlake, 1997), derivada de la reacción entre malvidina 3-monoglucósido y acetaldehído (Fulcrand *et al.*, 1998).

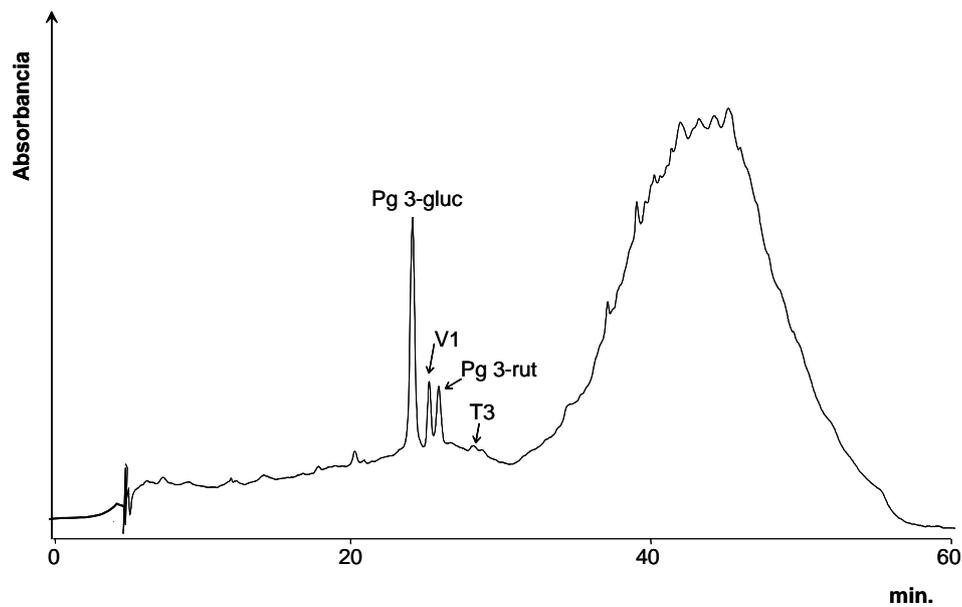


Figura VIII.22 - Cromatograma registrado a 520 nm correspondiente a la mermelada *ME* el día 60 de estudio.

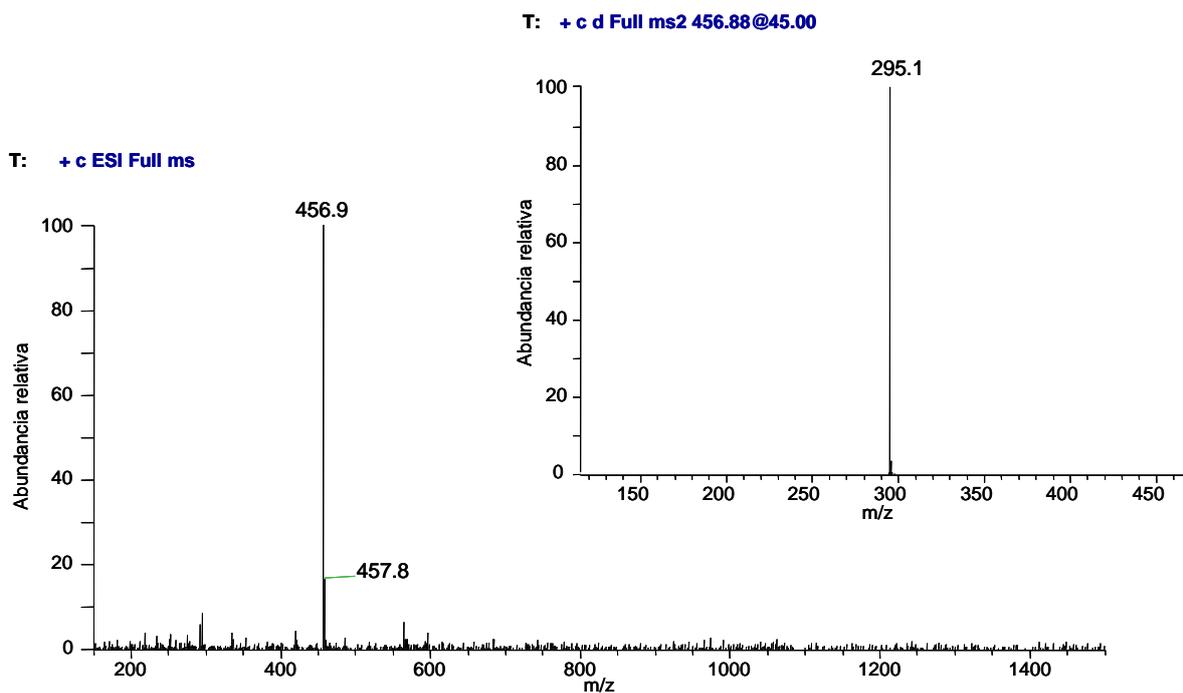
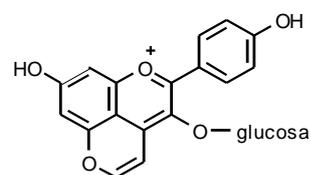


Figura VIII.24 – Espectros de masas (*full mass* y MS^2) del pico T3.

Figura VIII.25 – Estructura propuesta para el compuesto T3 formado en la mermelada *ME*.



3.2 – EVOLUCIÓN DEL COLOR DE LAS MERMELADAS

La evolución del color de las mermeladas se siguió por análisis cromático en el espacio de color CIE 1976 – ($L^*a^*b^*$), conocido como CIELAB, ya utilizado por otros autores en estudios similares sobre mermeladas de frutas rojas (García Viguera *et al.*, 1998 y 1999; Grigelmo-Miguel, 1999). En la figura VIII.26 se muestran las coordenadas cartesianas y cilíndricas del espacio CIELAB. Los parámetros a^* , b^* , L^* (claridad), h (tono) y C_{ab} (croma) serán los utilizados a lo largo de esta discusión.

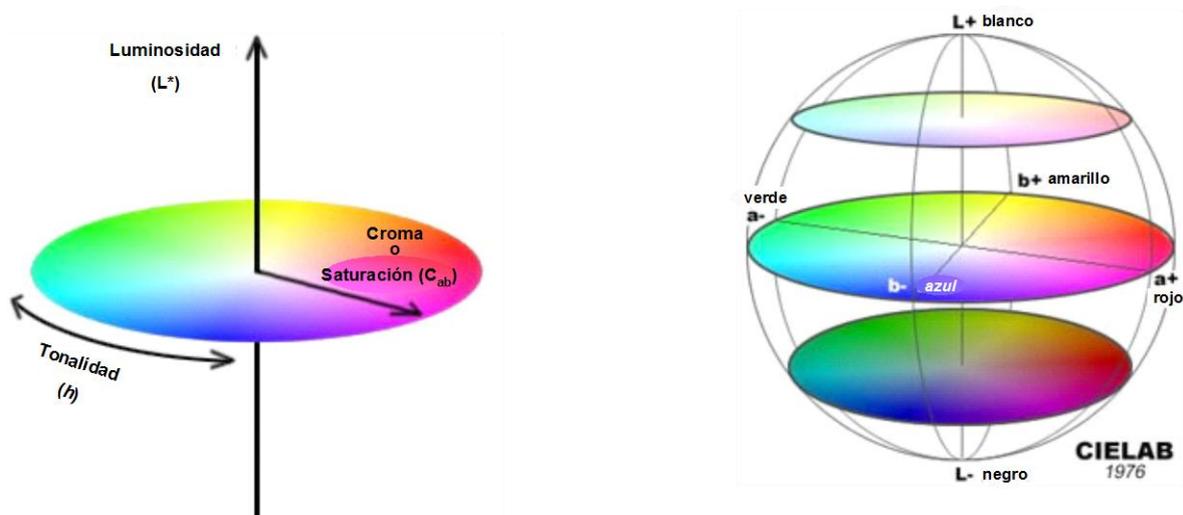


Figura VIII.26 – Coordenadas cartesianas y cilíndricas del espacio de color CIE 1976 $L^*a^*b^*$ (CIELAB).

En la figura VIII.27 se muestra la posición de las tres mermeladas de fresa estudiadas en el diagrama CIELAB (coordenadas a^* y b^*) el día de su elaboración y el último día de estudio. Los valores de cromaticidad correspondientes a las mermeladas recién elaboradas se corresponden con un color percibido rojo-anaranjado y son similares a los encontrados por Grigelmo-Miguel y Martín-Belloso (1999) en mermeladas de fresa, pero no por García Viguera *et al.* (1999), quienes obtuvieron valores entre 30 y 40% superiores. Una posible explicación a este hecho es que estos últimos autores procesan la mermelada en condiciones de vacío, por lo que la pérdida de antocianos durante la elaboración (momento en el que es de esperar que se produzca una importante pérdida en su contenido por degradación, debido al choque térmico) debe ser mucho menor que en las mermeladas elaboradas a presión atmosférica.

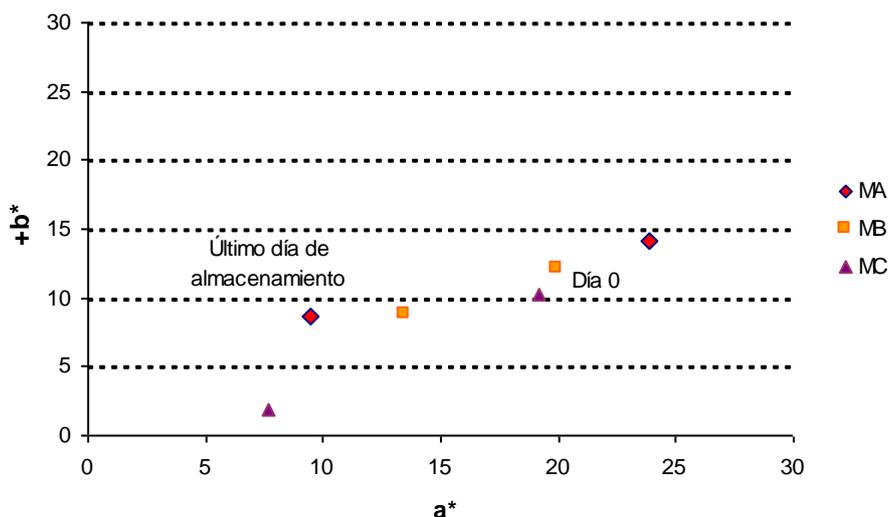


Figura VIII.27 – Posición de las mermeladas *MA*, *MB* y *MC* en el diagrama CIELAB (coordenadas a^* y b^*) el día de su elaboración y el último día de almacenamiento.

En la figura VIII.28 se muestra la evolución de los parámetros a^* y b^* en las tres mermeladas. A lo largo del tiempo, se observan descensos en los valores de cromaticidad, que son más o menos acusados en función del tipo de mermelada. Así, en la mermelada *MA*, el parámetro a^* es el que presenta la mayor variación, siendo ésta de casi 15 unidades CIELAB. Hemos de recordar que el parámetro a^* se corresponde con la componente roja del color y es, por tanto, en el que se observan mayores modificaciones en las mermeladas de fresa convencionales. De hecho, algunos autores (García Viguera *et al.*, 1999) utilizan únicamente este valor para discutir los cambios de cromaticidad que tienen lugar en las mermeladas.

En todos los casos, con el curso del tiempo se produce también un desplazamiento en los valores de b^* hacia valores más bajos (más azules), aunque de menor cuantía que en el caso de a^* . En este sentido, la mermelada *MC* presenta los valores más bajos de b^* , tanto al inicio como al final del estudio y experimenta, asimismo, el mayor desplazamiento en este parámetro, indicando un color más azulado que las otras dos mermeladas.

La variación de la cromaticidad que experimenta la mermelada *MA* durante el periodo de estudio debe atribuirse a la degradación de los antocianos y a la contribución de pigmentos formados en reacciones de pardeamiento fenólico. En este sentido, ha sido señalado (Wesche-Ebeling y Montgomery, 1990) que, si bien probablemente las reacciones de pardeamiento enzimático no tengan lugar en la

mermelada tras las altas temperaturas del procesado, la catequina y la PPO pueden reaccionar muy rápidamente dando lugar a quinonas reactivas las cuales pueden, en etapas posteriores, ser causa de degradación de los antocianos y de formación de nuevos pigmentos.

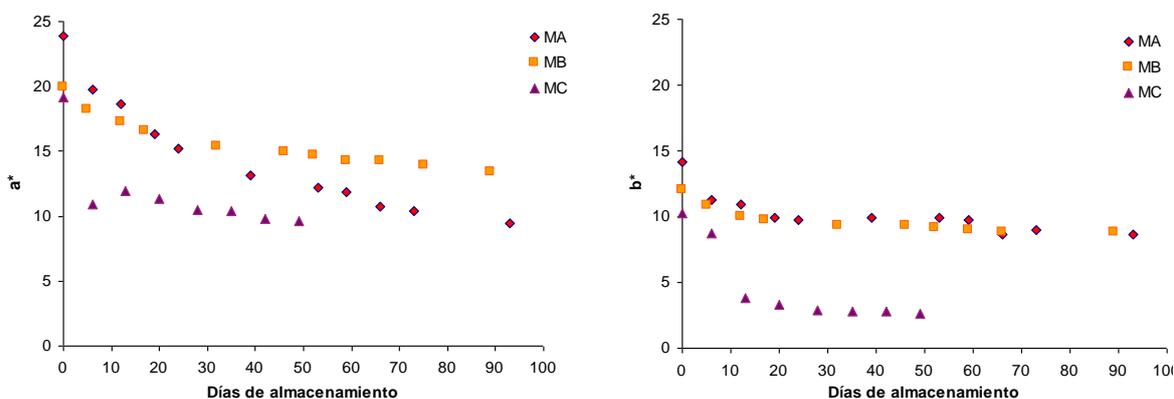


Figura VIII.28 – Evolución de los parámetros a^* y b^* y en las mermeladas MA , MB y MC a lo largo del almacenamiento.

La disminución que experimenta la mermelada MB en los valores de los parámetros a^* (6,5 unidades) y b^* (3,2 unidades) es sensiblemente inferior que la que presenta la mermelada MA , especialmente en el caso de a^* . El cambio objetivo en el color es, por tanto, menor en la mermelada MB que en la MA , lo que debe necesariamente explicarse por la contribución de los pigmentos de nueva formación de tipo piranoantociano inducidos en esa mermelada como consecuencia de la adición de ácido pirúvico. Como se comentó en el apartado 3.2.2, estos pigmentos poseen mayor estabilidad química y un color poco dependiente del pH, al contrario que los antocianos.

En la evolución de la mermelada MB podemos considerar dos periodos: el primero de ellos, correspondiente a las dos semanas iniciales del ensayo, en el que la modificación del parámetro a^* es más rápida; el segundo, desde la tercera semana hasta el final, en el que la modificación es ya poco acusada. Esta evolución coincide con la observada en la composición de la materia colorante de la mermelada, ya que la primera fase corresponde a la rápida caída de antocianos y formación de nuevos pigmentos, los cuales, una vez formados, muestran gran estabilidad y sólo en la parte final del período de ensayo sufren un ligero descenso en sus contenidos. Como se puede observar en la figura VIII.28, a partir del día 17 los valores del parámetro a^* en la mermelada MB comienzan a ser superiores a los de la mermelada MA , hecho que

debe ser atribuido a la influencia sobre el color de los nuevos pigmentos formados. Esto se comprueba, efectivamente, al observar la evolución de los perfiles cromatográficos de la materia colorante; así, los cromatogramas de las mermeladas obtenidos a las dos semanas del estudio mostraban todavía una elevada concentración relativa de antocianos en *MA* (del orden del 80% del contenido original), mientras que en *MB* los derivados piranoantociánicos representaban el 65% del total de pigmentos presentes (según estimación realizada a partir de las áreas de los picos registrados a 520 nm).

La mermelada *ME* sufre un considerable descenso en los valores de a^* durante la primera semana de estudio (8 unidades), mucho más rápido que el experimentado en las otras dos mermeladas y coherente con la existencia de una pérdida rápida de antocianos no acompañada por la formación de nuevos pigmentos de tonalidad rojiza (como ocurría en el caso de *MB*).

La variación del parámetro b^* a lo largo del tiempo es mucho más acusada para la mermelada *ME* (7,6 unidades) que para las mermeladas *MA* y *MB*. En el apartado 3.1.3 se señaló que los pigmentos formados por condensación mediada por acetaldehído presentan el máximo de absorción en el espectro visible desplazado batocrómicamente, lo que se corresponde con tonalidades más azuladas que los antocianos de partida. La transformación de los antocianos presentes en la mermelada *ME* en pigmentos de condensación mediada por acetaldehído debe ser, por tanto, la responsable de la disminución en el valor del parámetro b^* , el cual se acerca a valores negativos, lo que se corresponde con una mayor contribución al color percibido de la componente azul. Una vez que se ha producido la pérdida total de antocianos, y, por tanto, ya no tiene lugar la formación de nuevos pigmentos directamente a partir de los mismos, se produce una estabilización en los valores de b^* . Como antes se ha señalado, los pigmentos de condensación mediada por acetaldehído son relativamente inestables, por lo que el mantenimiento en la componente azul del color en esa etapa debe atribuirse a los nuevos productos complejos que resultan de la reestructuración de los mismos.

En la figura VIII.29 se muestra la evolución del croma en las mermeladas *MA*, *MB* y *ME*. Se observa que el paso del tiempo produce un cambio hacia valores de croma más bajos, especialmente en las mermeladas *MA* y *ME* que presentan una modificación total del croma de 15 y 14 unidades CIELAB respectivamente. No obstante, hay que distinguir que este descenso es, para la mermelada *MA*, progresivo

y se produce a lo largo del periodo de almacenamiento, mientras que en la mermelada *MC* tiene lugar, principalmente, durante la primera semana de estudio, en la cual se produce una disminución del croma del 73% respecto al valor inicial. Como quedó reflejado en párrafos anteriores, la modificación del color que experimenta la mermelada *MA* debe ser atribuida a la degradación de pigmentos antocianicos y a la probable formación de productos de pardeamiento, mientras que la modificación del color en la mermelada *MC* se debe, básicamente, a la formación de pigmentos azulados formados por la condensación, mediada por acetaldehído, entre los antocianos presentes en la mermelada y otros compuestos fenólicos. En la mermelada *MB*, la disminución del croma es de menor cuantía que en las otras dos (8 unidades), lo que confirma que la misma mantiene el color más estable a lo largo del tiempo.

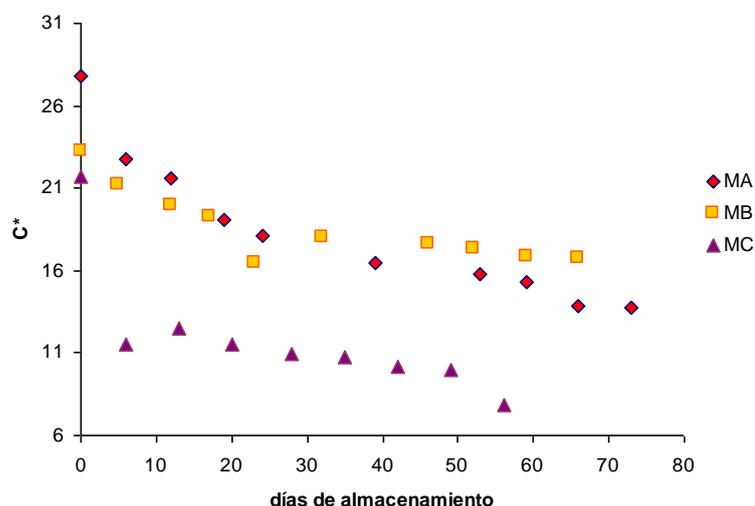


Figura VIII.29 – Evolución del croma (C*) en las mermeladas *MA*, *MB* y *MC* a lo largo del tiempo de almacenamiento.

La figura VIII.30 muestra la evolución de la claridad (L*) en las mermeladas objeto de estudio. Los valores de claridad mostrados por las mismas, entre 20 y 30 unidades, indican que se trata de muestras oscuras. En la mermelada *MA* se produce un oscurecimiento a lo largo del tiempo de estudio de aproximadamente el 10% si bien el mismo tiene lugar, principalmente, en las primeras semanas de almacenamiento. A pesar de este descenso, el valor de L* al final del período de estudio es superior en *MA* que en *MB* y *MC*. Hay que especificar, que ya en la primera muestra tomada tras el procesado, la mermelada *MA* era notablemente menos oscura que las mermeladas

MB y *MC* sugiriendo la importancia ya en ese momento de la contribución al color de pigmentos distintos a los antocianos en estas últimas.

Destacan las modificaciones experimentadas por la mermelada *MC* en la cual se produce un drástico descenso en los valores de L^* durante los primeros días de estudio seguido de un periodo de estabilización y de, por último, una recuperación de los mismos de forma que al final del periodo de estudio, alcanza valores próximos a los que presenta la mermelada *MB*. Estas fases deben corresponder respectivamente a la caída inicial de antocianos y rápida formación asociada de nuevos pigmentos condensados, degradación de estos últimos y formación de nuevos pigmentos más complejos resultantes de su reestructuración.

Por el contrario, en la mermelada *MB* apenas se experimenta modificación en los valores de L^* (descenso del 3%), apuntando nuevamente a la estabilidad y contribución al color desde el principio de los nuevos pigmentos de estructura piranoantociano.

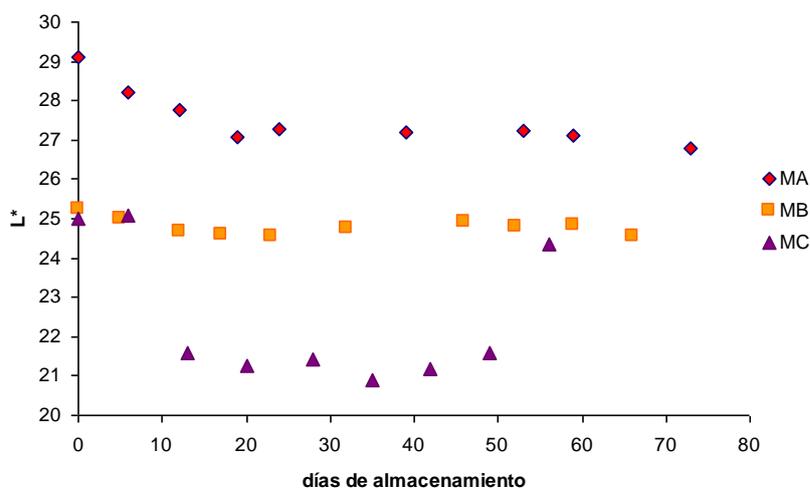


Figura VIII.30 – Evolución de la claridad (L^*) en las mermeladas *MA*, *MB* y *MC* a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Por último, es interesante destacar la modificación que se produce en el ángulo del tono (h) (figura VIII.31). En la primera muestra tomada tras la elaboración se observa que si bien las mermeladas *MA* y *MB* presentan el mismo valor para el ángulo del tono, la mermelada *MC* tiene ya un valor algo más bajo. Una vez más este hecho debe ser atribuido a la rápida velocidad de formación de los derivados formados por condensación mediada por acetaldehído con relación a la de los derivados del ácido pirúvico. A lo largo del almacenamiento, en la mermelada *MA* se produce un

aumento de dicho ángulo, lo que pone de manifiesto un desplazamiento hacia tonos más pardo-anaranjados. Por el contrario, en la mermelada *MC* se produce una fuerte disminución de *h* que se traduce en una tonalidad más rojo-azulada. Nuevamente se comprueba que la mermelada *MB* es la que menos modifica el ángulo del tono, únicamente 1 grado (frente a 12 grados en *MA* y 14 grados en *MC*). Este hecho, junto con lo ya comentado para los parámetros claridad y croma, pone de manifiesto que el color de la mermelada *MB* es el que se mantiene más estable a lo largo del estudio. Hay que recordar, no obstante, que aunque la tonalidad de esta mermelada se pueda considerar adecuada, ya que sus valores son durante todo el periodo de ensayo similares a los que presenta la mermelada convencional (*MA*) recién elaborada, los valores de *a**, de croma (*C**) y, sobre todo, de claridad (*L**) difieren sensiblemente de los de ésta, lo que hace que el color percibido en la mermelada *MB* no se corresponda realmente con el que cabría esperar para una mermelada de fresa recién elaborada. Como ya se ha señalado anteriormente, será, por tanto, necesario profundizar en estos estudios con el fin de conseguir conjugar la mayor estabilidad aportada por el ácido pirúvico con la obtención de un color adecuado, posiblemente a través de una dosificación ajustada combinada con otras operaciones más ‘respetuosas’ con el color esperable para los antocianos de la fresa.

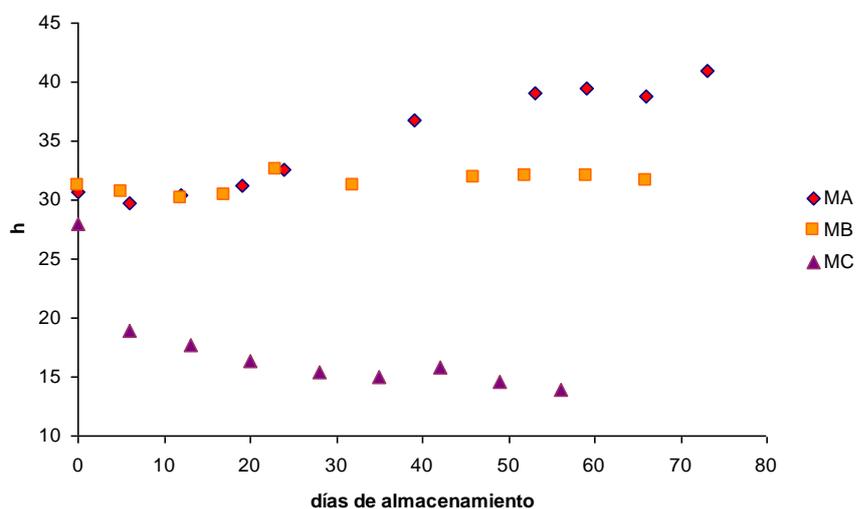


Figura VIII.31 – Evolución del ángulo del tono (*h*) en las mermeladas *MA*, *MB* y *MC* a lo largo del tiempo de almacenamiento.

4 – CONCLUSIONES

1. El perfil antociánico de la mermelada de fresa elaborada de manera convencional es similar al de fresas no procesadas, aunque varían ligeramente las proporciones entre los tres antocianos mayoritarios, en el sentido de poseer porcentajes relativamente mayores de pelargonidin 3-rutinósido (Pg 3-rut) e inferiores de los glucósidos de cianidina y de pelargonidina. En general, el Pg 3-rut se muestra como un antociano más estable que los otros dos frente al choque térmico y las condiciones de procesado, así como ante las reacciones que conducen a la pérdida de antocianos durante el almacenamiento. En todo caso, el pelargonidin 3-glucósido (Pg 3-gluc) continúa siendo el antociano ampliamente mayoritario en la mermelada y el que determina el color de la misma, al menos en las primeras etapas tras su elaboración.
2. En la mermelada se observa un comportamiento de los antocianos diferente al que muestran en disolución, al existir una velocidad de desaparición mucho más lenta y no detectarse cantidades significativas de ninguno de los productos de su degradación o transformación que eran encontrados en los sistemas modelo. Esta mayor estabilidad en la mermelada se atribuye a su menor contenido acuoso y a la presencia de azúcar, con la consecuente influencia sobre la actividad de agua del producto, así como a la existencia de otras sustancias que podrían estabilizar los antocianos vía procesos de copigmentación y eventualmente actuar como antioxidantes.
3. La desaparición progresiva de los antocianos en la mermelada no se acompaña de la formación de cantidades importantes de pigmentos que hayan podido ser detectados de manera específica en los análisis de HPLC. En general, los responsables del color en la mermelada envejecida parecen ser fundamentalmente pigmentos pardo-amarillentos, de naturaleza no establecida, que muestran una elución irregular y no aparecen en los cromatogramas como picos definidos, sin que se haya podido concluir sobre el grado de implicación de los antocianos en su formación. Curiosamente, el único nuevo pigmento definido importante que se detecta corresponde a un compuesto de tipo piranoantociano derivado de la reacción entre Pg 3-gluc y ácido pirúvico,

producto que no se había incorporado externamente, por lo que debe provenir de la fresa o haberse producido como resultado de la degradación de los azúcares.

4. La adición de ácido pirúvico a la mermelada durante su elaboración conduce a una rápida desaparición de antocianos, que se acompaña de la formación de nuevos pigmentos de estructura piranoantociano, con un color más anaranjado y mayor estabilidad que los antocianos originales. Este tipo de compuestos constituyen los pigmentos mayoritarios en la mermelada a partir de la segunda semana de almacenamiento y son los únicos importantes al final del periodo de estudio, siendo los principales responsables del color del producto.
5. La adición de acetaldehído a la mermelada produce también una pérdida muy rápida de antocianos, a la vez que se forma un conjunto de nuevos pigmentos de tonalidad más azulada que los antocianos originales. Entre ellos, pudieron ser identificados dos compuestos individuales resultantes de la condensación entre Pg 3-gluc y catequina mediada por acetaldehído. Este tipo de productos muestran poca estabilidad, debido a su tendencia a polimerizar y sufrir reorganizaciones estructurales, por lo que progresan dando lugar a la formación de mezclas complejas de pigmentos, de difícil separación cromatográfica, que no llegan a ser detectados como picos individuales. En esta mermelada se observa también la formación de ciertas cantidades de pigmentos de estructura piranoantociano, derivados de la reacción entre antocianos y ácido pirúvico (no añadido) o acetaldehído, aunque su influencia sobre el color final del producto parece escasa.
6. El análisis cromático en el espacio CIELAB revela la existencia de una importante modificación del color en la mermelada elaborada convencionalmente, que se manifiesta fundamentalmente como pérdida de color rojo, oscurecimiento y desplazamiento hacia tonos más pardo-anaranjados. La incorporación de ácido pirúvico durante la elaboración afecta inicialmente al color de la mermelada, en el sentido sobre todo de modificar sus valores de croma (C^*) y claridad (L^*), lo que hace que su color no se corresponda con el que cabría esperar para una mermelada de fresa recién elaborada. Sin embargo, el color de esta mermelada permanece mucho más estable durante el almacenamiento, de manera que al final de período del estudio los valores de sus parámetros e índices cromáticos denotan un pardeamiento inferior al de la mermelada de referencia y un color más

aceptable. La adición de acetaldehído, por el contrario, lleva a una profunda modificación inicial del color con una importante pérdida de color rojo y un acusado desplazamiento hacia tonalidades azuladas, totalmente impropio en una mermelada de fresa; asimismo, la evolución de los índices y parámetros CIELAB es irregular y distinta a la existente en las otras dos mermeladas.

7. De manera general, los cambios cromáticos producidos en las mermeladas se relacionan aceptablemente con las modificaciones observadas en la composición de su materia colorante.

IX

Conclusiones Generales

1.

El uso de condiciones de HPLC-DAD-MS optimizadas para este trabajo ha permitido detectar hasta 31 antocianos en distintas variedades de fresas [*cv. Camarosa, Carisma, Eris, Oso Grande y Tudnew*] y obtener datos para establecer con cierta seguridad la identidad de la mayoría de ellos, algunos no descritos hasta el momento. Los antocianos encontrados presentan mayoritariamente pelargonidina (Pg), como aglicón, aunque también se detectan algunos antocianos destacados derivados de cianidina (Cy), así como cantidades muy pequeñas de derivados de delphinidina y de malvidina. Estos antocianos presentan patrones de glicosilación diversos que incluyen mono- y disacáridos de hexosas y pentosas, acilados en algunos casos con los ácidos málico, malónico o acético. Entre los nuevos compuestos provisionalmente identificados se encuentran el 3-rutinósido de cianidina, un diglucósido de pelargonidina, un diglucósido de cianidina acilado con ácido malónico, dos disacáridos de pelargonidina acilados con ácido acético, cianidina malonilglucósido y pelargonidina acetilglucósido. Un aspecto de particular importancia ha sido la detección en la fresa de cuatro pigmentos condensados, cuya estructura contiene un derivado de pelargonidina unido directamente por un enlace C-C a un resto flavanol (catequina o afzelequina). Estos pigmentos presentan espectros con máximos de absorbancia en la región del visible desplazados batocrómicamente con relación a los correspondientes monómeros. La formación de este tipo de pigmentos se asociaba a reacciones que tenían lugar durante el procesado o conservación de alimentos y bebidas, pero hasta ahora no habían sido encontrados en fuentes naturales.

Cuantitativamente, los contenidos de antocianos en las muestras analizadas oscilan entre 200 – 600 mg.kg⁻¹, constituyendo pelargonidina 3-glucósido el 77-90% de los antocianos presentes, seguido por pelargonidina 3-rutinósido (6-11%) y cianidina 3-glucósido (3-10%). En su conjunto, estos tres compuestos representan más del 95% del total de antocianos en todas las variedades de fresa estudiadas. Existe una notable variabilidad en el contenido antociánico entre muestras de una misma variedad y año, poniendo de manifiesto una fuerte influencia del grado de madurez, factores edafo-climáticos de cultivo y condiciones de conservación *post*-recolección. Entre las estudiadas, *Tudnew* y *Camarosa* son las variedades más pigmentadas y las que presentan, junto con *Carisma*, un perfil cualitativo más diverso.

2.

El perfil flavanólico de la fresa se caracteriza por la presencia destacada de 3 compuestos. el monómero (+)-catequina, compuesto ampliamente mayoritario, y las procianidinas dímeras B3 (catequina-4,8-catequina) y B1 (epicatequina-4,8-catequina). Se encuentran también bien representados las procianidinas B6 (catequina-4,6-catequina) y B7 (epicatequina-4,6-catequina) y el trímero epicatequina-(4,8)-epicatequina-(4,8)-catequina. (-)-Epicatequina y oligómeros relacionados [básicamente las procianidinas B2 (EC-4,8-EC) y B4 (C-4,8-EC)] representan menos del 2% del total de flavanoles de la fresa. En proporciones muy bajas se detectan también algunas galocatequinas.

El perfil de composición flavanólica es similar en las cinco variedades consideradas, por lo que se puede considerar característico de la fresa. El contenido medio total de flavanoles en las muestras de fresas analizadas fue de 82,5 ± 19,3 mg.kg⁻¹, sin que se encontrara relación aparente entre la variedad y/o el año y la concentración de flavanoles.

3.

En disoluciones acuosas de pelargonidina 3-glucósido de pH similar al de la fresa (3,5) se produce una disminución progresiva en el contenido del antociano, que se ajusta a una cinética inicial aparente de primer orden, con una pendiente

influida por la composición del medio, aunque la bondad del ajuste a este modelo disminuye notablemente cuando las concentraciones de antociano son bajas. La desaparición del antociano se acompaña de la formación de nuevos compuestos y de un cambio en el color de las disoluciones, que, desde el rojo original, pasan progresivamente a adoptar tonalidades naranjas o pardo-anaranjadas, a la vez que se produce la acumulación paulatina de un sedimento pardo.

La velocidad con la que se producen los cambios en el color y la composición de las disoluciones están muy influidos por la composición del medio. La disponibilidad de oxígeno es, entre los ensayados, el factor con más influencia sobre la estabilidad del antociano, cuya velocidad de pérdida es considerablemente más lenta en condiciones anaerobias. La presencia de azúcares sólo parece ejercer un pequeño efecto protector frente las reacciones que conducen a la desaparición del antociano, mientras que, por el contrario, la presencia de flavanoles (catequina o procianidina B3) constituye un factor desestabilizante del mismo. Se debe indicar que en las condiciones de ensayo utilizadas, con concentraciones de antociano y de flavanoles del mismo orden a las que puede existir en la fresa, no se observa la existencia de un proceso de copigmentación, que normalmente se asocia a una mejora en la estabilidad de los antocianos y que requeriría el empleo de proporciones molares flavanol:antociano mucho más elevadas. Esta ausencia de copigmentación puede ser una de las razones por las que en las disoluciones estudiadas no llegue a producirse el esperado efecto de protección del antociano por parte de los flavanoles.

4.

Se han detectado al menos tres procesos que conducen a la desaparición de antociano y formación de nuevos compuestos en las disoluciones modelo: 1) degradación hidrolítica del antociano, 2) transformaciones sobre su estructura básica, y 3) reacciones de condensación/polimerización. Los dos primeros procesos dan lugar fundamentalmente a la formación de productos incoloros, mientras que en el último tipo de reacciones se pueden formar nuevos pigmentos, que podrían ser responsables del cambio de color que experimentan las disoluciones, que pasan desde el rojo inicial a una tonalidad naranja, proceso que se acompaña de la formación de un precipitado pardo. El proceso de ruptura hidrolítica apenas llega a observarse en ausencia de oxígeno, en la cual también están muy reducidas las

reacciones de polimerización. Igualmente la degradación hidrolítica del antociano ocurre de forma muy limitada en presencia de flavanoles, donde predominan los procesos de condensación.

Como productos de la degradación hidrolítica de pelargonidina 3-glucósido se han identificado 2,4,6-trihidroxibenzaldehído y ácido 4-hidroxibenzoico, resultantes respectivamente de los fragmentos correspondientes a los anillos A y B del antociano liberados tras la ruptura del heterociclo. Igualmente, se pudo detectar la formación de pelargonidina en las disoluciones, apuntando a que la separación del azúcar y liberación del aglicón inestable constituye un paso previo en su proceso de degradación.

Entre los posibles derivados de la transformación estructural del antociano, el principal compuesto detectado corresponde a una sustancia incolora que no pudo ser definitivamente identificada. Su formación mayoritaria en las disoluciones mantenidas en ausencia de oxígeno sugiere que podría tratarse de un producto de la reducción del antociano, por lo que de acuerdo con sus características de masas se ha especulado para el mismo una estructura no glicosilada de tipo flaveno. Además, se ha detectado la formación adicional de una serie de productos que podrían derivar de la reacción entre el antociano y sustancias de baja masa molecular, procedentes de la degradación del propio antociano y/o del ácido cítrico, así como otro producto cuya estructura parece corresponder a la de un dímero formado por la condensación de dos unidades del antociano.

En ausencia de flavanoles, los principales pigmentos cuya formación se detecta en las disoluciones corresponden a sustancias aparentemente inestables, con máximos de absorbancia en la región del visible en el intervalo 330-460 nm, que evolucionan hacia la producción de polímeros que acaban por precipitar. No se ha podido concluir sobre la naturaleza de estas sustancias, si bien se supone que las mismas deben derivar de la oxidación/condensación del antociano y/o de sus productos de degradación.

En las disoluciones que contienen flavanoles (catequina o procianidina B3), se observa también la formación de nuevas sustancias incoloras y pigmentos con máximos de absorbancia en la región del visible entre 425 y 450 nm, con estructuras derivadas de reacciones de los flavanoles entre sí y/o con el antociano. Entre las nuevas sustancias incoloras se ha detectado un posible producto de la condensación directa entre el antociano y catequina con una estructura similar a la

de las proantocianidinas de tipo A y otros dos derivados de la condensación del antociano con un carbocación flavánico liberado tras la hidrólisis de procianidina B3. Para los nuevos pigmentos detectados se proponen estructuras de tipo sal de xantilio, resultantes de la reorganización oxidativa de intermediarios incoloros también derivados de la condensación directa entre el antociano y catequina o procianidina B3.

5.

Al igual que ocurría en las disoluciones modelo, durante el almacenamiento de la mermelada se produce una degradación progresiva de los antocianos, que se acompaña de un cambio de color desde el rojo original hacía un pardo-anaranjado. No obstante, el comportamiento de los antocianos en las mermeladas difiere del observado en disolución, al existir una velocidad de desaparición mucho más lenta y no detectarse cantidades significativas de los productos de su degradación o transformación que eran encontrados en los sistemas modelo. Esta mayor estabilidad de los antocianos en la mermelada se atribuye a su menor contenido acuoso y a la presencia de azúcar, con la consecuente influencia sobre la actividad de agua del producto, así como a la existencia de otras sustancias que podrían estabilizar los antocianos vía procesos de copigmentación y eventualmente actuar como antioxidantes. Los responsables del color final en la mermelada envejecida son fundamentalmente pigmentos pardo-amarillentos, de naturaleza no establecida, para los que no se ha podido concluir sobre el grado de implicación de los antocianos en su formación, en la cual podrían también intervenir otros componentes de la mermelada, incluyendo azúcares y compuestos fenólicos diversos. Igualmente, tampoco se pudo llegar a detectar la presencia de pigmentos de condensación antociano-flavanol similares a los encontrados en los sistemas modelo previamente estudiados. El único nuevo pigmento definido importante detectado corresponde a un compuesto de tipo piranoantociano derivado de la reacción entre pelargonidina 3-glucósido y ácido pirúvico, producto que no se había incorporado externamente, por lo que debe provenir de la fresa o haberse producido como resultado de la degradación de los azúcares.

6.

La incorporación de ácido pirúvico o de acetaldehído durante el proceso de elaboración de la mermelada provoca una desaparición acelerada de los antocianos, que se acompaña de la formación de nuevos pigmentos y que modifica notablemente el color del producto. El ácido pirúvico induce la rápida formación de pigmentos de estructura piranoantociano, con un color más anaranjado y mayor estabilidad que los antocianos originales, mientras que la de acetaldehído da lugar a pigmentos de condensación con flavanoles, con tonalidad más azulada que los antocianos y baja estabilidad, que progresan hacia estructuras complejas de difícil separación cromatográfica.

El análisis cromático en el espacio CIELAB pone de manifiesto que la adición de ácido pirúvico conduce a un producto con un color percibido menos luminoso y más anaranjado e intenso que el de la mermelada elaborada convencionalmente, de modo que podría desde un principio asociarse a una mermelada de fresa ligeramente envejecida y no con una recién elaborada. Ese color, sin embargo, se modifica poco en el curso del almacenamiento, de modo que al final del período de estudio considerado (3 meses) resulta más aceptable que el de la mermelada convencional, que sufre un notable oscurecimiento y desplazamiento del color hacia tonos pardo-anaranjados.

Por su parte, la adición de acetaldehído lleva a una profunda modificación del color, con un claro desplazamiento del color hacia tonalidades azuladas desde un principio que se hace más acusado a lo largo del almacenamiento, de modo que resulta totalmente impropio para una mermelada de fresa en cualquiera de las etapas del estudio.

Referencias

Abers J E, Wrolstad R E (1979) Causative factors of color deterioration in strawberry preserves during processing and storage. *Journal of Food Science* **44** 75-78, 81.

Albersheim D J, Nevins D J, English P D (1967) A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas liquid chromatography. *Carbohydrate Research* **5** 340-345.

Alcalde-Eon C (2002) *Análisis de antocianos en tubérculos andinos*. Tesina de licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. España.

Alcalde-Eon C, Escribano-Bailón M T, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo J C (2004) Separation of pyranoanthocyanins from red wine by column chromatography. *Analytica Chimica Acta* **513**, 305-318.

Alonso E, Bourzeix M, Revilla E (1991) Suitability of water/ethanol mixtures for the extraction of catechins and proanthocyanidins from *Vitis vinifera* seeds contained in a winery by products. *Seed Sci Technol* **19** 545-552.

Amiot M J, Tacchini M, Aubert S Y, Oleszek W (1995) Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43** 1132-1137.

Andersen Ø M (2000) How easy is it nowadays to analyse anthocyanins? *Polyphenols 2000* Technische Universität München. Freising-Weihenstephan, Deutschland. (Martens S, Treutter D, and Forkmann G, Eds). pp 49-59.

Andersen Ø M, Fossen T, Torskangerpoll K, Fossen A, Hauge U (2004) Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin. *Phytochemistry* **65** 405-410.

Andrade P, Carvalho A, Seabra R, Ferreira M (1998) A previous study of phenolic profiles of quince, pear, and apple purees by HPLC with diode array detection for the evaluation of quince puree genuineness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46** 968-972.

Artés F, Castañer M, Gil M I (1998) Revisión: El pardeamiento enzimático en frutas y hortalizas mínimamente procesadas. *Food Science and Technology International* **4** 377-389.

Arts I C, van de Putte B, Hollman P C (2000) Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48** 1746-1751.

Atanasova V, Fulcrand H, Le Guernevé C, Cheynier V, Moutounet M (2002) Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Letters* **43** 6151-6153.

Bakker J, Bridle P (1992a) Strawberry juice colour: the effect of sulphur dioxide and EDTA on the stability of anthocyanins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **60** 477-481.

Bakker J, Bridle P, Koopman A (1992b) Strawberry juice color: the effect of some processing variables on the stability of anthocyanins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **60** 471-476.

Bakker J, Piccineli A, Bridle P (1993) Model wine solutions: colour and composition changes during ageing. *Vitis* **32**, 111-118.

Bakker J, Bridle P, Bellworthy S J (1994) Strawberry juice colour: a study of the quantitative and qualitative pigment composition of juices from 39 genotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **64** 31-37.

Bakker J, Bridle P, Honda T, Kuwano H, Saito N, Terahara N, Timberlake C F (1997) Identification of an anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochemistry* **44** 1375-1382.

Bakker J, Timberlake C F (1997) Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** 35-43.

Bate-Smith E C (1977) Astringent tannins of *Acer* species. *Phytochemistry* **16** 1421-1426.

Baublis A, Spomer A, Berber-Jimenez M D (1994) Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *Journal of Food Science* **59** 1219-1221, 1233.

Belitz H D, Grosch W (1997) *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza. pp 870-873.

Benzie I F F, Szeto Y T (1999) Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** 633-636.

Berké B, Cheze C, Vercauteren J, Deffieux G (1998) Bisulphite addition to anthocyanins - revised structures of colourless adducts. *Tetrahedron Letters* **39** 5771-5774.

Bishop P D, Nagel C W (1984) Characterization of the condensation product of malvidin 3,5-diglucoside and catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **32** 1022-1026.

Botha J J, Ferreira D, Roux D G (1978) Condensed tannins: direct synthesis, structure, and absolute configuration of four biflavonoids from Black Wattle Bark ('Mimosa') extract. *J Chem Soc Chem Comm* **700** (cit. de Freitas, 1995).

Botha J J, Viviers P M, Yong D A, Du Perez I C, Ferreira D, Roux D G, Hull W E (1982) Synthesis of condensed tannins. Part 5. The first angular [4,6:4,8]-triflavonoids and their natural counterparts. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* 527-533 (cit. de Freitas, 1995)..

Boukharta M, Girardin M, Metche M (1988) Procyanidines galloilés du sarment de vigne (*Vitis vinifera*). Séparation et identification par CLHP et chromatographie en phase gazeuse. *Journal of Chromatography* **455** 406-409.

Bourzeix M, Heredia N, Estrella M I (1982) Le dosage des anthocyanes des vins. *Sci Alim* **2** (71), 82.

- Boyles M J, Wrolstad R E (1993) Anthocyanin composition of red raspberry juice: influence of cultivar, processing and environmental factors. *Journal of Food Science* **58** 1136-1141.
- Bridle P, García-Viguera C (1997) Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. *Food Chemistry* **59** 299-304.
- Bridle P, Timberlake C F (1997) Anthocyanins as natural food colours - selected aspects. *Food Chemistry* **58** 103-109.
- Britton G (1983) *The biochemistry of natural pigments*. Cambridge University Press, Cambridge (cit. Brouillard *et al.*, 1997).
- Broadhurst R B, Jones W T (1978) Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **29** 788-794.
- Brouillard R (1982) Chemical structure of anthocyanins. En. *Anthocyanins as Food Colors*. Ch. 2. Pericles Markakis (ed). Academic Press, pp 1-40.
- Brouillard R, Iacobucci G A, Sweeny J G (1982) Chemistry of anthocyanin pigments. 9. UV-visible spectrophotometric determination of the acidity constants of apigeninidin and three related 3-deoxyflavylium salts. *Journal of the American Chemical Society* **104** 7585-7590.
- Brouillard, R, Wigand M C, Dangles O, Cheminat A (1991) pH and solvent effects on the copigmentation reaction of by malvidin by polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 2135-2141.
- Brouillard R, Figueiredo P, Elhabiri M, Dangles O (1997) Molecular interactions of phenolic compounds in relation to the colour of fruit and vegetables. En *Phytochemistry of Fruit and Vegetables* Tomás-Barberán F A, Robins R J (eds). Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Clarendon Press, Oxford. pp 29-49.
- Buldini P L, Ricci L, Lal Sharma J (2002) Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. *Journal of Chromatography A* **975** 47-70.
- Cabrita L, Fossen T, Andersen O M (2000) Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry* **68** 101-107.
- Cacace J E, Mazza G (2002) Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** 5939-5946.
- Calvi J P, Francis F J (1978) Stability of *Concord* grape (*V. labrusca*) anthocyanins in model systems. *Journal of Food Science* **43** 1448-1456.
- Cano M P, Hernández A, de Ancos B (1997) High pressure and temperature effect on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *Journal of Food Science* **62** 85-88.
- Castro I, Gonçalves O, Teixeira J A, Vicente A A (2002) Comparative study of *Selva* and *Camarosa* strawberries for the commercial market. *Journal of Food Science* **67** 2132-2137.
- Cemeroglu B, Velioglu S, Isik S (1994) Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *Journal of Food Science* **59** 1216-1218.
- Chang W C, Hsu F L (1989) Inhibition of platelet aggregation and arachidonate metabolism on platelets by procyanidins. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **38** 181-188.
- Cheyrier V, Osse C, Rigaud J (1988) Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions. *Journal of Food Science* **53** 1729-1732.

- Cheyrier V, Ricardo-da-Silva J M R (1991) Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing trans-caffeoyltartaric acid and polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**, 1047-1050.
- Ciolfi G (1986) Acetaldehyde during the storage of quiet red and white wines. *Riv Vitiv Enol* **39** 12-17.
- Clifford M N (2000) Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80** 1063-1072.
- Clydesdale F M, Main J H, Francis F J, Damon JR R A (1978) Concord grape pigments as colorants for beverages and gelatin desserts. *Journal of Food Science* **43** 1687-1692, 1697.
- Co H, Markakis P (1968) Flavonoid compounds in the strawberry fruit. *Journal of Food Science* **33** 281-283 (cit. Zafrilla, 1999).
- Cooper-Driver G A (2001) Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry* **56** 229-236.
- Creasy L L, Swain T (1965) Structure of condensed tannins. *Nature* **208** (5006), 151-153.
- Dangles O, Saito N, Brouillard R (1993) Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry* **34** 119-124.
- de Ancos B, Cano M P, Hernandez A, Monreal M (1999a) Effects of microwave heating on pigment composition and colour of fruit purees. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79** 663-670.
- de Ancos B, Gonzalez E, Cano M P (1999b) Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung A-Food Research and Technology* **208** 33-38.
- de Freitas V (1995) Recherches sur les tanins condensés: Application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin. These. Université de Bordeaux II. France.
- de Freitas V, Glories Y, Laguerre N (1998) Incidence of molecular structure in oxidation of grape seeds procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46** 376-382.
- de Gaulejac N, Provost C, Vivas N (1999) Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** 425-431.
- de Pascual-Teresa S, Gutiérrez-Fernández Y, Rivas-Gonzalo J C, Santos-Buelga C (1998a) Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from unripe almond fruits. *Phytochemical Analysis* **9** 21-27.
- de Pascual-Teresa S, Treutter D, Rivas-Gonzalo J C, Santos-Buelga C (1998b) Analysis of flavanols in beverages by high-performance liquid chromatography with chemical reaction detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46** 4209-4213.
- de Pascual-Teresa S (1999) *Análisis de taninos condensados en alimentos*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. España.
- de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo J C (2000) Quantitative analysis of flavan-3-ols in spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48** 5331-5337.
- Debicki J P, Lovric T, Trinajstic T, Sabljic A (1983) Anthocyanin degradation in the presence of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *Journal of Food Science* **48** 411-416.

- Delcour J A, de Varebeke D J (1985) A new colourimetric assay for flavanoids in pilsner beers. *J Inst Brew* **91** 37-40.
- Delgado-Vargas F, Jimenez A R, Paredes-López O (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **40** 231-250.
- Dervisi P, Lamb J, Zabetakis I (2001) High pressure processing in jam manufacture: effects on textural and colour properties. *Food Chemistry* **73** (1), 85-91.
- Deshpande S S, Cheryan M, Salunkhe D K (1986) Tannin analysis of food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **24** 401-449.
- Elhabiri M, Figueiredo P, Toki K, Saito N, Brouillard R (1997) Anthocyanin-aluminium and gallium complexes in aqueous solutions. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 353-362.
- Erlanson J A, Wrolstad R E (1972) Degradation of anthocyanins at limited water concentration. *Journal of Food Science* **37** 592-595.
- Escribano-Bailón M T, Gutiérrez-Fernández Y, Rivas-Gonzalo J C, Santos-Buelga C (1992) Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del País grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **16** 79-82.
- Escribano-Bailón M T (1993) *Estudio de la composición flavanica de la semilla de uva*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. España.
- Escribano-Bailón M T, Dangles O, Brouillard R (1996) Coupling reactions between flavylum ions and catechin. *Phytochemistry* **41** 1583-1592.
- Escribano-Bailón M T, Santos-Buelga C, Francia-Aricha E M, Rivas-Gonzalo J C, Heredia, F J (1999) Flavanol-anthocyanin copigmentation and colour quality. En, *Pigments in Food Technology. Proceedings of the 1st Internacional Congreso PFT* 24-26 Marzo 1999, Sevilla (España). (MI Mínguez-Mosquera, M. Jarén-Galán, D. Hornero-Méndez, eds.), pp 363-367.
- Escribano-Bailón M T, Álvarez-García M, Rivas-Gonzalo J C, Heredia F J, Santos-Buelga C (2001) Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde-mediated condensation between malvidin 3-O-glucoside and (+)-catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** 1213-1217.
- Es-Safi N-E, Fulcrand H, Cheynier V, Moutounet M, Hmamouchi M, Essassi E M (1996) Kinetic studies of acetaldehyde-induced condensation of flavan 3-ols and malvidin 3-glucoside in model. En *Polyphénols communications*. Bordeaux, France (Vercauteren J, Chèze C, Dumon M C, Weber J F, eds). Groupe Polyphénols. Vol 2, pp 279-280.
- Es-Safi N-E, Fulcrand H, Cheynier V, Moutounet M (1999a) Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde-induced polymerization of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** 2088-2095.
- Es-Safi N-E, Fulcrand H, Cheynier V, Moutounet M (1999b) Studies on the acetaldehyde-induced condensation of (-)-epicatechin and malvidin 3-O-glucoside in a model solution system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** 2096-2102.
- Es-Safi N-E, Le Guernevé C, Cheynier V, Moutounet M (1999c) New polyphenolic compounds with xanthylum skeletons formed through reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** 5211-5217.
- Es-Safi N-E, Cheynier V, Moutounet M (2000a) Study of the reactions between catechin and furfural derivatives in the presence or absence of anthocyanins and their implication in food color change. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48** 5946-5954.

- Es-Safi N-E, Le Guernevé C, Cheynier V, Moutounet M (2000b) New phenolic compounds obtained by evolution of (+)-catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic medium. *Tetrahedron Letters* **41** 1917-1921.
- Es-Safi N-E, Cheynier V, Moutounet M (2002a) Role of aldehydic derivatives in the condensation of phenolic compounds with emphasis on the sensorial properties of fruit-derived foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** 5571-5585.
- Es-Safi N-E, Cheynier V, Moutounet M (2002b) Interactions between cyanidin 3-O-glucoside and furfural derivatives and their impact on food color changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** 5586-5595.
- Es-Safi N-E, Le Guernevé C, Cheynier V, Moutounet M (2002c) 2D NMR analysis for unambiguous structural elucidation of phenolic compounds formed through reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid. *Magnetic Resonance in Chemistry* **40** 693-704.
- Es-Safi N-E, Cheynier V, Moutounet M (2003) Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *Journal of Food Composition and Analysis* **16** 535-553.
- Festa F, Aglitti T, Duranti G, Ricordy R, Perticone P, Cozzi R (2001) Strong antioxidant activity of ellagic acid in mammalian cells in vitro revealed by the comet assay. *Anticancer Research* **21** 3903-3908.
- Figueiredo P, Elhabiri M, Toki K, Saito N, Dangles O, Brouillard R (1996) New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss? *Phytochemistry* **41** 301-308.
- Fiorini M (1995) Preparative high-performance liquid chromatography for the purification of natural anthocyanins. *Journal of Chromatography A* **692** 213-219.
- Flamini R (2003) Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: polyphenols. *Mass Spectrometry Reviews* **22** 218-250.
- Foo L, Karchesy J J (1989) Procyanidin polymers of Douglas fir bark: structure from degradation with phloroglucinol. *Phytochemistry* **28** 3185-3190.
- Fossen T, Cabrita L, Andersen Ø M (1998) Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry* **63** 435-440.
- Fossen T, Rayyan S, Andersen Ø M (2004) Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. *Phytochemistry* **65** 1421-1428.
- Francia-Aricha E M, Guerra M T, Rivas-Gonzalo J C, Santos-Buelga C (1997) New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** 2262-2266.
- Francia-Aricha E M, Rivas-Gonzalo J C, Santos-Buelga C (1998) Effect of malvidin-3-monoglucoside on the browning of monomeric and dimeric flavanols. *European Food Research and Technology* 223-228.
- Francis F J (1982) Analysis of anthocyanins. En *Anthocyanins as Food Colors*. Ch. 7. Pericles Markakis (ed). Academic Press, pp 189.
- Franke A A, Custer L J, Arakaki C, Murphy S P (2004) Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis* **17** 1-35.
- Frankel E N, Kanner J, German J B, Parks E, Kinsella J E (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **341** 454-456.

- Friedrich W, Eberhardt A, Galensa R (2000) Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. *European Food Research and Technology* **211** 56-64.
- Fulcrand H, Cameira-dos-Santos P J, Sarni-Manchado P, Cheynier V, Fabre-Bonvin J (1996) Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* 735-739.
- Fulcrand H, Cheynier V, Oszmianski J, Moutounet M (1997) An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation. *Phytochemistry* **46** 223-227.
- Fulcrand H, Benabdeljalil C, Rigaud J, Cheynier V, Moutounet M (1998) A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry* **47** 1401-1407.
- Furtado P, Figueiredo P, Chaves-das-Neves H, Pina F (1993) Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry* **75** 113-118.
- Gali H U, Perchellet E M, Gao X M, Karchesy J J (1994) Comparison of the inhibitory effects of monomeric, dimeric and trimeric procyanidins on the biochemical markers of skin tumor promotion in mouse epidermis *in vivo*. *Plant Medica* **60** 239.
- García-Alonso, F J, Periago M J, Vidal-Guevara M L, Cantos E, Ros G, Ferreres F, Abellán P (2003) Assessment of the antioxidant properties during storage of a dessert made from grape, cherry, and berries. *Journal of Food Science* **68** 1525-1530.
- García-Viguera C, Tomás-Barberán F A, Ferreres F, Artés F, Tomás-Lorente F (1993) Determination of citrus jams genuineness by flavonoid analysis. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* **197** 255-259.
- García-Viguera C, Bridle P, Bakker J (1994) The effect of pH on the formation of coloured compounds in model solutions containing anthocyanins, catechin and acetaldehyde. *Vitis* **33**, 37-40.
- García-Viguera C, Zafrilla P, Tomás-Barberán F A (1995) Changes in colour of strawberry jams during processing. *Current Trends in Fruit and Vegetables Phytochemistry* **41** 13-21.
- García-Viguera C, Zafrilla P, Tomás-Barberán F A (1997) Determination of authenticity of fruit jams by HPLC analysis of anthocyanins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **73** 207-213.
- García-Viguera C, Zafrilla P, Artés F., Romero F, Abellán P, Tomás-Barberán F A (1998a) Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **78** 565-573.
- García-Viguera C, Zafrilla P, Tomás-Barberán F A (1998b) The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochemical Analysis* **9** 274-277.
- García-Viguera C, Bridle P (1999a) Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. *Food Chemistry* **64** 21-26.
- García-Viguera C, Zafrilla P, Romero F, Abellán P, Artés F, Tomás-Barberán F A (1999b) Color stability of strawberry jam as affected by *cultivar* and storage temperature. *Journal of Food Science* **64** 243-247.
- García-Viguera C, Zafrilla P, Tomás-Barberán F A (1999c) Influence of processing and storage conditions in strawberry jam color. *Food Science Technology International* **5** 487-492.

Garzón G A, Wrolstad R E (2001) The stability of pelargonidin-based anthocyanins at varying water activity. *Food Chemistry* **75** 185-196.

Garzón G A, Wrolstad R E (2002) Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate. *Journal of Food Science* **67** 1288-1299.

Geissman T A, Yoshimura N N (1966) Synthetic proanthocyanidin. *Tetrahedron Letters* **24** 2669-2673.

Gil M I, Holcroft D M, Kader A A (1997) Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** 1662-1667.

Giusti M M, Wrolstad R E (1996a) Characterization of red radish anthocyanins. *Journal of Food Science* **61** 322-326.

Giusti M M, Wrolstad R E (1996b) Radish anthocyanin extract as a natural red colorant for maraschino cherries. *Journal of Food Science* **61** 688-694.

Giusti M M (2002) Applications of acylated anthocyanins as natural food colourants *Business Briefing: Innovative Food Ingredients 2002*, 1-5.

Giusti M M, Ghanadan H, Wrolstad R E (1998a) Elucidation of the structure and conformation of red radish (*Raphanus sativus*) anthocyanins using one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46** 4858-4863.

Giusti M M, Rodriguez-Saona L E, Baggett J R, Reed G L, Durst R W, Wrolstad R E (1998b) Anthocyanin pigment composition of red radish cultivars as potential food colorants. *Journal of Food Science* **63** 219-224.

Giusti M M, Rodríguez-Saona L E, Griffin D, Wrolstad R E (1999a) Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** 4657-4664.

Giusti M M, Rodríguez-Saona L E, Wrolstad R E (1999b) Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** 4631-4637.

Glories Y (1984) La couleur des vins rouges. 2^{ème} partie. Mesure, origine et interpretation. *Conn Vigne Vin* **18** 253-271.

Goiffon J-P, Mouly P P, Gaydou E M (1999) Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **382** 39-50.

Graham H D (1992) Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 801-805.

Grigelmo-Miguel N, Martín-Belloso O (1999) Influence of fruit dietary fibre addition on physical and sensorial properties of strawberry jams. *Journal of Food Engineering* **41** 13-21.

Guyot S, Cheynier V, Souquet J-M, Moutounet M (1995) Influence of pH on the enzymatic oxidation of (+)-catechin in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43** 2458-2462.

Guyot S, Vercauteren J, Cheynier V (1996) Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* **42** 1279-1288.

Hagerman A E, Butler L G (1991) Tannins and lignins. En *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*. (Rosenthal G A, Berenbam M R, eds). Academic Press, pp 355-388.

Häkkinen S H, Kärenlampi S O, Heinonen I M, Mykkänen H M, Törrönen A R (1998) HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77** 543-551.

Häkkinen S H, Kärenlampi S O, Mykkänen H M, Heinonen I M, Törrönen A R (2000a) Ellagic acid content in berries: influence of domestic processing and storage. *European Food Research and Technology* **212** 75-80.

Häkkinen S H, Kärenlampi S O, Mykkänen H M, Törrönen A R (2000b) Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48** 2960-2965.

Häkkinen S H, Törrönen A R (2000c) Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International* **33** 517-524.

Hanefeld M, Herrmann K (1976) Über das vorkommen von proanthocyanidinen, leucoanthocyanidinen und catechinen im gemüse (On the occurrence of proanthocyanidins, leucoanthocyanidins and catechins in vegetables). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* **161** 243-248.

Harborne J B, Grayer R J (1988) The anthocyanins. En *The flavonoids - advances in research since 1980*. Ch. 1. Harborne J B (ed), 1st ed. Chapman & Hall, London. pp 1-20.

Harborne J B (1989) General Procedures and Measurement of Total Phenolics. En *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 1. Plant Phenolics. Harborne J B (ed). Academic Press, pp 2-8.

Haslam E (1980) *In vino veritas*: Oligomeric procyanidins and the aging of red wines. *Phytochemistry* **19** 2577-2582.

Haslam E (1989) *Plant polyphenols. Vegetable tannins revisited*. Cambridge University Press, 230 pp.

Haslam E (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug: possible modes of action *Journal of Natural Products* **59** 205-215.

Hebrero E, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo J C (1988) High performance liquid chromatography-diode array spectroscopy identification of anthocyanins of *Vitis vinifera* variety Tempranillo. *American Journal of Enology and Viticulture* **39** 227-233.

Heim, K E, Tagliaferro A R, Bobilya D J (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13** 572-584.

Heinonen I M, Lehtonen P J, Hopia A I (1998a) Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46** 25-31.

Heinonen I M, Meyer A S, Frankel E N (1998b) Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46** 4107-4112.

Hemingway R W (1989) *The natural products of woody plants I*. Springer, Berlin, 571 pp (cit. Porter, 1994).

Henry B S (1996) Natural Food Colours. En *Natural Food Colorants*. Hendry G A F, Houghton J D (eds). 2nd ed. Blackie Academic & Profesional, Chapman & Hall, London, pp 40-57.

- Hillis W E, Urbach G (1959) The reaction of (+)-catechin with formaldehyde. *Journal of Applied Chemistry* **9** 474-482.
- Hilt P, Schieber A, Yildirim C, Arnold G, Klaiber I, Conrad J, Beifuss U, Carle R (2003) Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** 2896-2899.
- Holcroft D M, Kader A A (1999) Controlled atmosphere-induced changes in pH and organic acid metabolism may affect color of stored strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* **17** 19-32.
- Hong V, Wrolstad R E (1990a) Characterization of anthocyanin-containing colorants in fruit juices by HPLC/photodiode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38** 698-707.
- Hong V, Wrolstad R E (1990b) Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38** 708-715.
- Hrazdina G (1970) Oxidation of the anthocyanidin 3,5-diglucosides with H₂O₂. The structure of malvone. *Phytochemistry* **9** 1647-1652.
- Hrazdina G (1972) Sodium borohydride reduction of anthocyanidins. *Phytochemistry* **11** 3491-3496.
- Hrazdina G (1982) Anthocyanins. En *The flavonoids - advances in research*. Harborne J, Mabry T (eds). Chapman & Hall, London, pp 135-188.
- Hvattum E (2002) Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **16** 655-662.
- IUPAC (1979) *Nomenclature of organic chemistry*. Pergamon, Oxford.
- Iversen C K (1999) Black currant nectar: Effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. *Journal of Food Science* **64** 37-41.
- Iwashina T (2000) The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research* **113** 287-299.
- Jackman R L, Smith J L (1996) Anthocyanins and betalains. En *Natural Food Colorants*. Hendry G A F, Houghton J D (eds), 2nd ed. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, pp 244-280.
- Jerumanis J (1985) Quantitative analysis of flavonoids in barley, hops and beer by high-performance liquid chromatography. *J Inst Brew* **91** 250-252.
- Jurd L (1967) Catechin flavylum salt condensation reactions. *Tetrahedron* **23**, 1057-1064.
- Jurd L (1969) Review of polyphenol condensation reactions and their possible occurrence in the aging of wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **20** 191-195.
- Jurd L, Waiss Jr A C (1965) Anthocyanins and related compounds - VI: Flavylum salt - phloroglucinol condensation products. *Tetrahedron* **21** 1471-1483.
- Kader A A (1992) Quality and safety factors: definition and evaluation for fresh horticultural crops. En Kader A A (ed), University of California. Division of Agriculture and Natural Resources (cit. Zafrilla, 1999).

Kader F, Haluk J P, Nicolas J-P, Metche M (1998) Degradation of cyanidin 3-glucoside by blueberry polyphenol oxidase - kinetic studies and mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46** 3060-3065.

Kader F, Nicolas J-P, Metche M (1999) Degradation of pelargonidin 3-glucoside in the presence of chlorogenic acid and blueberry polyphenol oxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79** 519-522.

Kader F, Irmouli M, Nicolas J-P, Metche M (2001) Proposed mechanism for the degradation of pelargonidin 3-glucoside by caffeic acid O-quinone. *Food Chemistry* **75** 139-144.

Kader F, Irmouli M, Nicolas J-P, Metche M (2002) Involvement of blueberry peroxidase in the mechanisms of anthocyanin degradation in blueberry juice. *Journal of Food Science* **67** 910-915.

Kahkonen M P, Hopia A I C M (2001) Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** 4076-4082.

Kallio H, Hakala M, Pelkkikangas A-M, Lapveteläinen A (2000) Sugars and acids of strawberry varieties. *European Food Research and Technology* **212** 81-85.

Kallio H, Pallasaho S, Kärppä J, Linko R R (1986) Comparison of the half-lives of the anthocyanins in the juice of crowberry, *Emptum nigrum*. *Journal of Food Science* **51** 408-410, 430.

Kallithraka S, García-Viguera C, Bridle P, Bakker J (1995) Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochemical Analysis* **6** 265-267.

Kashiwada Y, Morita M, Nonaka G, Nishioka Y (1990) Tannins and related compounds XCI. Isolation and characterization of proanthocyanidins with an intramolecular doubly-linked unit from the fern, *Dicranopteris pedata* houtt. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **38** 856-860.

Kiatgrajai P, Wellons J D, Gollob L, White J D (1982) Kinetics of epimerization of (+)-catechin and its rearrangement to catechinic acid. *J Org Chem* **47**, 2910-2912.

Kim D H, Jung E A, Sihng I S, Han J A, Kim T H, Han M J (1998) Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Archives of Pharmacal Research* **21** 17-23.

King G A, Sweeny J C, Radford T, Iacobucci G A (1979) The ascorbic acid/O₂ degradation of anthocyanidins. *Bulletin Liaison Groupe Polyphenols* **9** 121-128.

Kinsella J E, Frankel E, German B, Kanner J (1993) Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology* **47** 85-89.

Kosar M, Kafkas E, Paydas S, Can-Baser K H (2004) Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52** 1586-1589.

Kraemer-Schafhalter A, Fuchs H, Pfannhauser W (1998) Solid-phase extraction (SPE) - a comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* var Nero. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **78** 435-440.

Labuza T P, Riboh D (1982) Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods. *Food Technology* **36** (10), 66.

Lea A G H, Bridle P, Timberlake C F, Singleton V L (1979) The procyanidins of wine grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **30**, 289-300.

Liao H, Cai Y, Haslam E (1992) Polyphenol interactions. Part 6. Anthocyanins: co-pigmentation and colour changes in red wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **59** (3), 299-305.

López-Serrano M, Barceló A R (1996) Purification and characterization of a basic peroxidase isoenzyme from strawberries. *Food Chemistry* **55** 133-137.

López-Serrano M, Barceló A R (1997) Kinetic properties of (+)-catechin oxidation by a basic peroxidase isoenzyme from strawberries. *Journal of Food Science* **62** 676-679, 723.

López-Serrano M, Barceló A R (1999) H₂O₂-mediated pigment decay in strawberry as a model system for studying color alterations in processed plant foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** 824-827.

López-Serrano M, Barceló A R (2002) Comparative study of the products of the peroxidase-catalyzed and the polyphenoloxidase-catalyzed (+)-catechin oxidation. Their possible implications in strawberry (*Fragaria x ananassa*) browning reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** 1218-1224.

Lukton A, Chichester C O, MacKiney G (1955) Characterization of a second pigment in strawberries. *Nature* **176** 790-791 (cit. Zafrilla, 1999).

Maas J L, Wang S Y, Galletta G J (1991) Evaluation of strawberry cultivars for ellagic acid content. *HortScience* **26** 66-68 (cit. Häkkinen y Törrönen, 2000).

Määttä K R, Kamal-Eldin A, Törrönen R (2003) High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization mass spectrometric (MS) detection: *Ribes* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** 6736-6744.

Maccarone E, Ferrigno V, Longo M L, Rapisarda P (1987) Effects of light on anthocyanins. Kinetics and photodegradation products in acidic aqueous solutions. *Annali di Chimica* **77** (5-6), 499-508.

Macheix J J, Fleuriet A, Billot J (1990) *Fruit Phenolics*. CRC Press, Inc, pp 113, 378.

Makkar H P S (1989) Protein precipitation methods for quantitation of tannins: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **37**, 1197-1202.

Malien-Aubert C, Dangles O, Amiot M J (2001) Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** 170-176.

Malien-Aubert C, Dangles O, Amiot M J (2002) Influence of procyanidins on the color stability of oenin solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** 3299-3305.

Markakis P (1982) Stability of Anthocyanins in Foods.. En *Anthocyanins as Food Colors*. Pericles Markakis (Ed). Academic Press, pp 163-181.

Markham K R (1982) *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press, pp 1, 36-39.

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

Masquelier J (1988) Effects physiologiques du vin. *Bulletin de l' OIV* **689-690**, 554-578.

Mateus N, de Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo J C, Santos-Buelga C, de Freitas V (2002) Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in Port wines. *Food Chemistry* **76** 335-342.

- Mateus N, Carvalho E, Carvalho A R F, Melo A, González-Paramás A M, Santos-Buelga C, Silva A M S, de Freitas V (2003a) Isolation and structural characterization of new acylated anthocyanin-vinyl-flavanol pigments occurring in aging red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** 277-282.
- Mateus N, Silva A M S, Rivas-Gonzalo J C, Santos-Buelga C, de Freitas V (2003b) A new class of blue anthocyanin-derived pigments isolated from red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 1919-1923.
- Mateus N, Oliveira J, Santos-Buelga C, Silva A M S, de Freitas V (2004) NMR structure characterization of a new vinylpyranoanthocyanin-catechin pigment (a portisin). *Tetrahedron Letters* **45** 3455-3457.
- Matthews S, Mila I, Scalbert A, Pollet B, Lapierre C, Hervé-du-Penhoat C L M, Rolando C, Donnelly D M X (1997) Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** 1195-1201.
- Mayr U, Treutter D, Santos-Buelga C, Bauer H, Feucht W (1995) Developmental changes in the phenols concentrations of *Golden delicious* apple fruits and leaves. *Phytochemistry* **38** 1151-1155.
- Mazza G, Brouillard R (1987) Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry* **25** 207-225 (cit. Kader *et al.*, 2002).
- Mazza G, Miniati E (1993) *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*. Mazza G (Ed). CRC, pp 1-3, 107-112.
- McEvily A J, Iyengar R (1992) Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **32** 253-273.
- Meyers K J, Watkins C B, Pritts M P, Hai-Liu R (2003) Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** 6887-6892.
- Ministerio de Sanidad y Consumo (1996a). Real Decreto 2001/1995 de 7 de diciembre. Aprobación de la lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. *Boletín Oficial del Estado*, n.º 19 del 22 de enero de 1996. pp 1884-1895.
- Ministerio de Sanidad y Consumo (1996b). Corrección de errores del Real Decreto 2001/1995 de 7 de diciembre, por el que se aprueba de la lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. *Boletín Oficial del Estado*, n.º 52 del 29 de febrero de 1996. pp 7950-7952.
- Mistry T J, Cai Y, Lilley T J, Haslam E (1991) Polyphenol interactions. Part 5. Anthocyanin copigmentation. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 1287-1296.
- Moncada M C, Moura S, Melo M J, Roque A, Lodeiro C, Pina F (2003) Complexation of aluminum (III) by anthocyanins and synthetic flavylium salts. A source for blue and purple color. *Inorganica Chimica Acta* **356** 51-61.
- Montero T M, Mollá E M, Esteban R M, López-Andréu F J (1996) Quality attributes of strawberry during ripening. *Scientia Horticulturae* **65** 239-250.
- Moreno J, Chiralt A, Escriche I, Serra J A (2000) Effect of blanching/osmotic dehydration combined methods on quality and stability of minimally processed strawberries. *Food Research International* **33** 609-616.
- Mullen W, McGinn J, Lean M E, MacLean M R, Gardner P, Duthie G G, Yokota T, Crozier A (2002) Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to

antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** 5191–5196.

Ortega Meder M D (1995) *Efectos del ácido ascórbico sobre la estabilidad del 3-monoglucósido de malvidina en disoluciones modelo*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. España.

Oszmianski J, Sapis J-C, Macheix J J (1985) Changes in grape seed phenols as affected by enzymic and chemical oxidation *in vitro*. *Journal of Food Science* **50** 1505-1506.

Oszmianski J, Cheynier V, Moutounet M (1996) Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44** 1712-1715.

Özkan M (2002) Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. *Food Chemistry* **78** 499-504.

Özkan M, Yemenicioglu A, Asefi N, Cemeroglu B (2002) Degradation kinetics of anthocyanins from sour cherry, pomegranate, and strawberry juices by hydrogen peroxide. *Journal of Food Science* **67** 525-529.

Peterson J, Dwyer J (1998) Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research* **18** 1995-2018.

Piffaut B, Kader F, Girardin M, Metche M (1994) Comparative degradation pathways of malvidin 3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments. *Food Chemistry* **50** 115-120.

Pilando L S, Wrolstad R E, Heatherbell D A (1985) Influence of fruit composition, maturity and mold contamination on the color and appearance of strawberry wine. *Journal of Food Science* **50** 1121-1125.

Pissarra J, Mateus N, Rivas-Gonzalo J C, Santos-Buelga C, de Freitas V (2003) Reaction between malvidin 3-glucoside and (+)-catechin in model solutions containing different aldehydes. *Journal of Food Science* **68**, 476-481.

Pissarra J, Lourenço S González-Paramás A M, Mateus N, Santos-Buelga C, de Freitas V (2004). Formation of new anthocyanin-alkyl/aryl-flavanol pigments in model solutions. *Analytica Chimica Acta* **513** 215-221.

Plumb G W, de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Cheynier V, Williamson G (1998) Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radical Research* **29** 351-358.

Podsedeck A, Wilska Jeszka J, Anders B (1998) Characterization of proanthocyanidins of apple quince and strawberry fruits. *Polyphenol Communications 98, XIXth International Conference on Polyphenols*. Lille, France. (Charbonnier F, Delacotte J-M, Rolando C, eds). Groupe Polyphénols. pp 319-320.

Poei-Langston M S, Wrolstad R E (1981) Color degradation in an ascorbic-acid anthocyanin-flavanol model system. *Journal of Food Science* **46** 1218-1222, 1236.

Porter L J (1988) Flavans and proanthocyanidins. En *The Flavonoids: advances in research since 1980*. (Harborne J B, ed). Chapman & Hall, pp 21-62.

Porter L J (1994) Flavans and proanthocyanidins. En *The Flavonoids: advances in research since 1986*. (Harborne J B, ed). Chapman & Hall, pp 23-55.

Porter L J, Foo L Y (1982) Leucocyanidin: Synthesis and properties of (2R, 3S, 4R)-(+)-3,4,5,7,3',4'-hexahydroxyflavan. *Phytochemistry* **21** 2947-2952.

- Preston N W, Timberlake C F (1981) Separation of anthocyanin chalcones by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **214** 222-228.
- Price M L, Butler L G (1977) Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of Sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **25** 1268-1273.
- Remy-Tanneau S, Fulcrand H, Labarbe B, Cheynier V, Moutounet M (2000) First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80** 745-751.
- Remy-Tanneau S, Le Guernevé C, Meudec E, Cheynier V (2003) Characterization of a colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbon-carbon and ether interflavanoid linkages by NMR and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** 3592-3597.
- Renaud S, de Lorgeril M (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1523-1526.
- Ricardo-da-Silva J M, Cheynier V, Souquet J M, Moutounet M, Cabanis J C, Bourzeix M (1991) Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **56** 111-125.
- Rivas-Gonzalo J C, Bravo-Haro S, Santos-Buelga C (1995) Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43** 1444-1449.
- Robinson G M, Robinson R A (1931) A survey of anthocyanins. *Biochemical Journal* **25** 1687-1705 (cit. Mazza y Miniatti, 1993).
- Rodriguez-Saona L E, Giusti M M, Wrolstad R E (1998) Anthocyanin pigment composition of red-fleshed potatoes. *Journal of Food Science* **63** 458-465.
- Roggero J P, Archier P, Rocheville-Divorne C (1987) Étude par CLHP de la reaction glucoside de malvidine-acetaldehyde-composé phenolique. *Conn Vigne Vin* **21**, 163-168.
- Rohr G E, Riggio G, Meier B, Sticher O (2000) Evaluation of different detection modes for the analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus spp.* Part II. Liquid chromatography - mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* **11** 113-120.
- Romero C, Bakker J (1999) Interactions between grape anthocyanins and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanin composition and color in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** 3130-3139.
- Romero C, Bakker J (2000) Anthocyanin and colour evolution during maturation of four port wines: effect of pyruvic acid addition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81** 252-260.
- Romeyer F M, Macheix J, Sapis J (1986) Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. *Phytochemistry* **25** 219-221.
- Rommel A, Heatherbell D A, Wrolstad R E (1990) Red raspberry juice and wine: effect of processing and storage on anthocyanin pigment composition, color and appearance. *Journal of Food Science* **55** 1011-1017.
- Rommel A, Wrolstad R E, Heatherbell D A (1992) Blackberry juice and wine: processing and storage effects on anthocyanin composition, color and appearance. *Journal of Food Science* **57** 385-391, 410.
- Rwabahizi S, Wrolstad R E (1988) Effects of mold contamination and ultrafiltration on the color stability of strawberry juice and concentrate. *Journal of Food Science* **53** 857-861, 872.

- Salas E, Fulcrand H, Meudec E, Cheynier V (2003) Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** 7951-7961.
- Salas E, Atanasova V, Poncet-Legrand C, Meudec E, Mazauric J P, Cheynier V (2004) Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Analytica Chimica Acta* **513** 325-332.
- Santos-Buelga C, Muñoz S S, Gutiérrez Y, Hebrero E, Vicente J L, Galindo P, Rivas-Gonzalo J C (1991) Characterization of young red wines by application of HJ Biplot analysis to anthocyanin profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39** 1086-1090.
- Santos-Buelga C, Bravo-Haro S, Rivas-Gonzalo J C (1995) Interactions between catechin and malvidin-3-monoglucoside in model solutions. *Z Lebensm Unters Forsch* **201**, 269-274.
- Santos-Buelga C, Francia-Aricha E, Rivas-Gonzalo J C (1996) Role of flavan-3-ol structure on direct condensation with anthocyanins. En *Polyphenols'96. XVIII^{es} Journées Internationales Groupe Polyphénols*. Paris, France. (Vercauteren J, Chèze C, Dumon M C, Weber J F eds), INRA Editions. pp. 9-10.
- Santos-Buelga C, Francia-Aricha E M, de Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo J C (1999) Contribution to the identification of the pigments responsible for the browning of anthocyanin-flavanol solutions. *European Food Research and Technology* **209** 411-415.
- Santos-Buelga C, Scalbert A (2000) Review: Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80** 1094-1117.
- Sarni-Manchado P, Fulcrand H, Souillol V, Souquet J-M, Cheynier V (1995) Mechanisms of anthocyanin degradation in grape-must like model systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **69** 385-391.
- Sarni-Manchado P, Fulcrand H, Souquet J-M, Cheynier V, Moutounet M (1996) Stability and color of unreported wine anthocyanin derived pigments. *Journal of Food Science* **61** 938-941.
- Sarni-Manchado P, Cheynier V, Moutounet M (1997) Reactions of polyphenoloxidase-generated caftaric acid O-quinone with malvidin 3-O-glucoside. *Phytochemistry* **45** 1367-1369.
- Sartor L, Pezzato E, Dell'Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa S (2002) Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochemical Pharmacology* **64** 229-237.
- Saucier C, Bourgeois G, Vitry C, Roux D, Glories Y (1997a) Characterization of (+)-catechin-acetaldehyde polymers: a model for colloidal state of wine polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** 1045-1049.
- Saucier C, Guerra C, Pianet I, Laguerre M, Glories Y (1997b) (+)-catechin-acetaldehyde condensation products in relation to wine-aging. *Phytochemistry* **46** 229-234.
- Saucier C, Little D, Glories Y (1997c) First evidence of acetaldehyde-flavanol condensation products in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **48** 370-373.
- Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30**, 3875-3883.
- Scheline R R (1991) Metabolism of oxygen heterocyclic compounds. En *CRC Handbook of mammalian metabolism of plant compounds*. CRC Press, pp 243-305.
- Schouten R E, Kessler D, Orcaray L, van Kooten O (2002) Predictability of keeping quality of strawberry batches. *Postharvest Biology and Technology* **26** 35-47.

Scott B C, Butler J, Halliwell B, Arouma O I (1993) Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. *Free Radical Res. Commun.* **19** 241-253.

Seeram N P, Bourquin L D, Nair M G (2001) Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** 4924-4929.

Shenoy V R (1993) Anthocyanins - prospective food colours. *Current Science* **64** 575-579.

Shetty K (2003) Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications: a review. *Process Biochemistry* **00** 1-16.

Shi Z, Lin M, Francis F J (1992) Anthocyanins of *Tradescantia pallida*. Potential food colorants. *Journal of Food Science* **57** 761-765.

Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Di Biblio A J, Bonomo R P (1991) *In vitro* scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂⁻. *Free Rad Res Comm* **11** 1-8.

Siegenberg D, Baynes R D, Bothwell T H, MacFarlane B J, Lamparelli R D, Car N G, Macphail P, Schmidt U, Tal A, Mayet F (1991) Ascorbic acid prevents the dose dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition* **53** 537-541.

Silva B, Andrade P, Mendes G, Seabra R, Ferreira M (2000) Phenolic profile in the evaluation of commercial quince jellies authenticity. *Food Chemistry* **71** 281-285.

Singleton V L (1987) Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture* **38** 69-77.

Sistrunk W A, Cash J N (1970) The effect of certain chemicals on the colour and polysaccharides of strawberry puree. *Food Technology* **24** 169-173.

Sistrunk W A, Morris J R, Kozup J (1982) The effect of chemical treatments and heat on colour stability of frozen machine-harvested strawberries for jam. *J Am Hort Sci* **107** 693-697 (cit. Bakker & Bridle, 1992).

Sistrunk W A, Wang R C, Morris J R (1983) Effect of combining mechanically harvested green and ripe puree and sliced fruit, processing methodology and frozen storage on quality of strawberries. *Journal of Food Science* **48** 1609-1612, 1616.

Skrede G, Tormod N, Martens M (1983) Visual color deterioration in blackcurrant syrup predicted by different instrumental variables. *Journal of Food Science* **48** 1745-1749.

Skrede G, Wrolstad R E, Lea P, Enersen G (1992) Color stability of strawberry and blackcurrant syrups. *Journal of Food Science* **57** 172-177.

Sommers T C (1971) The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry* **10** 2175.

Somers T C, Evans M E (1986) Evolution of red wines. I. Ambient influences on colour composition during early maturation. *Vitis* **25** 31-39.

Sondheimer E, Kertesz Z I (1948) The anthocyanin of strawberries. *Journal of American Chemical Society* **70** 3476-3478 (cit. Zafrilla, 1999).

Spayd S E, Morris J R (1981) Influence of immature fruits on strawberry jam quality and storage stability. *Journal of Food Science* **46** 414-418.

Spayd S E, Nagel C W, Hayrynen L D, Drake S R (1984) Color stability of apple and pear juices blended with fruit juices containing anthocyanins. *Journal of Food Science* **49** 411-414.

Spencer C M, Cai Y, Martin R, Gaffney S H, Goulding P N, Magnolato D, Lilley T H, Haslam E (1988) Polyphenols complexation - some thoughts and observations. *Phytochemistry* **27** 2397-2409.

St. Leger A S, Cochrane A L, Moore F (1979) Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet* 1017-1020.

Stöhr H, Herrmann K (1975) The phenolics of fruits. V. The phenolics of strawberries and their changes during development and ripeness of the fruits. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* **159** 341-348 (cit. Zafrilla, 1999).

Strack D, Wray V (1989) Anthocyanins. En. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 1. Plant Phenolics. Harborne J B (ed). Academic Press, pp 326-355.

Strack D, Wray V (1994) The anthocyanins. En *The Flavonoids: advances in research since 1986*. (Harborne J B, ed). 1st ed. Chapman & Hall, London. pp 1-22.

Sturm K, Koron D, Stampar F (2003) The composition of fruit of different strawberry varieties depending on maturity stage. *Food Chemistry* **83** 417-422.

Suutarinen J, Honkapää K, Heiniö R-L, Autio K, Morkkila M (2000) The effect of different prefreezing treatments on the structure of strawberries before and after jam making. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology* **33** 188-201.

Swain T, Hillis W E (1959) The phenolic constituents of *Prunus domestica* – I – The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **10** 63-68.

Sweeny J G, Wilkinson M M, Iacobucci G A (1981) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **29** 563-567.

Tamura H, Takada M, Yoshida Y (1995) Pelargonidin 3- O-(6-O-malonyl-beta-D-glucopyranoside) in *Fragaria x ananassa* Duch cv Nyoho. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **59** 1157-1158 (cit. Andersen *et al.*, 2004).

Tapiero H, Tew K D, Nguyen-Ba G, Mathé G (2002) Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & Pharmacotherapy* **56** 200-207.

Taylor J (1989) Color stability of blackcurrant (*Ribes nigrum*) juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **49** 487-491.

Tebib K, Besancon P, Rouanet J M (1994) Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases and tissue lipids in rats fed hypercholesterolemic diets. *Journal of Nutrition* **124** 2451-2457.

Teissedre P L, Frankel E N, Waterhouse A L, Peleg H, German J B (1996) Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **70** 55-61.

Terao J, Piskula M, Yao Q (1994) Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **308** 278-284.

Thompson R S, Jacques D, Haslam E, Tanner R J N (1972) Plant proanthocyanidins. Part I. introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* 1387-1399.

Timberlake C F, Bridle P (1976) Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **27**, 97-105.

- Timberlake C F, Bridle P (1977) Anthocyanins: colour augmentation with catechin and acetaldehyde. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **28** 539-544.
- Tomás-Barberán F A, Gil M I, Cremin P, Waterhouse A L, Hess-Pierce B, Kader A A (2001) HPLC-DAD-ESI-MS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** 4748-4760.
- Torreggiani D, Forni E, Guercilena I, Maestrelli A, Bertolo G, Archer G P, Kennedy C J, Bone S, Blond G, Contreras-Lopez E, Champion D (1999) Modification of glass transition temperature through carbohydrates additions: effect upon colour and anthocyanin pigment stability in frozen strawberry juices. *Food Research International* **32** 441-446.
- Törrönen R (2000) Flavonols and ellagic acid in berries. *Research Advances in Agricultural & Food Chemistry* **1** 31-38.
- Treutter D (1989) Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. *Journal of Chromatography* **467** 185-193.
- Treutter D, Feucht W, Santos-Buelga C (1994a) Determination of catechins and procyanidins in plant extracts. A comparison of methods. *Acta Horticulturae* **381** 789-796.
- Treutter D, Santos-Buelga C, Gutmann M, Kolodziej H (1994b) Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection. *Journal of Chromatography A* **667** 290-297.
- Valcic S, Timmermann B N, Alberts D S, Wachter G A, Krutzsh M, Wymer J, Guillen J M (1996) Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. *Anticancer Drugs* **7** 461-468.
- van Gorsel H, Li C, Kerbel E L, Smits M, Kader A A (1992) Compositional characterization of prune juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40** 784-789.
- Vande Casteele K, Geiger H, de Loose R, Van Sumere C F (1983) Separation of some anthocyanidins, anthocyanins, proanthocyanidins and related substances by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **259** 291-297.
- Versari A, Biesenbruch S, Barbanti D, Farnell P J, Galassi S (1997) Effects of pectolytic enzymes on selected phenolic compounds in strawberry and raspberry juices. *Food Research International* **30** 811-817.
- Vivar-Quintana A M, Santos-Buelga C, Francia-Aricha E, Rivas-Gonzalo JC (1999) Formation of anthocyanin-derived pigments in experimental red wines. *Food Science and Technology International* **5** 347-352.
- Vivar-Quintana A M, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo J C (2002) Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta* **458** 147-155.
- Vivas-de-Gaulejac N, Vivas N, Nonier M-F, Absalon C, Bourgeois G (2001) Study and quantification of monomeric flavan-3-ol and dimeric procyanidin quinonic forms by HPLC/ESI-MS. Application to red wine oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81** 1172-1179.
- Wakayama T, Lee C Y (1987) The influence of simple and condensed phenolics on the clarification of apple juice by honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **40** 275.
- Wang R C, Zheng W (2001) Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** 4977-4982.

Wang S Y, Jiao H (2000) Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48** 5677-5684.

Wang S Y, Lin H S (2000) Antioxidant activity in fruit and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48** 140-146.

Wang S Y, Zheng W, Galletta G J (2002) Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** 6534-6542.

Wang S Y, Bunce J A, Maas J L (2003) Elevated carbon dioxide increases contents of antioxidant compounds in field-grown strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** 4315-4320.

Weinges K, Kaltenhäuser W, Marx H, Nader E, Nader F, Perner J, Seiler D (1968) Procyanidinen aus Früchten. *Liebigs Ann Chem* **711** 184-204 (cit. Porter, 1988).

Wesche-Ebeling P, Montgomery M W (1990) Strawberry polyphenoloxidase: Its role in anthocyanin degradation. *Journal of Food Science* **55** 731-734, 745.

Wightman J D, Wrolstad R E (1995) Anthocyanin analysis as a measure of glycosidase activity in enzymes for juice processing. *Journal of Food Science* **60** (4), 862-867.

Wildenradt H L, Singleton V L (1974) The production of acetaldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture* **25** 119-126.

Williner M R, Pirovani M E, Güemes D R (2003) Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83** 842-845.

Wilson E L (1981) High pressure liquid chromatography of apple juice phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **32** 257.

Winter J, Moore L H, Dowell J R, Bokkenheuser V D (1989) C-Ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **55** 1203-1208.

Withy L M, Nguyen T T, Wrolstad R E, Heatherbell D A (1993) Storage changes in anthocyanin content of red raspberry juice concentrate. *Journal of Food Science* **58** 190-192.

Wrolstad R E, Erlandson J A (1973) Effect of metal ions on the color of strawberry puree. *Journal of Food Science* **3** 460-563.

Wrolstad R E, Lee D D, Poesi-Langston M S (1980) Effect of microwave blanching on the color and composition of strawberry concentrate. *Journal of Food Science* **45** 1573-1577.

Wrolstad R E, Skrede G, Lea P, Enersen G (1990) Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries. *Journal of Food Science* **55** 1064-1065, 1072.

Yoshida Y, Koyama N, Tamura H (2002) Color and anthocyanin composition of strawberry fruit: changes during fruit development and differences among cultivars, with special reference to the occurrence of pelargonidin 3-malonylglucoside. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **71** 355-361.

Zafrilla M P (1999) *Efecto de la elaboración de confituras de fresa y frambuesa sobre sus constituyentes fenólicos de interés en la calidad organoléptica y nutricional*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. España.

Zafrilla P, Valero A, García-Viguera C (1998) Stabilization of strawberry jam colour with natural colourants. *Food Science and Technology International* **4** 99-105.

Zhang Z, Pang X, Ji Z, Jiang Y (2001) Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning. *Food Chemistry* **75** 217-221.

Apéndices

A1, A2 y A3 - Tablas originales de los resultados obtenidos en los análisis correspondientes a los estudios incluidos, respectivamente, en los capítulos VI, VII y VIII

APÉNDICE A1 – RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL CAPÍTULO VI

Tabla A1.1 – Concentración (μM) y logaritmo neperiano de la concentración en el día i de Pg 3-gluc en las disoluciones GOx, GSinOx y GZ.

Tiempo (i días)	GOx		GSinOx		GZ	
	conc Pg 3-gluc (μM)	$\ln C_i$	conc Pg 3-gluc (μM)	$\ln C_i$	conc Pg 3-gluc (μM)	$\ln C_i$
0	1860	7,53	1860	7,53	1949	7,58
35	373	5,92	1062	6,97	384	5,95
42	180	5,19	1034	6,94	379	5,94
48	111	4,71	900	6,80	194	5,27
55	84	4,43	885	6,79	103	4,63
65	80	4,38	647	6,47	47	3,85
78	60	4,09	353	5,87	39	3,66
101	44	3,78	226	5,42	12	2,48
118	38	3,64	86	4,45	11	2,40
155	6	1,79	49	3,89	4	1,39
170	2	0,69	24	3,18	2	0,69
185	1	0,00	8	2,08	1	0,00
201	0	-	3	1,10	0	-
215	0	-	1	0,00	0	-
226	0	-	0	-	0	-
236	0	-	0	-	0	-

Tabla A.2 – Área en HPLC de los nuevos compuestos formados en las disoluciones modelo GOx, GSinOx y GZ.

GOx

Tiempo (días)	a	b	c	g
	Área (280 nm)	Área (280 nm)	Área (250 nm)	Área (250 nm)
0	0	0	2856540	0
35	5503470	1129290	6872690	0
42	12405252	1694588	9797784	0
48	-	-	1551200	0
55	10919846	1871404	588486	0
65	10681680	-	636728	741676
78	8640516	1883260	724136	765572
101	8091684	2187613	1000310	1358354
118	7155132	3087998	714416	2427248
155	0	3899260	186772	3067448
170	0	3892740	102884	3033252
185	0	4346310	101856	3311376
201	0	4054284	90504	2875272
215	0	3500900	132776	2144160
226	0	1861876	74102	1204116
236	0	899795	36218	558605

(cont.)

GSiOx

Tiempo (días)	a	b	c	g
	Área (280 nm)	Área (280 nm)	Área (250 nm)	Área (250 nm)
0	0	0	2856540	0
35	0	280553	737348	0
42	0	-	746539	0
48	1520531	309325	890504	0
55	1856946	795530	1234330	0
65	-	-	-	-
78	2470136	2175467	3604768	0
101	2669216	2433631	5407124	0
118	755840	2861721	1383496	0
155	381744	6103259	456252	233000
170	264916	7272810	154160	340516
185	0	9499266	169280	669208
201	0	10690651	220052	531916
215	0	10136707	136020	558376
226	0	4834770	49846	298398
236	0	2440801	22165	143657

GZ

Tiempo (días)	a	b	c	g
	Área (280 nm)	Área (280 nm)	Área (250 nm)	Área (250 nm)
0	0	0	3165580	0
35	2204138	1677974	9490853	0
42	6139357	3035512	12756320	0
48	7029104	3924448	10385044	0
55	7484577	-	14444668	286170
65	-	5317567	15141779	669290
78	8087932	6242262	15402307	1206514
101	-	-	2139382	855451
118	6166620	5261124	672324	994776
155	4553640	4432048	1219296	634520
170	3963884	4132624	1157792	305184
185	3195332	3916600	542308	382940
201	2636364	3296952	462424	194920
215	1299176	-	300546	0
226	0	1825110	77956	0
236	0	877056	229456	0

(cont.)

GOx

	a	b	c	g
Tiempo (días)	Área (280 nm)	Área (280 nm)	Área (250 nm)	Área (250 nm)
0	0	0	2856540	0
35	5503470	1129290	6872690	0
42	12405252	1694588	9797784	0
48	-	-	1551200	0
55	10919846	1871404	588486	0
65	10681680	-	636728	741676
78	8640516	1883260	724136	765572
101	8091684	2187613	1000310	1358354
118	7155132	3087998	714416	2427248
155	0	3899260	186772	3067448
170	0	3892740	102884	3033252
185	0	4346310	101856	3311376
201	0	4054284	90504	2875272
215	0	3500900	132776	2144160
226	0	1861876	74102	1204116
236	0	899795	36218	558605

GSinOx

	a	b	c	g
Tiempo (días)	Área (280 nm)	Área (280 nm)	Área (250 nm)	Área (250 nm)
0	0	0	2856540	0
35	0	280553	737348	0
42	0	-	746539	0
48	1520531	309325	890504	0
55	1856946	795530	1234330	0
65	-	-	-	-
78	2470136	2175467	3604768	0
101	2669216	2433631	5407124	0
118	755840	2861721	1383496	0
155	381744	6103259	456252	233000
170	264916	7272810	154160	340516
185	0	9499266	169280	669208
201	0	10690651	220052	531916
215	0	10136707	136020	558376
226	0	4834770	49846	298398
236	0	2440801	22165	143657

GZ

	a	b	c	g
Tiempo (días)	Área (280 nm)	Área (280 nm)	Área (250 nm)	Área (250 nm)
0	0	0	3165580	0
35	2204138	1677974	9490853	0
42	6139357	3035512	12756320	0
48	7029104	3924448	10385044	0
55	7484577	-	14444668	286170
65	-	5317567	15141779	669290
78	8087932	6242262	15402307	1206514
101	-	-	2139382	855451
118	6166620	5261124	672324	994776
155	4553640	4432048	1219296	634520
170	3963884	4132624	1157792	305184
185	3195332	3916600	542308	382940
201	2636364	3296952	462424	194920
215	1299176	-	300546	0
226	0	1825110	77956	0
236	0	877056	229456	0

APÉNDICE A2 – RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL CAPÍTULO VII

Tabla A2.1 – Tiempo de retención (minutos), concentración absoluta (μM), razón concentración en el día i /concentración inicial (%) y área en HPLC de Pg 3-glucósido, B3 y catequina, en la disolución modelo 0,2BC.

TIEMPO (i días)	Pg 3-gluc			B3			C		
	tiempo de retención = 23,9 min.			tiempo de retención = 9,4 min.			tiempo de retención = 10,7 min.		
	conc (μM)	Ci/C0 (%)	área	conc (μM)	Ci/C0 (%)	área	conc (μM)	Ci/C0 (%)	área
0	2365	100,0	351239680	176	100,0	9673110	470	100,0	16345780
5	2178	92,1	323440580	170	96,3	9315390	451	96,2	15730010
11	1391	58,8	206635160	132	74,9	7245820	329	70,8	11570910
14	1056	44,7	156853190	126	71,4	6906670	306	65,9	10770200
18	258	10,9	38359504	61	34,8	3365612	132	29,8	4875244
24	44	1,9	6523220	52	29,5	2852372	143	32,1	5240168
28	5	0,2	778256	27	15,5	1499490	88	20,7	3382616
35	0	0,0	87812	27	15,4	1493296	96	22,2	3636466
47	0	0,0	64116	26	15,0	1451346	84	19,7	3226130
54	0	0,0	0	19	11,0	1062874	73	17,4	2847238
63	0	0,0	0	19	11,0	1060944	62	15,2	2486179
78	0	0,0	0	17	9,8	945816	75	17,8	2909265

Tabla A2.2 – Concentración absoluta (μM), razón concentración en el día i /concentración inicial (%) y área en HPLC de Pg 3-glucósido, B3 y catequina, en la disolución modelo 1,0BCSinOx.

TIEMPO (i días)	Pg 3-gluc			B3			C		
	conc (mM)	Ci/C0 (%)	área	conc (mM)	Ci/C0 (%)	área	conc (mM)	Ci/C0 (%)	área
0	2148	100,0	319088280	977	100,0	53573590	1606	100,0	55009210
5	2069	96,3	307290840	972	99,5	53311560	1607	100,0	55034560
14	1569	73,0	233027080	797	81,6	43694390	1353	84,3	46392020
18	927	43,2	137758952	519	53,1	28443016	847	53,1	29185844
28	769	35,8	114255506	451	46,2	24747328	746	46,8	25746286
35	650	30,2	96505728	475	48,6	26021916	810	50,8	27937064
40	547	25,5	81226336	458	46,9	25130612	773	48,5	26654262
47	406	18,9	60335878	429	43,9	23526050	774	48,5	26703364
54	233	10,9	34649742	405	41,4	22197982	712	44,7	24576158
63	143	6,7	21243193	354	36,2	19414152	657	41,3	22724683
78	92	4,3	13645545	361	36,9	19783139	650	40,9	22492620

Tabla A2.3 – Concentración absoluta (μM), razón concentración en el día i /concentración inicial (%) y área en HPLC de Pg 3-glucósido, B3 y catequina, en la disolución modelo 1,0BCOx.

TIEMPO (i días)	Pg 3-gluc			B3			C		
	conc (μM)	Ci/C0 (%)	área	conc (μM)	Ci/C0 (%)	área	conc (μM)	Ci/C0 (%)	área
0	2148	100,0	319088280	977	100,0	53573590	1606	100,0	55009210
5	1671	77,8	248181490	803	82,1	44004130	1347	84,0	46184210
11	1343	62,5	199429260	703	71,9	38539540	1196	74,6	41059170
14	854	39,7	126826890	543	55,5	29749480	969	60,6	33322970
18	491	22,9	72982696	425	43,5	23317484	795	49,8	27420244
24	247	11,5	36701936	415	42,5	22755092	764	47,9	26364068
28	154	7,2	22883490	354	36,2	19389856	668	42,0	23088244
35	42	2,0	6240834	279	28,6	15313104	579	36,5	20081722
40	19	0,9	2927836	323	33,1	17719810	642	40,4	22200470
47	6	0,3	879256	272	27,8	14912800	590	37,1	20433274
54	1	0,1	264648	238	24,4	13054658	543	34,3	18855308
63	0	0,0	71533	224	22,9	12278540	519	32,8	18030196
78	0	0,0	0	223	22,8	12221521	529	33,4	18367325

Tabla A2.4 – Concentración absoluta (μM), razón concentración en el día *i*/concentración inicial (%) y área en HPLC de Pg 3-glucósido y B3, en la disolución modelo 1,5B.

TIEMPO (i días)	Pg 3-gluc			B3		
	conc (μM)	Ci/C0 (%)	área	conc (μM)	Ci/C0 (%)	área
0	2359	100,0	350312005	1702	100,0	93322886
5	2335	99,0	346770590	1692	99,4	92775500
11	1428	60,5	212105360	1118	65,7	61281240
14	1215	51,5	180536510	1096	64,4	60084950
18	667	28,3	99084268	751	44,1	41179736
24	320	13,6	47603384	555	32,6	30433628
28	211	8,9	31333798	420	24,7	23024008
35	144	6,1	21394876	431	25,3	23653174
40	83	3,5	12313076	423	24,8	23184840
47	54	2,3	8089372	409	24,0	22409560
54	23	1,0	3398116	346	20,3	18956884
63	9	0,4	1331332	284	16,7	15578095
78	2	0,1	389549	261	15,3	14299663

Tabla A2.5 - Tiempo de retención (minutos) y área en HPLC de los nuevos productos formados en la disolución modelo 0,2BC.

TIEMPO (i días)	P1	P2	P3	P4	P5
	t.r. = 20,9 min. área a 280 nm	t.r. = 40,1 min. área a 280 nm	t.r. = 20,2 min. área a 440 nm	t.r. = 35,6 min. área a 280 nm	t.r. = 5,8 min. área a 280 nm
0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
11	3545610	0	0	0	0
14	7736270	0	0	0	0
18	10268464	1729236	0	0	1725164
24	23568472	2246872	3736216	0	2106136
28	19563390	1586674	3521544	127714	1367660
35	21490232	1529556	5182872	228610	1345152
47	20147046	1164856	5541556	301212	1344062
54	17038414	808604	5373856	281730	1063197
63	17386803	739741	4930698	412028	966775
78	18097427	518910	5289267	388949	734820

Tabla A2.6 – Área en HPLC de los nuevos productos formados en la disolución modelo 1,0BCSinOx.

TIEMPO (i días)	P1	P2	P3	P4	P5
	área a 280 nm	área a 280 nm	área a 440 nm	área a 280 nm	área a 280 nm
0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
18	697744	0	0	0	1928228
28	1105982	957150	0	0	2291302
35	1155086	1038330	0	0	2297246
40	1654016	977872	0	0	2692330
47	3328432	2650612	0	313738	3286350
54	3450168	1757428	0	396218	3235072
63	1953082	1584616	0	281161	3107942
78	3726142	1354894	0	412029	2132855

Tabla A2.7 – Área en HPLC de los nuevos productos formados en la disolución modelo 1,0BCOx.

	P1	P2	P3	P4	P5
TIEMPO (i días)	área a 280 nm	área a 280 nm	área a 440 nm	área a 280 nm	área a 280 nm
0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	2278000
11	0	0	0	0	2940790
14	0	2273950	0	0	4916440
18	4777276	4090688	1794294	0	6407960
24	7912188	6405184	5365096	0	7499644
28	8654920	6447922	6627336	997452	6693726
35	9639658	7000146	8468284	1186776	6060626
40	10928260	7975952	10616556	1627912	6593264
47	10568502	7118656	11378034	2058690	5998202
54	9305914	4663978	9765096	2199114	4877964
63	8373284	4167359	7337065	2853313	4745542
78	9855878	4369858	6840946	3351532	3328299

Tabla A2.8 – Área en HPLC de los nuevos productos formados en la disolución modelo 1,5B.

	P1	P4	P5
TIEMPO (i días)	área a 280 nm	área a 280 nm	área a 280 nm
0	0	0	0
5	0	0	0
11	420970	0	3986190
14	3787020	0	9479710
18	5915272	503676	9222264
24	7238540	1021300	8679196
28	8023694	970266	7134846
35	8606996	1814230	7332192
40	11761904	1982968	6641870
47	13187550	2997520	6265837
54	11510988	2389786	5459156
63	11673019	3378398	4895497
78	11070889	4528464	4715253

APÉNDICE A3 – RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL CAPÍTULO VIII

Tabla A3.1 – Concentración de antocianos totales a lo largo del almacenamiento en las mermeladas *MA* y *MC*

mermelada MC		mermelada MA	
Tiempo (días)	conc (mg / 100 g mermelada)	Tiempo (días)	conc (mg / 100 g mermelada)
0	7,5	0	6,7
14	2,9	15	5,8
21	1,1	30	3,8
28	0,5	50	1,9
42	0,26	66	1,1
49	0,23	88	0,6
60	0,1		

Tabla A3.2 – Concentración de Pg 3-glucósido y Pg 3-rutinósido en la mermelada *MC* a lo largo del almacenamiento.

Tiempo (días)	conc (mg antociano / 100 g mermelada MC)	
	Pg 3-gluc	Pg 3-rut
0	5,9	1,06
14	2,3	0,46
21	0,86	0,18
28	0,41	0,095
35	0,18	0,045
42	0,22	0,0386
49	0,19	0,0418
60	0,09	0,0198

Tabla A3.3 – Áreas HPLC de los compuestos T1 y T2 en la mermelada *MC* a lo largo del

Tiempo (días)	Área HPLC (520 nm)	
	T1	T2
0	0	0
7	58862	116586
14	292807	356701
21	118832	211391
28	82225	122588
35	32030	80869
49	21805	30671
60	13248	17461

almacenamiento.