



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

---

*Trabajo de Tesis Doctoral*

**“Análisis de factores que afectan la acumulación, distribución y estabilidad de antioxidantes de naturaleza fenólica en berenjena (*Solanum melongena* L.)”**

---

*Lic. María José Zaro*

Directora: Dra. Analía Concellón

Co-Director: Dr. Ariel Vicente

Lugar de trabajo:

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).  
Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Calle 47 y 116.  
La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina.

**- 2014 -**

El presente trabajo de Tesis para optar por el título de **Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas** de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP-CONICET, La Plata, Argentina) bajo la dirección de la Dra. Analía Concellón y la codirección del Dr. Ariel R. Vicente.



*Dedicada a mis padres, Marita y Luis, a  
mis hermanos y sobrinos, quienes me  
acompañaron en todo momento durante  
este camino de aprendizaje...*

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero agradecer en primer lugar a mi Directora, Dra. Analía Concellón por los invaluable conocimientos que compartió conmigo durante la realización de este trabajo, por brindarme su experiencia con una gran vocación docente y especialmente por guiarme todo este tiempo con dedicación, responsabilidad y calidez. Gracias también por los momentos compartidos.*

*A mi Co-director, Dr. Ariel Vicente quien ha realizado un gran aporte a este trabajo a través de sus amplios conocimientos y experiencia, pero ante todo gracias por su generosidad, dedicación y palabras de aliento, estando siempre dispuesto a ayudar.*

*A la Dra. Alicia Chaves, por los valiosos conocimientos aportados a este trabajo y por estar siempre dispuesta a resolver mis consultas, así como por su calidez y apoyo.*

*A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, institución en la que realicé mis estudios de Postgrado.*

*A la Dra. Noemí Zaritzky y Dr. Rodolfo Mascheroni, directivos del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica ANPCyT, por otorgarme las distintas becas con las cuales puede llevar adelante mi trabajo.*

*A los directivos y profesores de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería de la Universidad Tecnológica Equinoccial.*

*A la empresa "Origen Natural" a cargo de los Sres. Alejandro y Emiliano Matica, por proveer los frutos empleados en parte de los ensayos.*

*A Diana Velasco por la colaboración en la búsqueda de material bibliográfico.*

*A Sonia Keunchkarian por su colaboración en el análisis de muestras por HPLC.*

*Un agradecimiento especial a los integrantes del grupo "Vegetales":*

*A Laura, por su amistad y cariño, por los momentos compartidos y por estar siempre.*

*A María José Andrade por su compañerismo y amistad. A su familia, por la hospitalidad y cariño durante mi estancia en Ecuador.*

*A Anabel, quien siempre tiene una palabra justa y por su alegría que nos contagia a todos.*

*A Luis, por las palabras de aliento y ayuda, con quien compartimos día a día esta última etapa de trabajo.*

*A Joaquín, por las charlas, sus ocurrencias y por estar siempre dispuesto a ayudar.*

*A Facu, por su compañerismo, ayuda y por hacer agradable los momentos de mucho trabajo.*

*A Sonia, Alicia, Cecilia Doporto, Cecilia Dini, Cristian, Gissel y Lucía, con quienes las horas en el laboratorio se hacen amenas y divertidas, por su calidez y compañerismo.*

*A Analía Gomez, por su amistad y todas las experiencias compartidas en este tiempo.*

*A los integrantes de los grupos “Trigo”, “Aceites” y “Secado”, a quienes aprecio y por los lindos momentos compartidos. A todos los becarios que hacen posible un ambiente de trabajo solidario y agradable.*

*A todos los integrantes del CIDCA con quienes comparti lugar de trabajo, charlas de pasillo y especialmente lindos momentos.*

*Por ultimo agradezco a mis amigos y a mi familia, que me han apoyado, alentado y acompañado cada día... por su amor y por ser los pilares de mi vida...Especialmente a mis padres, a José, Cecilia, Loana, Camila y Gonzalo, a Cele y Pablo ... A Caro y Lauty, Celi y Mauricio, Melisse..*

## PUBLICACIONES

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis fueron difundidos a través de su publicación en:

- **Revistas internacionales**

- “Changes in quality and phenolic antioxidants in dark purple American eggplant (*Solanum melongena* L. cv. Lucía) as affected by storage at 0 °C and 10 °C”. Analía Concellón, María J. Zaro, Alicia R. Chaves, Ariel R. Vicente. *Postharvest Biology and Technology* 66 (2012) 35–41.
- “Distribution, stability and fate of phenolic compounds in white and purple eggplants (*Solanum melongena* L.)”. María J Zaro, Alicia R Chaves, Ariel R Vicente, Analía Concellón. *Postharvest Biology and Technology* 92 (2014) 70–78.
- “Changes in bioactive compounds and responses to postharvest storage conditions in purple eggplants as affected by fruit developmental stage”. María J. Zaro, Sonia Keunchkarian, Alicia R. Chaves, Ariel R. Vicente, Analía Concellón. Enviado para su publicación en *Postharvest Biology and Technology* (Diciembre 2013).

- **Capítulo de libro**

- “Eggplant”. En: *Handbook of Vegetable Preservation and Processing*. Second Edition. CRC Press Boca Raton, Florida (USA) and Taylor & Francis (UK). En redacción.

- **Actas de congresos**

✓ **Trabajos completos**

- “Distribución y modificaciones en los antioxidantes fenólicos en berenjenas blancas y negras durante la poscosecha” Zaro, MJ; Chaves, AR; Vicente, AR; Concellón, A. XI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CYTAL). 4º Simposio Internacional de nuevas tecnología. II Simposio Latinoamericano sobre Higiene y Calidad de Alimentos. Buenos Aires. 2011.

- “Pardeamiento, antioxidantes fenólicos y actividad de enzimas asociadas a su degradación en dos zonas del pericarpio de berenjenas blancas y negras refrigeradas”. Zaro, MJ; Andrade-Cuvi, MJ; Chaves, AR; Vicente, AR; Concellón, A. VII Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIBIA). Lima, Perú. 2011.

✓ **Resúmenes**

- “Caracterización del desarrollo del fruto y capacidad antioxidante de dos variedades de berenjena cultivadas en invernadero”. Zaro, MJ; Chaves, AR; Vicente, AR; Concellón, A. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (RAFV). Mar del Plata. 2012.
- “Evaluación de diferentes tratamientos para reducir el deterioro del cáliz de berenjena”. Zaro, MJ; Chaves, AR; Vicente, AR; Concellón, A. VII Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones (AITEP). La Plata. 2012.
- “Cambios en los antioxidantes fenólicos en la piel y pulpa de dos variedades de berenjena negra durante el desarrollo”. Zaro, MJ; Chaves, AR; Vicente, AR; Concellón, A. VII Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones (AITEP). La Plata. 2012.
- “Influencia del genotipo sobre la estabilidad de antioxidantes fenólicos en berenjenas sometidas a diferentes pretratamientos”. Zaro, MJ; Keunchkarian, S; Ortiz, C; Chaves, A; Vicente, A; Concellón, A. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL). Rosario. 2013.
- “Efectos de diferentes métodos de procesamiento sobre los antioxidantes fenólicos de berenjena”. Zaro, MJ; Keunchkarian, S; Ortiz, C; Chaves, A; Vicente, A; Concellón, A. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL). Rosario. 2013.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	2
1. BERENJENA.....	2
1.1. Historia del cultivo.....	2
1.2. Principales variedades.....	4
1.3. Producción y consumo de berenjenas .....	5
1.4. Descripción botánica .....	7
1.5. Requerimientos agronómicos .....	9
1.6. Composición nutricional.....	9
1.7. Índices de cosecha y calidad.....	12
1.8. Fisiología poscosecha .....	13
1.8.1. Tasa respiratoria y producción de etileno .....	13
1.8.2. Condiciones óptimas de almacenamiento: temperatura y humedad .....	16
1.9. Principales causas de deterioro poscosecha .....	18
1.9.1. Pérdida de peso .....	18
1.9.2. Daño por frío.....	19
1.9.3. Pardeamiento enzimático.....	22
1.10. Tecnologías de poscosecha .....	26
1.11. Procesamiento.....	27
2.1. Especies reactivas del oxígeno y daño oxidativo.....	31
2.2. Antioxidantes en frutas y hortalizas .....	33
2.3. Ácido ascórbico (AA).....	34
2.4. Carotenoides .....	36
2.5. Tocoferoles y tocotrienoles.....	38

---

2.6. Compuestos fenólicos .....	40
2.6.1. Ácidos fenólicos .....	41
2.6.2. Flavonoides .....	43
2.6.3. Taninos.....	46
2.7. Biosíntesis de compuestos fenólicos .....	47
2.8. Factores que afectan el contenido de compuestos fenólicos .....	49
2.8.1. Factores genéticos .....	50
2.8.2. Factores de precosecha .....	51
2.8.3. Factores de poscosecha .....	53
2.8.4. Efectos del procesamiento .....	55
OBJETIVOS .....	57
OBJETIVO GENERAL .....	57
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	57
CAPÍTULO I.....	58
<i>“Influencia del estado de desarrollo sobre los antioxidantes fenólicos y el comportamiento poscosecha de berenjenas (Solanum melongena L.)”</i> .....	58
I. INTRODUCCIÓN .....	59
I. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
I.1. Influencia del desarrollo en la estructura de los frutos y el nivel de antioxidantes....	63
I.2. Efecto del desarrollo sobre el comportamiento poscosecha de berenjena .....	64
I.3. Determinaciones analíticas .....	64
I.3.1. Área de cáliz .....	64
I.3.2. Contenido de materia seca .....	65
I.3.3. Tasa respiratoria .....	65

I.3.4. Firmeza.....	65
I.3.5. Densidad .....	66
I.3.6. Obtención del Residuo Insoluble en Alcohol (RIA) .....	66
I.3.7. Contenido de antocianinas por espectrofotometría .....	66
I.3.8. Análisis del contenido de antocianinas por HPLC.....	67
I.3.9. Contenido de compuestos carotenoides.....	67
I.3.10. Contenido de ácido ascórbico.....	68
I.3.11. Compuestos fenólicos totales.....	69
I.3.12. Capacidad antioxidante .....	69
I.3.13. Sub-clases de compuestos fenólicos .....	70
I.3.14. Contenido de ácido clorogénico .....	70
I.3.15. Índice de deterioro de frutos almacenados.....	71
I.3.16. Pérdida de peso de frutos almacenados .....	72
I.3.17. Color superficial de frutos almacenados .....	72
I.4. Análisis estadístico.....	72
I. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
I.1. Apariencia de los frutos, crecimiento, materia seca y tasa respiratoria .....	73
I.2. Firmeza, densidad y RIA.....	75
I.3. Contenido de antocianinas.....	77
I.4. Contenido de compuestos antioxidantes.....	80
I.5. Sub-clases de compuestos fenólicos y contenido de ácido clorogénico .....	83
I.6. Efecto del desarrollo en la respuesta a diferentes regímenes de almacenamiento ...	85
I. CONCLUSIONES .....	89
CAPÍTULO II.....	90

<i>“Cambios en los antioxidantes fenólicos y en la calidad durante el almacenamiento de berenjena en condiciones recomendadas y de daño por frío”</i> .....	90
II. INTRODUCCIÓN .....	91
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	94
II.1. Material vegetal y condiciones de almacenamiento.....	94
II.2. Pérdida de peso .....	94
II.3. Pérdida de electrolitos .....	94
II.4. Daño por frío .....	95
II.5. Pardeamiento de la pulpa .....	95
II.7. Contenido de compuestos fenólicos totales .....	96
II.8. Capacidad antioxidante por método de DPPH* .....	97
II.8. Análisis de antioxidantes por HPLC-DAD.....	98
II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	100
II.1. Pérdida de peso, pérdida de electrolitos y daño por frío.....	100
II.2. Pardeamiento de la pulpa .....	102
II.3. Contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante .....	103
II.4. Compuestos fenólicos por HPLC.....	106
II. CONCLUSIONES .....	110
<i>CAPÍTULO III</i> .....	111
<i>“Distribución, estabilidad y destino de los compuestos fenólicos en berenjenas violetas y blancas”</i> .....	111
III. INTRODUCCIÓN .....	112
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	114
III.1. Material vegetal, condiciones de almacenamiento y muestreo .....	114
III.2. Pérdida de peso .....	115
III.3. Tasa respiratoria .....	115

III.4. Azúcares solubles .....	115
III.5. Acidez .....	116
III.6. Color de la pulpa.....	116
III.7. Capacidad antioxidante frente a los radicales DPPH* y ABTS*+ .....	116
III.8. Compuestos fenólicos .....	117
III.9. Localización histoquímica de ácido clorogénico.....	117
III.10. Ensayos enzimáticos.....	118
III.11. Localización histoquímica de PPO y POD .....	119
III.12. Contenido de peróxido de hidrógeno .....	120
III.13. Análisis estadístico.....	120
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	121
III.1. Apariencia de los frutos, pérdida de peso y tasa respiratoria.....	121
III.2. Distribución de azúcares y ácidos.....	122
III.3. Color de la pulpa.....	123
III.4. Capacidad antioxidante .....	124
III.5. Compuestos fenólicos totales e histolocalización de ácido clorogénico.....	125
III.6. Actividad e histolocalización de PPO y POD .....	128
III.7. Peróxido de hidrógeno .....	129
III. CONCLUSIONES .....	132
CAPÍTULO IV. ....	133
<i>“Cambios en los antioxidantes fenólicos de berenjenas violetas y blancas por aplicación de métodos de pre-tratamiento, procesamiento y cocción”.....</i>	133
IV. INTRODUCCIÓN.....	134
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	137
IV.1. Material vegetal y obtención de las muestras .....	137
IV.2. Condiciones de los pre-tratamientos .....	137

IV.2.1. Trozado a temperatura ambiente (Ta) .....	137
IV.2.2. Escaldado en agua (Ea) .....	138
IV.2.3. Salado y lavado (Sa) .....	138
IV.3. Métodos de cocción .....	138
IV.3.1. Microondas (Mi) .....	138
IV.3.2. Horneado (H) .....	139
IV.3.3. Grillado (G) .....	139
IV.3.4. Cocción al vapor (V).....	139
IV.3.5. Cocción a presión (P) .....	139
IV.3.6. Hervido (B = Boiled).....	140
IV.4. Métodos de procesamiento .....	140
IV.4.1. Secado en túnel de aire (T).....	140
IV.4.2. Secado en estufa de vacío (Va).....	140
IV.4.5. Congelado lento (Cl) .....	142
IV.4.6. Congelado rápido (Cr).....	142
IV.5. Determinaciones analíticas .....	142
IV.5.1. Materia seca .....	142
IV.5.2. Extracción de antioxidantes .....	143
IV.5.3. Capacidad antioxidante .....	143
IV.5.4. Contenido de ácido clorogénico .....	144
IV.6. Análisis estadístico .....	144
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	145
IV.1. Resumen de las diferentes condiciones de procesamiento.....	145
IV.2. Contenido de antioxidantes y apariencia de muestras control .....	145

IV.3. PRE-TRATAMIENTOS .....	146
IV.3.1. Apariencia de rodajas de berenjenas sometidas a pre-tratamientos .....	146
IV.3.2. Retención de antioxidantes .....	147
IV.4. MÉTODOS DE COCCIÓN .....	149
IV.4.1. Apariencia de rodajas de berenjenas sometidas a cocción.....	149
IV.4.2. Retención de antioxidantes .....	151
IV.5. MÉTODOS DE PROCESAMIENTO .....	154
IV.5.1. Apariencia de rodajas de berenjenas sometidas a procesamientos .....	154
IV.5.2. Retención de antioxidantes .....	156
IV. CONCLUSIONES .....	160
CONCLUSIONES FINALES .....	162
BIBLIOGRAFÍA.....	165

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Cultivo de berenjena en invernáculo y apariencia característica de las plantas.	7
<b>Figura 1.2.</b> Evolución de la floración y posterior fructificación de berenjena.	8
<b>Figura 1.3.</b> Apariencia y características anatómicas del fruto de berenjena.	8
<b>Figura 1.4.</b> Patrón de respiración de frutos climatéricos y no climatéricos (FAO, 1987).	15
<b>Figura 1.5.</b> Síntomas de deterioro poscosecha y daño por frío en berenjena violeta.	21
<b>Figura 1.6.</b> Representación esquemática de la reacción de la enzima polifenoloxidasas (PPO) con mono y di-fenoles, en presencia de oxígeno (O <sub>2</sub> ). Adaptado de Gacche y col. (2003).	23
<b>Figura 2.1.</b> Ácido ascórbico y sus productos de oxidación. Adaptado de Potters y col. (2002).	35
<b>Figura 2.2.</b> Estructura de los principales compuestos carotenoides en frutas y vegetales.	37
<b>Figura 2.3.</b> Estructura de las diferentes isoformas de la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles). Adaptado de Lampi (2011).	39
<b>Figura 2.4.</b> Estructura del ácido benzoico, ácido cinámico, ácido clorogénico y sus derivados.	42
<b>Figura 2.5.</b> Estructura básica y estructuras de las diferentes sub-clases de flavonoides. Adaptado de Ignat y col. (2011).	44
<b>Figura 2.6.</b> Estructura de tanino hidrolizable (galotanino), tanino condensado (proantocianidina) y resveratrol. Adaptado de Ignat y col. (2011).	46
<b>Figura 2.7.</b> Biosíntesis de compuestos fenólicos. PAL: fenilalanina amonio-liasa. Adaptado de Taiz y Zeiger (2006).	47
<b>Figura 2.8.</b> Biosíntesis de ácido clorogénico. PAL: fenil alanina amonio liasa. HQT: hidroxicinamil-CoA quinato hidroxicinamil transferasa. Adaptado de Wu y col. (2013).	49
<b>Figura I.1.</b> Apariencia de berenjenas cv. Monarca y Perla Negra a los 12, 15, 18, 20 y 23 días luego de la fructificación (estados de desarrollo I, II, III, IV y V; respectivamente).	73
<b>Figura I.2.</b> Tasa respiratoria (TR) de berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) durante el desarrollo (estados I, II, III, IV y V). Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$ .	75
<b>Figura I.3. A) Firmeza, B) densidad y C) Residuo Insoluble en Alcohol (RIA)</b> de berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) durante el desarrollo (estados I, II, III, IV y V). Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$ .	77
<b>Figura I.4.</b> Perfil representativo de HPLC de las antocianinas presentes en la piel de berenjenas cv. Monarca y Perla Negra. Pico 1: delfinidina 3-rutinósido-5-galactósido, Pico 2: delfinidina 3-rutinósido-5-glucósido, Pico 3: delfinidina 3-glucósido y Pico 4: delfinidina 3-rutinósido.	78
<b>Figura I.5.</b> Contenido de <b>A) antocianinas totales y B) antocianina mayoritaria (pico 4)</b> en berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) durante el desarrollo (estados I, II, III, IV y V). Valores con letras distintas indican diferencias según el test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$ .	79

<b>Figura I.6.</b> Contenido de <b>A)</b> carotenoides y <b>B)</b> ácido ascórbico en berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) durante el desarrollo (estados I, II, III, IV y V). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$ .	81
<b>Figura I.7.</b> <b>A)</b> Contenido de fenoles totales y <b>B)</b> capacidad antioxidante (TEAC) en berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) durante el desarrollo (estados I, II, III, IV y V). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con una significancia de $P < 0,05$ .	82
<b>Figura I.8.</b> <b>A)</b> Contenido relativo de derivados flavonoides (FL) y de ácidos hidroxicinámicos (HCA) y <b>B)</b> Contenido de ácido clorogénico en berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) durante el desarrollo (estados I, II, III, IV y V). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$ .	84
<b>Figura I.9.</b> <b>A)</b> Apariencia de berenjenas cv. Monarca en estados I y IV, <b>B)</b> Apariencia de berenjenas cv. Perla Negra en estados I y IV, <b>C)</b> Índice de deterioro de berenjenas almacenadas por 12 d a 0 °C o 10 °C y transferidas a 20 °C por 2 d (12+2 d). Estado de desarrollo: I (berenjenas “baby”), III (comercial pequeño) y IV (comercial). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$ .	86
<b>Figura I.10.</b> <b>A)</b> Pérdida de peso y <b>B)</b> tasa respiratoria (TR) de berenjenas cv. Monarca y Perla Negra almacenadas por 12 d a 0 °C o 10 °C y transferidas a 20 °C por 2 d (12+2 d). Estado de desarrollo: I (berenjenas “baby”), III (comercial pequeño) y IV (comercial grande). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con una significancia de $P < 0,05$ .	87
<b>Figura II.1.</b> <b>A)</b> Pérdida de peso y <b>B)</b> pérdida de electrolitos de berenjenas cv. Lucía, almacenadas a 0 °C o 10 °C por 14 d. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$ .	100
<b>Figura II.2.</b> <b>A)</b> Apariencia y <b>B)</b> índice de daño por frío (DF) en berenjenas cv. Lucía, almacenadas a 0 °C o 10 °C por 14 d. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$ .	101
<b>Figura II.3.</b> <b>A)</b> Pardeamiento de la pulpa y <b>B)</b> luminosidad ( $L^*$ ) en berenjenas cv. Lucía, almacenadas a 0 °C o 10 °C por 14 d. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$ .	102
<b>Figura II.4.</b> <b>A)</b> Sustancias reactivas a Folin–Ciocalteu (FC) y <b>B)</b> sustancias reactivas a DPPH <sup>*</sup> en berenjenas cv. Lucía, almacenadas a 0 °C o 10 °C por 14 d. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$ .	104
<b>Figura II.5.</b> <b>A)</b> Desarrollo de color en el ensayo de Folin–Ciocalteu (FC) por reacción con ácido ascórbico (AA), ácido clorogénico (CGA) o extracto de berenjena (Ext) y <b>B)</b> Cinéticas típicas de la reacción entre extractos de berenjena, CGA o AA con el radical DPPH <sup>*</sup> , medidas por su absorbancia (Abs) a 515 nm.	105
<b>Figura II.6.</b> <b>A)</b> Panel principal: Cromatograma típico de extractos de berenjena. Panel interno: espectro de máxima absorción del CGA y <b>B)</b> contenido de CGA en berenjenas cv. Lucía, almacenadas a 0 °C o 10 °C por 14 d. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$ .	107
<b>Figura II.7.</b> <b>A)</b> Panel principal: típico HPLC-MSD de extractos de berenjena. Panel interno: espectro de masas del AQ y CGA como los fragmentos más abundantes y <b>B)</b> contenido de AQ en berenjenas cv. Lucía almacenadas a 0 °C o 10 °C por 14 d. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$ .	109
<b>Figura III.1.</b> Apariencia de berenjenas violetas y blancas almacenadas a 10 °C por 30 d.	121

- Figura III.2. A)** Pérdida de peso y **B)** Tasa respiratoria (TR) de berenjenas violetas (V) y blancas (B) almacenadas a 10 °C por 0, 14 o 30 d. Valores con letras distintas indican diferencias en un test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ . 122
- Figura III.3.** Capacidad antioxidante frente al radical A) DPPH<sup>\*</sup> y B) ABTS<sup>\*\*</sup> en las zonas Exterior e Interior de la pulpa de berenjenas violetas (V) y blancas (B) almacenadas a 10 °C por 0, 14 o 30 d. Valores con letras distintas indican diferencias en un test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .  $EC_{50}^{-1}$ : Concentración equivalente que disminuye la concentración inicial de DPPH<sup>\*</sup> al 50%; TEAC: Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox. 125
- Figura III.4. A)** Compuestos fenólicos totales (FT) en las zonas Exterior e Interior de la pulpa de berenjenas violetas (V) y blancas (B) almacenadas a 10 °C por 0, 14 o 30 d. Valores con letras distintas indican diferencias en un test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ . **B)** Histolocalización por fluorescencia de ácido clorogénico en las zonas Externa e Interna de berenjenas violetas (a, b, c, d) y **C)** blancas (a, b, c, d) almacenadas a 10 °C por 0 o 30 d. Barra = 2 mm (magnificación 2,5X). p: piel; vb: haz vascular. 126
- Figura III.5. A)** Actividad polifenoloxidasa (PPO) en zonas Exterior e Interior de berenjenas violetas (V) y blancas (B) almacenadas a 10 °C por 0, 14 o 30 d. Valores con letras distintas indican diferencias en un test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ . **B)** Histolocalización de PPO en berenjenas violetas (a, c) y blancas (b, d) a cosecha, siendo las imágenes superiores aquellas que resultan del control negativo. Barra = 4 mm (magnificación 0,8X.) p: piel; vb: haz vascular; s: semilla. 128
- Figura III.6. A)** Actividad peroxidasa (POD) en zonas Exterior e Interior de berenjenas violetas (V) y blancas (B) almacenadas a 10 °C por 0, 14 o 30 d. Valores con letras distintas indican diferencias en un test de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ . **B)** Histolocalización de POD en berenjenas violetas (a, c,) y blancas (b, d) a cosecha, siendo las imágenes superiores aquellas que resultan del control negativo. Barra = 4 mm (magnificación 0,8X.) p: piel; vb: haz vascular. 130
- Figura IV.1. A)** Capacidad antioxidante (TEAC), **B)** contenido de ácido clorogénico (CGA), apariencia inicial de berenjenas **C)** violetas y **D)** blancas. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo a un test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ . 146
- Figura IV.2.** Apariencia de rodajas de berenjenas **A)** violetas y **B)** blancas, sometidas a diferentes pre-tratamientos. Ta= Trozado y expuesto al aire por 60 min, Ea= Escaldado en agua, Sa= Salado. 146
- Figura IV.3.** Apariencia de rodajas de berenjenas **A)** violetas y **B)** blancas, sometidas a métodos de cocción húmedos. V= Vapor, P= Presión, B= Boiled (Hervido). 150
- Figura IV.4.** Apariencia de rodajas de berenjenas **A)** violetas y **B)** blancas, sometidas a métodos de cocción secos. Mi= Microondas, H= Horneado, G= Grillado. 151
- Figura IV.5.** Apariencia de rodajas de berenjenas **A)** violetas y **B)** blancas, sometidas a diferentes métodos de secado. T70= Secado en túnel de aire a 70°C, T50= Secado en túnel de aire a 50 °C, Va= Secado en estufa de vacío, So= Secado solar, L=Liofilización. 155
- Figura IV.6.** Apariencia de rodajas de berenjenas **A)** violetas y **B)** blancas, sometidas a congelación. Cl= Congelado lento, Cr= Congelado rápido. 155

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Composición nutricional de berenjena expresada cada 100 g de fruto fresco. Adaptado de National Nutrient Database for Standard Reference. Agricultural Research Service United States Department of Agriculture (USDA, 2013).	10
<b>Tabla I.1.</b> Peso, longitud, diámetro, área de cáliz y contenido de materia seca (MS) de berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) durante el desarrollo (Estados I, II, III, IV y V). Valores con letras distintas en una columna, indican diferencias significativas de acuerdo al test de Fisher de mínima diferencia significativa (LSD test= least significant difference) ( $P < 0,05$ ).	74
<b>Tabla I.2.</b> Color ( $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ ) y firmeza de berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) en estados de desarrollo I, III y IV, almacenadas a 0 °C o 10 °C por 12 d y transferidas 2 d a 20 °C. Valores con letras distintas en una columna, indican diferencias significativas de acuerdo al test de Fisher de mínima diferencia significativa (LSD test= least significant difference) ( $P < 0,05$ ).	88
<b>Tabla III.1.</b> Azúcares, acidez, color (hue) y luminosidad ( $L^*$ ) en las zonas Interior (I) y Exterior (E) de la pulpa de berenjenas violetas y blancas almacenadas a 10 °C por 0, 14 o 30 d. Valores con letras distintas en una columna, indican diferencias significativas de acuerdo al test de Fisher de mínima diferencia significativa (LSD test= least significant difference) ( $P < 0,05$ ).	123
<b>Tabla III.2.</b> Peróxido de hidrógeno en las zonas Interna (I) y Externa (E) de la pulpa de berenjenas violetas y blancas almacenadas a 10 °C por 0, 14 o 30 d. Valores con letras distintas en una columna, indican diferencias significativas de acuerdo al test de Fisher de mínima diferencia significativa (LSD test= least significant difference) ( $P < 0,05$ ).	131
<b>Tabla IV.1.</b> Combinaciones de tiempo (t) y temperatura (T) seleccionadas para los diferentes tratamientos aplicados en rodajas de berenjenas violetas y blancas.	145
<b>Tabla IV.2.</b> Retención porcentual (%) de la capacidad antioxidante (TEAC) y el contenido de ácido clorogénico (CGA) en berenjenas violetas (V) y blancas (B), sometidas a diferentes tipos de pre-tratamientos. Valores con letras distintas en una columna, indican diferencias significativas de acuerdo al test de Fisher de mínima diferencia significativa (LSD test= least significant difference) ( $P < 0,05$ ).	148
<b>Tabla IV.3.</b> Retención porcentual (%) de la capacidad antioxidante (TEAC) y el contenido de ácido clorogénico (CGA) en berenjenas violetas (V) y blancas (B), sometidas a diferentes tipos de cocción. Valores con letras distintas en una columna, indican diferencias significativas de acuerdo al test de Fisher de mínima diferencia significativa (LSD test= least significant difference) ( $P < 0,05$ ).	152
<b>Tabla IV.4.</b> Retención porcentual (%) de la capacidad antioxidante (TEAC) y el contenido de ácido clorogénico (CGA) en berenjenas violetas (V) y blancas (B), sometidas a diferentes métodos de procesamiento. Valores con letras distintas en una columna, indican diferencias significativas de acuerdo al test de Fisher de mínima diferencia significativa (LSD test= least significant difference) ( $P < 0,05$ ).	157

**LISTADO DE ABREVIATURAS**

<b>1-MCP</b>	1-metil-ciclopropeno
<b>AA</b>	Ácido ascórbico
<b>ABTS<sup>++</sup></b>	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
<b>AC</b>	Ácido cafeico
<b>AOX</b>	Antioxidantes
<b>APX</b>	Ascorbato peroxidasa
<b>AQ</b>	Ácido quínico
<b>B</b>	Hervido (boiled)
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CGA</b>	Ácido clorogénico
<b>CI</b>	Congelado lento
<b>Cr</b>	Congelado rápido
<b>D3R</b>	Delfinidin-3-rutinósido
<b>DAFS</b>	Days after fruits set (Días luego de la fructificación)
<b>DF</b>	Daño por frío
<b>DPPH<sup>°</sup></b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<b>Ea</b>	Escaldado en agua
<b>ERO's</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>FC</b>	Folin-Ciocalteau
<b>FL</b>	Flavonoides
<b>G</b>	Grillado
<b>GPX</b>	Glutatión peroxidasa
<b>H</b>	Horneado
<b>HCA</b>	Ácidos hidroxicinámicos
<b>HPLC-DAD</b>	High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector
<b>HPLC-MSD</b>	High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Detector
<b>HQT</b>	Hidroxicinamil-CoA quinato hidroxicinamil transferasa
<b>HR</b>	Humedad relativa
<b>LSD</b>	Least significant difference (Test de mínima diferencia significativa)
<b>M</b>	Monarca
<b>Mi</b>	Cocción a microondas
<b>MS</b>	Materia seca
<b>P</b>	Cocción a presión
<b>PAL</b>	Fenil alanina amonio liasa
<b>PN</b>	Perla Negra
<b>POD</b>	Peroxidasa
<b>PPO</b>	Polifenoloxidasa

<b>RIA</b>	Residuo Insoluble en Alcohol
<b>Sa</b>	Salado
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>T</b>	Túnel de aire
<b>Ta</b>	Temperatura ambiente
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TEAC</b>	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox
<b>TR</b>	Tasa respiratoria
<b>UV-C</b>	Ultravioleta C
<b>V</b>	Cocción al vapor
<b>Va</b>	Estufa de vacío

---

## RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la influencia del genotipo, estado de desarrollo, condiciones de almacenamiento y métodos de procesamiento y cocción sobre los niveles y estabilidad de los antioxidantes (AOX) en berenjena. El ácido clorogénico (CGA) fue el antioxidante mayoritario durante todo el desarrollo ontogénico y se redujo progresivamente con el crecimiento de las berenjenas. Los frutos en estadios iniciales ("baby") presentaron una capacidad antioxidante dos veces mayor que los frutos desarrollados. A pesar de tratarse de una especie sensible al frío, las berenjenas "baby" mostraron un mejor almacenamiento a 0 °C en contraposición a los estados más avanzados. En una segunda parte del trabajo se evaluaron los cambios en los AOX de berenjenas violetas completamente desarrolladas durante el almacenamiento a la temperatura recomendada (10 °C) y en condiciones de daño por frío (0 °C). A diferencia de lo que ocurre en muchos otros productos en los que luego de la cosecha prevalecen los procesos degradativos, la capacidad antioxidante de las berenjenas conservadas a 10 °C y el CGA se incrementaron durante 14 d. Contrariamente en frutos almacenados a 0 °C y luego de un aumento inicial de la capacidad AOX se observó una marcada degradación. Los cambios en el contenido de ácido quínico y la ausencia de ácido cafeico libre, ambos precursores del CGA, sugieren que el CGA sería sustrato directo en las reacciones de pardeamiento en frutos conservados a 0 °C. Posteriormente se evaluó la distribución y estabilidad de los AOX fenólicos en la pulpa de berenjenas violetas y blancas, durante el almacenamiento a 10 °C por períodos prolongados (30 d). La capacidad antioxidante, junto con la localización *in situ*, mostraron que el CGA se acumula en forma preferencial en la zona interna de la pulpa. Luego de 30 d de almacenamiento se observó que los AOX resultan más estables en frutos blancos, mientras que ocurrió una disminución en los violetas. La localización y actividad de las enzimas polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD) no correlacionaron con dicha pérdida de antioxidantes fenólicos, aunque sí se asoció con la sobreproducción de peróxido de hidrógeno de los tejidos. Los resultados sugieren que la reducción de CGA a 10 °C se debería a la formación de paredes secundarias en fibras, haces vasculares y semillas más que a reacciones de pardeamiento. En un último grupo de ensayos se estudió la influencia de diferentes condiciones de procesamiento (escaldado, salado, trozado, congelación, deshidratación y liofilización) y cocción (métodos húmedos a presión atmosférica y sobre-presión, microondas y secos: grillado y horneado) en la retención de AOX en berenjenas violetas y blancas. Los resultados de este trabajo mostraron que, con excepción de los métodos de deshidratación, en los que las pérdidas fueron muy elevadas y similares para los dos tipos de frutos, las berenjenas blancas mostraron una mayor retención de AOX que las violetas en respuesta al procesamiento. Es importante mencionar que en algunos métodos de cocción se observa un aumento en la capacidad antioxidante (expresada sobre materia seca) sugiriendo la liberación de compuestos previamente insolubles o bien la síntesis *de novo* de algunos compuestos con propiedades anti-radicales (ej. productos de la reacción de Maillard). Independientemente de esto el estudio mostró que la matriz del vegetal posee elevada importancia en la retención de AOX ante diferentes condiciones de procesamiento y preparación.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. BERENJENA

Las berenjenas (*Solanum melongena* L.) son junto al tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y al pimiento (*Capsicum annuum* L.), las hortalizas de fruto pertenecientes a la familia de las *Solanáceas* más ampliamente conocidas y difundidas (Doganlar y col., 2002; Sekara y col., 2007; Knapp y col., 2013). A pesar de que las berenjenas presentan una gran diversidad en términos de tamaño, forma (elongada, ovoide, redonda o alargada) y color (violeta, blanco, verde o rayadas), las tipo Americano, elongadas y de color violeta oscuro, son las más populares en los mercados Occidentales (Akanitapichat y col., 2010; Muñoz-Falcón y col., 2008, 2009; Liao y col.; 2009). Los frutos son empleados cocidos y en varios platos alrededor del mundo (Nothmann, 1986; Demir y col., 2002; Hanson y col., 2006).

Más allá de sus características particulares en términos de apariencia, sabor, color y textura las berenjenas son uno de los vegetales con mayor capacidad antioxidante. Se han descrito numerosos beneficios aportados a la salud, los cuales se han atribuido mayoritariamente al alto contenido de compuestos fenólicos hallado en dichos frutos (Cao y col., 1996; Plazas y col., 2013a,b). Estudios epidemiológicos sugieren que las dietas ricas en polifenoles ofrecen protección contra el desarrollo de enfermedades crónicas como cáncer, diabetes, osteoporosis, y enfermedades cardio- y neuro-degenerativas (Pandey y Rizvi, 2009). La berenjena es uno de los vegetales más ricos en este grupo de compuestos bioactivos.

#### 1.1. Historia del cultivo

La evolución y domesticación del cultivo de berenjena han sido extensamente estudiadas a través de aspectos históricos, morfológicos y moleculares (Muñoz-Falcón y col., 2009). Las técnicas moleculares modernas resultaron de gran utilidad, ya que los análisis tradicionales (como los morfológicos y las características de compatibilidad o fertilidad), eran

insuficientes para la clasificación de las especies existentes, debido a la gran variabilidad y complejidad del llamado “complejo berenjena”, que incluye a las formas cultivadas tradicionales y a las especies silvestres cercanamente relacionadas (Prohens y col., 2005).

Existe consenso en que la berenjena fue domesticada en el Sudeste de Asia, teniendo lugar especialmente en el nordeste de India y sudoeste de China, a partir de la especie silvestre originaria de África, *Solanum incanum* L. (Lester y Hasan, 1991; Daunay y col., 2001a; Frary y col., 2007; Hurtado y col., 2012). La región de Indochina se reconoce así como el centro de diversidad primario de la especie *Solanum melongena* (Prohens y col., 2005; Frary y col., 2007). A partir de allí, la expansión del cultivo a centros secundarios de diversificación, generó una amplia variabilidad en los caracteres que hoy podemos observar, debido a fuerzas evolutivas como la mutación, selección natural, selección artificial, desviación genética y recombinación (Prohens y col., 2005; Sekara y col., 2007). El cultivo fue llevado posteriormente al este de África por navegantes iraníes y árabes, e introducida en Europa a través de España, antes del siglo X. Desde la Península Ibérica, la berenjena se habría difundido lentamente, a otros países europeos y de América (Prohens y col., 2005; Daunay, 2008).

La transformación de los pequeños frutos silvestres de color verde durante la domesticación, involucró una gran expansión del tamaño, diversificación del color y una disminución del carácter espinoso de las plantas y del amargor de los frutos. De esta forma, el paso a centros secundarios geográficamente distantes, llevaron a la aparición de variedades específicas para cada región del mundo, pudiendo considerarse dos grandes tipos de berenjena: “Occidentales”, halladas en Medio Oriente, África, Europa y América; u “Orientales” encontradas en el este y sudeste de Asia (Daunay y Janick, 2007; Daunay, 2008; Meyer y col., 2012; Vilanova y col., 2012; Hurtado y col., 2012; Knap y col., 2013).

Otras especies de relativa importancia y relacionadas con *Solanum melongena* L., son la berenjena escarlet (*Solanum aethiopicum* L.) y la berenjena gboma (*Solanum macrocarpon* L.) que se producen y consumen principalmente en África (Daunay y col., 2001b). Estos materiales constituyen recursos genéticos de gran interés para la mejora de la berenjena y para la ampliación de su base genética (Blasco-Villarroya, 2009).

## 1.2. Principales variedades

Si bien existen varias clasificaciones botánicas para definir las variedades de *Solanum melongena* L., la más habitual es la de Bailey (1947) que distingue tres tipos, utilizadas como sinónimos a pesar de las diferencias morfológicas, ellas son: *S. melongena* L. var. *esculentum*, que engloba a las formas comunes; *S. melongena* L. var. *serpentinum*, que incluye tipos varietales con frutos muy largos; y *S. melongena* L. var. *depressum*, de frutos pequeños, redondos y precoces (Muñoz-Falcón y col., 2005).

Por su parte, Cantwell y Suslow (2000) subdividieron desde el punto de vista comercial a las variedades más comúnmente encontradas y consumidas en Estados Unidos, distinguiendo los siguientes tipos:

	<p><b>Americana:</b> frutos de forma ovalada o globosa, firmes, con piel de color violeta oscuro y cáliz verde claro.</p>
	<p><b>Japonesa:</b> frutos elongados y delgados, de color púrpura claro a oscuro. Se las considera muy perecederas.</p>
	<p><b>Mini-Japonesa:</b> pequeña, redonda y con vetas de diferentes tonalidades entre el púrpura y violeta.</p>

	<p><b>China:</b> variedad elongada y delgada, de color púrpura claro.</p>
	<p><b>Blanca:</b> frutos más pequeños y de forma ovalada o globular, que presentan una piel delgada y clara.</p>
	<p><b>Rayada:</b> frutos caracterizados por presentar forma ovalada y piel de color de fondo blanco cubierto por estrechas líneas violetas.</p>

Como puede observarse, los caracteres más importantes en la clasificación de las berenjenas son la forma, el tamaño y el color. A su vez, la presencia de espinas en la planta y la longitud de fruto recubierta por el cáliz, son también tenidas en cuenta. Dentro de las variedades de berenjena preferidas en la actualidad por los mercados Occidentales, se destacan las de tipo violeta-negro y las rayadas, sin embargo han ganado popularidad como nuevas forma de comercialización los frutos blancos o aquellos de pequeño tamaño (“baby”) que permiten su venta como especialidades o se utilizan para la preparación de encurtidos (Prohens y col. 2005, Knnap y col., 2013, Mohammed y Brecht, 2003).

### 1.3. Producción y consumo de berenjenas

En la actualidad, la berenjena se considera el tercer cultivo en importancia dentro de las *Solanáceas*, luego de la papa y el tomate (Sekara y col., 2007). Conforme a datos de la FAO, la producción mundial de berenjenas se incrementó notablemente en los últimos 20 años, pasando de 11,8 millones de toneladas en el año 1991 a 46,8 millones de toneladas en 2011, con una superficie implantada de 1,8 millones de hectáreas (FAOSTAT, 2014). La producción de berenjenas se encuentra en la actualidad altamente concentrada, con más de un 90% representada sólo por 5 países (Alí y col., 2011). China es el principal productor, alcanzando en

2011 una participación de 60% del total mundial. Le sigue en importancia India (25%), y en menor medida Irán (2,6%), Egipto (2,5%), Turquía (1,8%), Indonesia (1,1%), Japón (0,7%), Italia (0,5) y España (0,4%) (FAOSTAT, 2014).

Al igual que la producción, el comercio internacional de berenjenas ha mostrado una tendencia creciente. En el año 2011, la exportación mundial alcanzó 440 mil toneladas. Entre los países con los mayores volúmenes de producto exportado se destacan España (27,8%), Jordania (14,7%), México (11,1%), Holanda (10,8%) e Irán (5,2%). Los principales países compradores de esta hortaliza en orden de importancia, y que concentraron el 70% del total comercializado fueron: Estados Unidos, Francia, Alemania, Siria, Rusia, Irak, Italia, Canadá y Reino Unido (FAOSTAT, 2014).

En nuestro país el cultivo se realiza a campo o en invernáculos, concentrándose en los cinturones hortícolas de diferentes zonas, donde se destina al mercado interno para su consumo en fresco (Mangione y Sanchez, 1999). Según el Censo Nacional Agropecuario de 2002, Argentina cuenta con una superficie implantada de 1.254 hectáreas a campo y 28,9 bajo cubierta. Esto permite estimar una producción superior a 30.000 toneladas anuales. Las principales provincias productoras son: Buenos Aires (23%), Santa Fé (17%), Salta (17,5%), Córdoba (7,5%), Jujuy y Mendoza (6,8%) y Formosa (4,3%). El ingreso al mercado se produce a lo largo de todo el año desde las distintas zonas del país, con una disminución de la oferta durante el invierno, cuando comienza la importación desde Paraguay y Brasil (Mangione y Sanchez, 1999).

#### **1.4. Descripción botánica**

La berenjena es una planta herbácea, aunque sus tallos lignificados le dan un aspecto arbustivo (**Figura 1.1**). Puede rebrotar en un segundo año si se cuida adecuadamente, sin embargo la producción se reduce y la calidad de los frutos es menor, por lo que comercialmente los cultivos se manejan en general de forma anual (Nothman, 1986). El sistema radicular es potente y muy desarrollado, posee un tallo de 1,5-2,0 m de altura, con tallos secundarios. Las hojas de largo pecíolo, con nervaduras y espinas, se insertan al tallo de forma alterna.



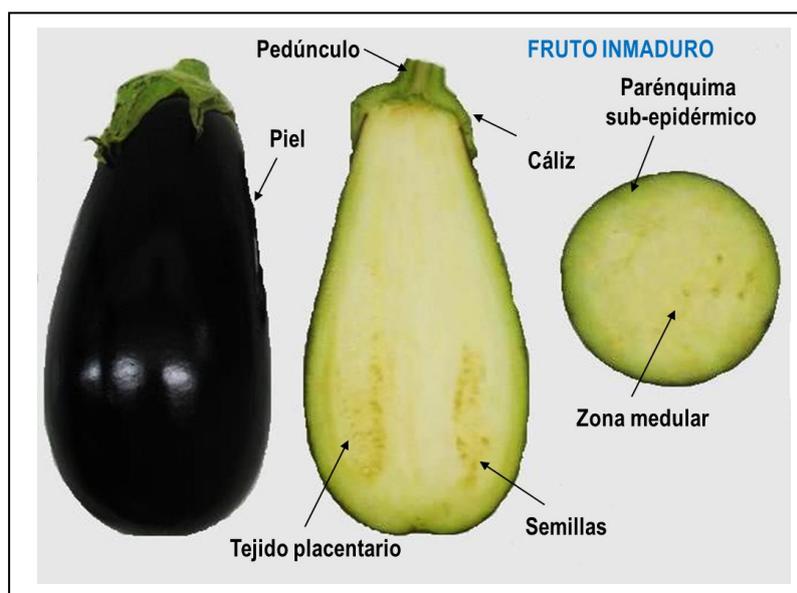
**Figura 1.1.** Cultivo de berenjena en invernáculo y apariencia característica de las plantas.

Las flores de color violáceo, muestran en su pedúnculo y cáliz abundantes espinas. Los estambres presentan anteras muy desarrolladas de color amarillo por debajo del estigma, dificultando la fecundación directa. El cáliz de la flor perdura después de la fecundación y crece junto al fruto, envolviéndolo por su parte inferior (**Figura 1.2**). La mayor parte de las variedades florecen en racimos de tres a cinco flores, una de las cuales da lugar a un fruto comercial. La fecundación es autógama, aunque también puede haber cruzamiento con flores de otras plantas o incluso de la misma planta (Daunay y col., 2001a; Daunay y Chadha, 2004).



**Figura 1.2.** Evolución de la floración y posterior fructificación de berenjena.

El fruto muestra notables diferencias entre cultivares, siendo su color, forma y tamaño los rasgos más variables (Nothman, 1986). De acuerdo al origen anatómico de la planta, las berenjenas se clasifican como frutos inmaduros tipo baya. Como el tomate y pepino, el fruto completo puede consumirse, incluyendo el tejido placentario, semillas y piel. Las semillas son pequeñas y de color blanco o amarillo, pudiendo mantener su poder germinativo por 4 a 6 años (Sekara y col., 2007; Frary y col., 2009) (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3.** Apariencia y características anatómicas del fruto de berenjena.

### **1.5. Requerimientos agronómicos**

- **Temperatura:** la planta requiere temperaturas relativamente altas para su crecimiento. Por ser un cultivo originario de clima tropical y sub-tropical, llega a tolerar hasta 40 °C. La temperatura media óptima para el desarrollo del fruto es de 21-29 °C, mientras que una temperatura próxima a la mínima (10-12 °C), retrasa la floración y fructificación (Anónimo, 2004b; Chen y Li, 1996).

- **Humedad:** la humedad relativa óptima es cercana al 65%. Humedades relativas muy elevadas favorecen el desarrollo de enfermedades aéreas y dificultan la fecundación. Efectos similares se producen cuando la humedad relativa es escasa (Anónimo, 2004b; Chen y Li, 1996).

- **Luminosidad:** es una planta muy exigente en luminosidad, requiere de 10 a 12 horas de luz, si esta es insuficiente se produce el aborto de flores y un mayor desarrollo vegetativo (Anónimo, 2004b; Chen y Li, 1996).

- **Suelo:** es poco exigente, debido a que posee un potente y profundo sistema radicular. En suelos arcillosos pueden presentarse problemas de asfixia radicular, mostrando rápidamente los síntomas (Anónimo, 2004b; Chen y Li, 1996).

- **pH y salinidad:** los valores de pH óptimos oscilan entre 6-7, aunque en suelos menos pesados puede cultivarse con valores de pH superiores (7,0 y 8,5). En suelos ácidos presenta problemas de crecimiento y producción. Es menos resistente a la salinidad que el tomate, siendo más sensible durante las primeras fases del desarrollo (Anónimo, 2004b; Chen y Li, 1996).

### **1.6. Composición nutricional**

En las últimas décadas se ha establecido la importancia de la dieta como parte fundamental del crecimiento y desarrollo de las personas, así como por su impacto en la salud (Martin y col., 2013). En general, los productos fruti-hortícolas se destacan por ser buena

fuente de agua, carbohidratos, fibra, algunos minerales, vitaminas y antioxidantes. Mientras que a su vez son bajos en calorías, grasas y sodio, y no poseen colesterol (Vicente y col., 2009). Asimismo, estos productos aportan una serie de compuestos no nutricionales (flavonoides, carotenoides sin actividad pro-vitamina A, esteroides, compuestos fenólicos, glucosinolatos, entre otros) capaces de ejercer efectos benéficos para la salud (Dias, 2012).

Si bien la composición nutricional depende fundamentalmente del cultivar o tipo de berenjena de que se trate (San José y col., 2013), en general, presentan un valor calórico muy bajo al igual que el nivel de grasa y sodio. Se las considera además una excelente fuente de fibra y aportan ciertas vitaminas y minerales (Frary y col., 2007). Entre las vitaminas se destaca el contenido de vitamina K y la presencia de tiamina, niacina, vitamina B6 y ácido pantoténico. Las berenjenas se reconocen además por ser buena fuente de ácido fólico y potasio (Anónimo, 2013). En la **Tabla 1.1** puede observarse la composición de berenjenas crudas:

**Tabla 1.1.** Composición nutricional de berenjena expresada cada 100 g de fruto fresco. Adaptado de National Nutrient Database for Standard Reference. Agricultural Research Service United States Department of Agriculture (USDA, 2013).

Composición Proximal		Minerales		Vitaminas		Lípidos	
Agua (g)	92,30	Ca (mg)	9,00	Vitamina C (mg)	2,20	Saturados (g)	0,03
Energía (kcal)	25,00	Fe (mg)	0,23	Tiamina (mg)	0,04	Monoinsat. (g)	0,02
Proteínas (g)	0,98	Mg (mg)	14,00	Riboflavina (mg)	0,04	Polinsat. (g)	0,08
Grasas (g)	0,18	P (mg)	24,00	Niacina (mg)	0,65	Colesterol (mg)	0,00
Carbohidratos (g)	5,88	K (mg)	229,00	Vitamina B6 (mg)	0,08		
Fibra (g)	3,00	Na (mg)	2,00	Folatos (µg)	22,00		
Azúcares (g)	3,53	Zn (mg)	0,16	Vitamina A (µg)	1,00		
				Vitamina E (µg)	0,30		
				Vitamina K (µg)	3,50		

Independientemente de estas características, la composición de las berenjenas ha recibido notable atención por ser una valiosa fuente de compuestos de alta capacidad antioxidante, tales como antocianinas y ácidos fenólicos, (Cao y col., 1996; Stommel y Whitaker, 2003; Hanson y col., 2006, Frary y col., 2007). La prevención de mutagénesis, cáncer y enfermedades cardiovasculares son algunos de los efectos favorables informados debido a la presencia de antocianinas en berenjena (Todaro y col., 2009). A su vez, se ha demostrado que los compuestos fenólicos presentes en los extractos de estos frutos suprimen la metástasis (Matsubara y col., 2005), inhiben la carcinogénesis y la aterosclerosis (Stommel y Whitaker, 2003) y tienen también acción hipolipidémica y antimicrobiana (Sudheesh y col., 1997).

Otros constituyentes de importancia nutricional presentes son los glicoalcaloides, metabolitos secundarios que ocurren comúnmente en varios miembros de la familia *Solanáceas*. La solasonina y solamargina son los principales tipos de estos compuestos identificados en berenjena (Chen y Li, 1996). En la planta, tienen una función de defensa frente al ataque de insectos y microorganismos (Mennella y col., 2010). En relación con ese rol, los glicoalcaloides son potencialmente tóxicos para los humanos y resultan responsables del sabor amargo de los frutos (Sánchez-Mata y col. 2010). Teniendo en cuenta esto, se ha establecido para papa una concentración máxima de 20 mg 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco. En general este valor se emplea también como límite de seguridad para berenjena (Mennella y col., 2010; 2012). Aunque estos compuestos son tóxicos en ciertos niveles, en los últimos años se han descrito ciertas propiedades beneficiosas para la salud, y su empleo con fines medicinales es enfoque de interés para la comunidad científica (Sánchez-Mata y col., 2010). Su capacidad de disrupción celular y la habilidad de los glicoalcaloides para formar complejos con el colesterol pueden propiciar efectos positivos, si son empleados en cantidades moderadas, pudiendo ser eficaces por ejemplo, en el control de células cancerígenas (Mennella y col., 2010).

### **1.7. Índices de cosecha y calidad**

Las berenjenas son cosechadas para su consumo de acuerdo al tamaño, en un estado fisiológicamente inmaduro y antes de que las semillas completen su desarrollo (Gajewski y Arasimowicz, 2004; Anónimo, 2011). En general, se considera que los frutos deben cosecharse cuando han alcanzado un 80% de su tamaño final a fin de maximizar la calidad y el rendimiento (Mohammed y Brecht, 2003). El tiempo requerido desde la floración hasta que los frutos alcanzan este calibre comercial es de alrededor 15-35 días, dependiendo de la variedad, la temperatura y la intensidad de luz solar (Aguilar y Molinari, 1998; Uzun, 2008). Sin embargo, las berenjenas pueden recolectarse y consumirse en todos los estados de desarrollo, incluso los más tempranos, esencialmente de acuerdo a las exigencias del mercado (Chen y Li., 1996; Anónimo, 2004a).

Los frutos deben cosecharse mientras se presentan firmes, bien formados, con su piel tersa y brillante, junto a una pulpa y semillas de color blanquecino uniforme (Siller-Cepeda, 2004; Anónimo, 2004a; Mangione y Sanchez, 1999). A medida que los frutos maduran, pierden firmeza y su pulpa se vuelve esponjosa. En tanto, las berenjenas sobremaduras o excesivamente grandes se tornan amargas, mostrando además una apariencia externa opaca y un gran número de semillas (Anónimo, 2004a; Mangione y Sanchez, 1999). La cosecha se realiza en forma manual y secuencial a medida que los frutos alcanzan el tamaño seleccionado, normalmente cada 3 o 6 días, de acuerdo a las condiciones climáticas, favoreciendo el rendimiento con estas recolecciones frecuentes (Anónimo, 2004b; Mangione y Sanchez, 1999).

Los mínimos requisitos de calidad exigidos para la comercialización de berenjenas son: buen estado sanitario y sin daños, firmes, limpias, sin sabores u olores objetables y de tamaño uniforme. La presencia de un pedúnculo bien adherido al fruto, de corta longitud (para evitar daños entre frutos adyacentes), así como de apariencia fresca y color verde, se consideran

también importantes parámetros de calidad ya que en general su aspecto declina más rápidamente que el del fruto (Molinar y col., 1996).

### **1.8. Fisiología poscosecha**

Las pérdidas en calidad y cantidad de los productos fruti-hortícolas durante la poscosecha, período que abarca todas las operaciones entre la cosecha y el consumo, afectan en gran medida el rendimiento y la viabilidad comercial de un cultivo. En general, los productos frescos tienen alto contenido de agua y están sujetos a la deshidratación, el daño mecánico y el deterioro patológico. Se estima que la magnitud de las pérdidas debido a estas causas alcanza entre 25 y 50%, según el país de que se trate (Kader, 2002). Para evitarlas y mantener la calidad de un producto determinado, deben considerarse los principales factores fisiológicos y ambientales involucrados en su deterioro: tasa respiratoria (TR), producción de etileno, temperatura óptima de almacenamiento y susceptibilidad a diferentes condiciones de estrés, para posteriormente emplear prácticas poscosecha que incluyen el almacenamiento, tratamientos complementarios y procesamiento, y que permitirán maximizar la vida útil como alimento (Raju y col., 2011). La fisiología poscosecha de los vegetales también depende en gran medida de su origen anatómico en la planta y del grado de desarrollo. En este sentido las berenjenas son frutos inmaduros (Fallik, 1995; Toivonen, 2011).

A continuación se detallan las características fisiológicas y requerimientos poscosecha específicos de los frutos de berenjena.

#### **1.8.1. Tasa respiratoria y producción de etileno**

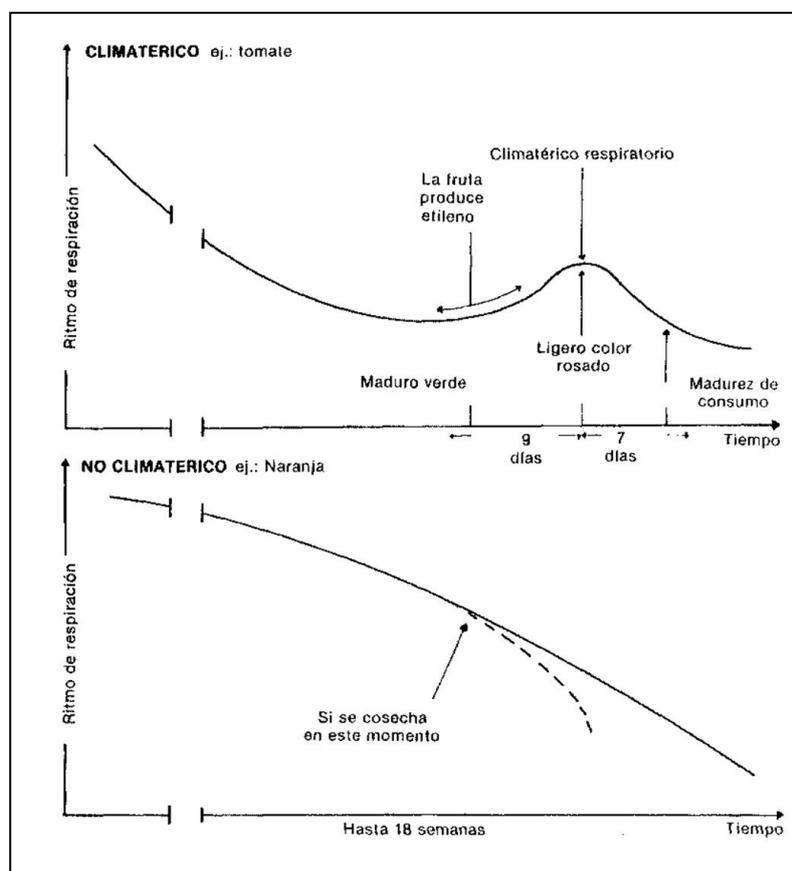
La respiración es el proceso por el cual los materiales orgánicos almacenados, son desdoblados en productos terminales simples (CO<sub>2</sub> y agua) con liberación de energía. Conforme las reservas que proporcionan energía para el mantenimiento de la actividad

fisiológica se agotan, se produce una aceleración de la senescencia (Kader, 2002). De esta forma, una alta tasa respiratorio resulta en una mayor velocidad de deterioro del vegetal y se correlaciona inversamente con la extensión de la vida poscosecha (Kader, 2002; Saltveit, 2004). La tasa respiratoria varía ampliamente entre tipos de vegetales, así por ejemplo, la papa y cebolla tienen bajos niveles de respiración y pueden ser almacenados por largos períodos, mientras que productos como el brócoli muestran una alta TR y son muy perecederos (Toivonen, 2011). En cambio la berenjena presenta valores intermedios.

Por su parte el etileno ( $C_2H_4$ ) es un compuesto natural del metabolismo de las plantas producido por todos los órganos y tejidos, y que afecta a muchos procesos fisiológicos. El  $C_2H_4$  regula aspectos del crecimiento, desarrollo y senescencia. A su vez, juega un papel importante en la abscisión de algunos órganos vegetales (Kader, 2002). Su producción puede ser inducida por factores externos de estrés tales como: golpes, cortes, daño por frío o condiciones ambientales adversas (sequía e inundación) (Yang y Pratt, 1978).

En función de su patrón de respiración y producción de etileno ( $C_2H_4$ ), los frutos se clasifican en climatéricos y no climatéricos (**Figura 1.4**). Los frutos climatéricos presentan un período en su ontogenia durante el cual una serie de cambios bioquímicos son iniciados por la producción autocatalítica de etileno, marcando el cambio entre el crecimiento y la senescencia e implicando un incremento en la respiración y el comienzo de la maduración (Thimann, 1980). Como consecuencia de la maduración se producen numerosos cambios composicionales, algunos deseables y otros no. Se destacan: la degradación de clorofilas y síntesis de otros pigmentos, en productos que acumulan almidón la conversión a azúcares, ablandamiento, producción de volátiles, cambios en el contenido de ácidos orgánicos, entre otros (Kader, 2002). Son frutos climatéricos la banana, manzana, tomate, durazno, melón, entre otros. Por su parte los frutos no climatéricos, como los cítricos, uva, frutilla, pepino, ananá o berenjena

no presentan este incremento en la respiración y producción de etileno y los cambios que ocurren una vez separados de la planta suelen ser más limitados (Toivonen, 2011).



**Figura 1.4.** Patrón de respiración de frutos climatéricos y no climatéricos (FAO, 1987).

Las berenjenas muestran un comportamiento de tipo no climatérico, con una moderada tasa respiratoria, en el rango de  $8-11 \mu\text{L CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y una baja producción de etileno del orden de  $0,1-0,7 \mu\text{l kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , ambos medidos a  $12,5 \text{ }^\circ\text{C}$  (Cantwell y Suslow, 2000). A pesar de esto, las berenjenas son sensibles a la presencia de etileno y debe evitarse exponerlas productos que sí lo generan y que pueden estar presentes durante el almacenamiento o transporte. En este sentido, se ha informado que el contacto con  $\text{C}_2\text{H}_4$  disminuye el tiempo de conservación de 14 a 3-5 días (Mangione y Sánchez, 1999). A su vez, cuando las berenjenas son expuestas a más de 1 ppm de etileno, puede ocurrir la abscisión del cáliz y pardeamiento (Cantwell y Suslow, 2000; Kader, 2002). Por el contrario, el tratamiento con el inhibidor de la acción del etileno, 1-

metil-ciclopropeno (1-MCP), redujo el deterioro de berenjenas almacenadas a 10 °C y luego transferidas a 20 °C (Massolo y col., 2011).

### **1.8.2. Condiciones óptimas de almacenamiento: temperatura y humedad**

La calidad y vida útil de los productos frescos son altamente dependientes de las condiciones ambientales. Con el objetivo de realizar un control de la actividad respiratoria y extender el período de vida poscosecha, se recomienda la implementación del almacenamiento a bajas temperaturas (refrigeración), lo que permite retrasar el ritmo metabólico (Toivonen, 2011). Esto se debe esencialmente a que por cada incremento de 10 °C, se ocasiona un aumento exponencial de la tasa respiratoria, reflejándose en una velocidad 2 o 3 veces mayor de las reacciones metabólicas (Kader y Salveit, 2003). A pesar de esto, debe tenerse en cuenta que vegetales de origen tropical y subtropical, como las berenjenas, son susceptibles al daño por frío a temperaturas inferiores a 10 °C (Nothmann, 1986; Concellón y col., 2007). Las berenjenas son incluso más sensibles que los tomates y pimientos (Mohammed y Brecht, 2003). Por esta razón, se recomienda su almacenamiento a temperaturas no inferiores a 10-12 °C y 90-95% de humedad relativa (HR). En estas condiciones el potencial de almacenamiento de berenjena es de 14-21 días, ya que posteriormente la calidad visual y sensorial comienza a declinar (Cantwell y Suslow, 2000). Un rápido enfriamiento a estas temperaturas, inmediatamente después de la cosecha, es beneficioso para retardar la decoloración, pérdida de peso, la deshidratación del cáliz y las pudriciones (Kader, 2002).

En trabajos previos, se ha analizado el efecto de la baja temperatura sobre las características respiratorias de berenjena. Rodríguez y col. (2001), observaron que luego de 5 d de almacenamiento a 3 °C, junto a una posterior transferencia a 20 °C, la producción de CO<sub>2</sub> de frutos cv. 'Black Nite', se incrementó marcadamente y los niveles fueron incluso mayores a aquellos conservados todo el período a 20 °C, confirmando su susceptibilidad al frío. Asimismo,

se observó un aumento gradual de la producción de etileno a partir de valores no detectables a aproximadamente  $85 \mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$  hasta los 8 d a  $3 \text{ }^\circ\text{C}$ , para luego disminuir lentamente. Cuando estos frutos fueron transferidos a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , la producción de etileno se incrementó drásticamente (100-300 veces).

En el otro extremo, como se expresó anteriormente, la exposición a temperaturas superiores a las recomendadas genera una reducción en la capacidad de conservación y calidad de los vegetales. Las berenjenas tienen una corta vida poscosecha, de sólo 2 a 4 días si se conservan a temperatura ambiente, presentando cambios visibles que incluyen deshidratación y pérdida de brillo y firmeza (Mohammed y Brecht, 2003). En este sentido, el brillo superficial y el peso de los frutos son tenidos en cuenta al juzgar la frescura, calidad y el rendimiento de las berenjenas. Según se informa en el trabajo de Jha y col. (2002), estos parámetros disminuyeron cuadráticamente con el tiempo de almacenamiento a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  y baja humedad relativa (80-84% HR), y se relacionaron linealmente entre sí, detectándose los cambios más importantes dentro de las primeras 48 h. La pérdida de brillo podría ser atribuida al incremento de la rugosidad de la superficie, que se produce como un efecto indirecto de la pérdida de peso y deshidratación a altas temperaturas. En otro estudio, Jha y Matsuoka (2002), hallaron que la firmeza, el volumen, la densidad y el peso de los frutos se redujeron significativamente con el almacenamiento a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  o  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y 90% HR, manteniendo condiciones de comercialización sólo por 4 o 5 d, respectivamente.

Por todo lo expuesto, cabe destacar la importancia de un rápido enfriamiento de los frutos en poscosecha y de la implementación de un almacenamiento en condiciones óptimas. Finalmente, las condiciones ambientales de conservación generan también marcados efectos en la composición de los productos fruti-hortícolas. En berenjena, frutos ricos en antioxidantes, esto resulta especialmente relevante y será analizado en detalle en las próximas secciones.

## **1.9. Principales causas de deterioro poscosecha**

### **1.9.1. Pérdida de peso**

La pérdida de peso por transpiración es uno de los cambios más comúnmente apreciados y que limita la vida poscosecha de los productos vegetales, provocando pérdidas cuantitativas directas y mermas en la apariencia y textura (Hung y col., 2011; Kader, 2002; Ben-Yehoshua y Rodov, 2003). La mayoría de los productos frescos se vuelven no comercializables con niveles de pérdida de peso entre 3 y 10% (Ben-Yehoshua y Rodov, 2003). La velocidad de pérdida de agua está determinada por factores internos como las características morfológicas del producto, la relación superficie-volumen, los daños superficiales y el estado de madurez. El daño por frío puede inducir a una mayor deshidratación, como consecuencia de lesiones en la piel y del tejido interno (Hung y col., 2011). A su vez, las condiciones ambientales como la temperatura, humedad relativa y movimiento del aire, influyen en el desarrollo del fenómeno durante el almacenamiento (Kader, 2002).

Las berenjenas son altamente susceptibles a la pérdida de agua. En general, se considera que estos frutos se vuelven no comercializables luego de perder 7-10% de su peso fresco (Mohammed y Brecht, 2003). El cáliz es la principal ruta de pérdida de agua, contribuyendo al 65% del total. A su vez, en frutos pequeños o menos desarrollados, en los que la relación entre el área de cáliz y el área del fruto es alta, la pérdida relativa de agua es mayor que en berenjenas de tamaño grande (Díaz-Pérez, 1998). En la medida que la deshidratación se incrementa, se observa un detrimento del brillo superficial, el arrugamiento de la piel y el marchitamiento del cáliz (Díaz-Pérez, 1998). Para un producto y temperatura de almacenamiento dados, la tasa de transpiración se correlaciona con la HR (Hung y col., 2011). Teniendo en cuenta esto y como se expresó en la **Sección 1.8.1**, el almacenamiento de berenjenas a una humedad relativa del 90-95% resulta recomendable.

Para minimizar las pérdidas de peso durante el almacenamiento se han ensayado varios tratamientos. Cubrir con films plásticos es una opción a tener en cuenta para reducir la deshidratación (Mohammed y Brecht, 2003; Fallik, 2005). Por otro lado Hung y col. (2011), recomendaron la humidificación del ambiente con nanopartículas, observando que cuando los frutos fueron almacenados por 10 días a baja temperatura, la pérdida de peso alcanzó 5,3% empleando humidificadores con escala de partícula nanométrica (diámetro de partícula < 100 nm), respecto del 8,5% alcanzado con humidificadores ultrasónicos (diámetro de partícula = 216 nm). Massolo y col. (2011), hallaron que el tratamiento con 1-MCP redujo significativamente la pérdida de peso en berenjenas almacenadas a 10 °C. Por su parte, Hu y col. (2010), indicaron que el tratamiento con vapor de etanol, reduce efectivamente la pérdida de peso y mantiene la integridad de las membranas celulares en berenjenas frescas cortadas. Asimismo, los tratamientos que protejan al cáliz de la deshidratación, resultan beneficiosos para la extensión de la vida poscosecha (Hung y col., 2011).

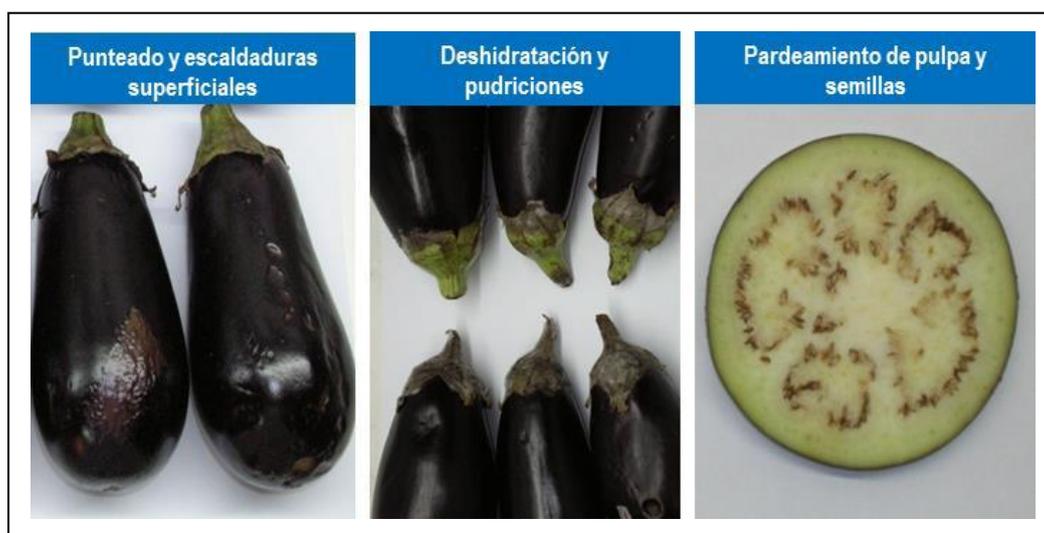
### **1.9.2. Daño por frío**

Como se mencionó anteriormente, la principal estrategia empleada para reducir el ritmo respiratorio y metabólico de las frutas y hortalizas, a fin de mantener por más tiempo su calidad poscosecha, es la conservación a bajas temperaturas. Un caso particular es el de los productos de origen tropical y subtropical, como la berenjena, dado que son sensibles al frío. Dentro de este grupo, cada especie soporta una temperatura mínima por debajo de la cual desarrollan diferentes niveles de daño (Toivonen, 2011).

Numerosos fenómenos físicos, fisiológicos y bioquímicos están relacionados con el estrés sufrido por el tejido vegetal a causa de la exposición a bajas temperaturas. En general los mecanismos que inducen lesiones, son asociados con cambios en la integridad y funcionalidad de las membranas celulares. En este sentido, se ha estudiado que la naturaleza física de los

lípidos de membrana son los responsables de la habilidad de adaptación de las plantas a las condiciones ambientales. En el caso del desarrollo de daño por frío estaría involucrado un evento inicial denominado “transición de fase”, en el que los lípidos hallados en forma de líquido cristalino, ante temperaturas menores a la crítica, evolucionan hacia una fase tipo gel-sólido (Lyons, 1973). Estos cambios generan modificaciones en el funcionamiento normal de las membranas que incluyen: alteración de reacciones enzimáticas, desbalance de procesos metabólicos, aumento de la permeabilidad y acumulación de metabolitos tóxicos. Mientras que con la exposición prolongada a las bajas temperaturas, finalmente se produce el daño y muerte celular, haciéndose visible en el producto a partir de lesiones superficiales, pardeamiento interno, lentitud en los procesos de maduración, entre otros. Asimismo, suele ocurrir la aparición de pudriciones en las zonas afectadas, por la infección secundaria de ciertos microorganismos (Salveit, 2003; Toivonen, 2011).

Las berenjenas son susceptibles al daño por frío cuando se las expone a temperaturas inferiores a 10 °C y su sensibilidad difiere con la variedad, el tamaño o grado de desarrollo y la época de cosecha (Mohammed y Brecht, 2003). La fisiopatía se caracteriza en estos frutos particularmente por pardeamiento de la pulpa y semillas, punteado o escaldaduras superficiales, pérdida de solutos, aparición de olores desagradables y aumento de pudriciones (**Figura 1.5**) (Molinar y col., 1996; Cantwell y Suslow, 2000; Concellón y col., 2005). El punteado de la piel normalmente observado, se debe al colapso de las células cercanas a la superficie y generalmente va acompañado de pardeamiento. Estas áreas dañadas pueden incrementar la susceptibilidad a infecciones y a la pérdida de agua, acentuando la extensión del daño (**Figura 1.5**) (Wills y col., 1998).



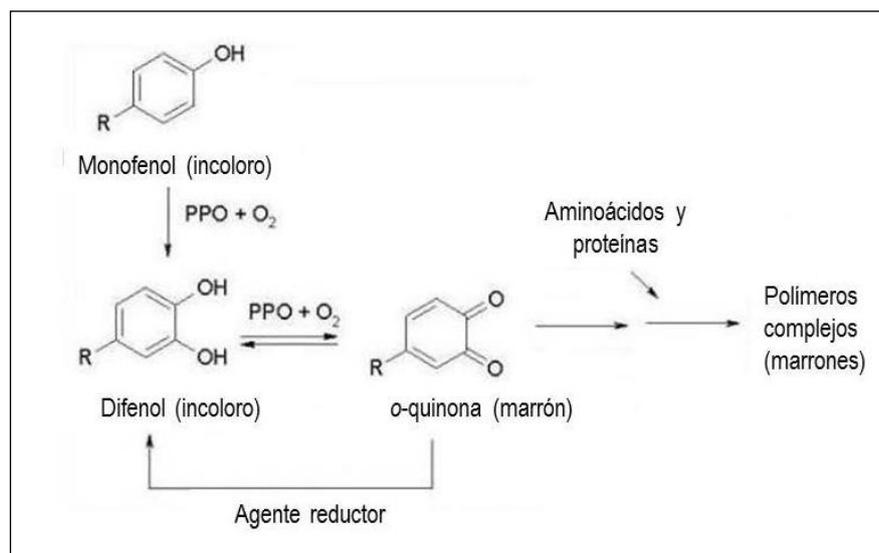
**Figura 1.5.** Síntomas de deterioro poscosecha y daño por frío en berenjena violeta.

El grado de daño es función de la temperatura así como del tiempo de exposición (Purvis, 2002; Saltveit, 2003). Según Cantwell y Suslow (2000), en berenjenas tipo Americana, las lesiones se hacen visibles luego de 1-2 d a 0 °C y en 6-7 d a 5 °C. Esos síntomas son mínimos luego de 10 d si el almacenamiento se realiza a 10 °C (Mohammed y Brecht, 2003). Por su parte, en su trabajo con berenjenas tipo Japonesa Money Maker N° 2 almacenadas a 0 o 10 °C por 15 d, Concellón y col. (2007), realizaron una caracterización detallada de la aparición de los distintos síntomas de daño por frío a través del tiempo. Los autores informaron que las berenjenas almacenadas a 10 °C no sufrieron ningún tipo de daño, mientras que a 0 °C este fenómeno limitó la vida útil a 9 d de almacenamiento. En resumen, se indicó que: luego de 2 d los frutos exhibieron cierta decoloración de la piel; a partir del día 6 se observó pérdida de brillo, incremento de la pérdida de electrolitos, incipiente punteado superficial y pardeamiento de las semillas; en tanto que al día 13, el pardeamiento interno de la pulpa y la presencia de escaldaduras en la piel fueron evidentes, sumado a una marcada pérdida de electrolitos por disrupción celular.

La susceptibilidad al daño por frío depende del estado de madurez del fruto. En la mayoría de los casos, es mayor en frutos inmaduros. Sin embargo en berenjena esto no ha sido aún determinado y es motivo de estudio en el presente trabajo de tesis. A su vez el daño por frío es acumulativo y puede iniciarse en el campo antes de la cosecha (Cantwell y Suslow, 2000). Durante el almacenamiento los síntomas se desarrollan en forma más marcada cuando el producto es transferido a temperatura ambiente (Purvis, 2002; Kader 2002).

### **1.9.3. Pardeamiento enzimático**

El pardeamiento enzimático del tejido de frutas y vegetales es una de las principales causas de pérdida de calidad durante el almacenamiento poscosecha o procesamiento, conduciendo a la formación de polímeros complejos de color marrón (melaninas). En general, es causado por la oxidación de compuestos fenólicos por parte de la enzima polifenoloxidasas (PPO, EC 1.14.18.1), que se caracteriza por presentar dos átomos de cobre en su centro activo (Tomas-Barberán y Espín, 2001). Como se observa en la **Figura 1.6**, la reacción tiene lugar cuando, en presencia de O<sub>2</sub>, PPO cataliza la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad cresolasa), y la posterior oxidación de los *o*-difenoles a quinonas (actividad catecolasa). Las quinonas son muy inestables y reaccionan con aminoácidos o proteínas generando pigmentos marrones por polimerización (Pérez-Gilabert y García-Carmona, 2000).



**Figura 1.6.** Representación esquemática de la reacción de la enzima polifenoloxidasasa (PPO) con mono y di-fenoles, en presencia de oxígeno (O<sub>2</sub>). Adaptado de Gacche y col. (2003).

Puede encontrarse una nomenclatura diferencial entre las enzimas con actividad monofenol oxidasa (EC 1.14.18.1) y catecol oxidasa (EC 1.10.3.2), sin embargo en general el término polifenoloxidasasa (PPO) se emplea para ambos. La mayoría de las plantas presentan múltiples formas de PPO y su función estaría relacionada a la resistencia frente a patógenos y herbívoros, aunque esto no ha sido aún totalmente dilucidado (Mayer, 2006). Por su parte, la enzima peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7) participa también en las reacciones de pardeamiento, catalizando la oxidación de fenoles en presencia de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, dada la baja concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el tejido de los vegetales, su contribución al deterioro es considerada en menor medida (Mishra y col., 2013). A pesar de esto su participación en procesos lentos, como el pardeamiento interno, podría ser posible.

El pardeamiento no sólo tiene efectos negativos en la apariencia, sino que también genera cambios en el sabor, olor, textura y características nutricionales del producto. En este sentido, la capacidad antioxidante de las frutas y vegetales se vería disminuida por la oxidación directa de los compuestos fenólicos (Tomas-Barberán y Espín, 2001). El problema es considerado relevante en berenjenas, por su alto contenido en este tipo de antioxidantes

(Pérez-Gilabert y García-Carmona, 2000). En general, estos frutos se comercializan como productos frescos enteros, y más recientemente como productos mínimamente procesados (Barbagallo y col., 2012; Ghidelli y col., 2013). La aparición de pardeamiento enzimático se asocia en el primer caso, al almacenamiento por períodos prolongados o al daño por frío cuando se conservan a bajas temperaturas (Pérez-Gilabert y García-Carmona, 2000; Concellón y col., 2007; Massolo y col., 2011). Mientras que en los productos frescos cortados la vida útil del producto se ve limitada, debido al rápido desarrollo de pardeamiento luego del corte y exposición del tejido al aire (Barbagallo y col., 2012; Mishra y col., 2012; Ghidelli y col., 2013). En todos los casos, se produce una alteración y daño de la estructura del tejido, con pérdida de compartimentalización celular que permite que los sustratos fenólicos, normalmente confinados en las vacuolas, sean liberados y entren en contacto con las enzimas responsables del pardeamiento ubicadas en plástidos (Concellón y col., 2007; Plazas y col., 2013a)

La medición del pardeamiento en berenjenas puede ser llevado a cabo visualmente o empleando un colorímetro, siendo este último más preciso y comúnmente utilizado (Plazas y col., 2013a). La evolución de la luminosidad ( $L^*$ ) de rodajas de berenjenas recién cortadas, es un buen indicador del pardeamiento interno durante el almacenamiento. Concellón y col. (2007) encontraron que luego de 13 d de almacenamiento a 0 °C, bajos valores de  $L^*$  correlacionaron con un severo nivel de daño por frío y de pardeamiento en pulpa y semillas, en tanto que no observaron estos síntomas en frutos almacenados a la temperatura recomendada (10 °C). Por su parte, Massolo y col. (2011) no hallaron en frutos enteros almacenados por largos períodos (21 d) a 10 °C variaciones en el parámetro  $L^*$ , sin embargo una significativa disminución se produjo con la posterior transferencia de los frutos a 20 °C. Según los autores, la disrupción del tejido asociada a la senescencia del fruto luego de un largo período de almacenamiento, junto a una inducción de las enzimas a mayor temperatura generaría la manifestación del pardeamiento. En el mismo trabajo, la aplicación de 1-MCP

logró controlar el pardeamiento inducido por daño por frío. En berenjenas frescas cortadas y almacenadas a temperatura ambiente o en refrigeración, se ha observado que el pardeamiento comienza inmediatamente luego del corte y se incrementa con el tiempo de conservación (Mishra y col., 2013; Barbagallo y col., 2012).

Numerosos trabajos han informado el rol central del nivel de actividad enzimática y contenido fenoles en berenjena ante el desarrollo de pardeamiento. Asimismo, se indica que es posible seleccionar variedades que presenten alto contenido de compuestos fenólicos, y a su vez, un bajo nivel de actividad enzimática y grado de pardeamiento, favoreciendo el mantenimiento de la calidad poscosecha y las aptitudes nutricionales del fruto (Prohens y col., 2007; Mishra y col., 2013; Ghidelli y col., 2013; Plazas y col., 2013a,b). De todos modos son muy pocos los estudios que hayan demostrado evidencias directas de que la enzima sea el factor limitante para el proceso. En tal sentido es posible que otros factores sean centrales en la extensión del pardeamiento, entre ellos la pérdida de compartimentalización celular, los cambios en el pH intracelular, el incremento de la difusión del oxígeno o de la producción de especies reactivas del oxígeno. Estos aspectos han recibido mucha menor atención. Finalmente, la presencia de otros antioxidantes en berenjena, como el ácido ascórbico, puede cumplir una función de protección frente al deterioro enzimático (Plazas y col., 2013a).

A fin de minimizar las pérdidas causadas por el pardeamiento, numerosos estudios se han llevado a cabo con el objetivo de controlar la actividad de PPO. Los mecanismos propuestos actúan ante uno o varios de los componentes necesarios para el desarrollo del fenómeno: enzima, oxígeno, cobre o sustratos. De acuerdo a esto la inhibición puede ser basada en el empleo de compuestos químicos como agentes reductores (sulfitos, ácido ascórbico), quelantes de metales (ácido sórbico, ácidos policarboxílicos, EDTA); acidulantes (ácido cítrico, málico y fosfórico) e inhibidores enzimáticos (ácido benzoico y cinámico), o a través de tratamientos físicos aplicados al producto (Quiroz y col., 2008).

### **1.10. Tecnologías de poscosecha**

Diversas tecnologías pueden ser implementadas en combinación con el almacenamiento refrigerado de los productos fruti-hortícolas, con el objetivo de disminuir o retrasar el deterioro y extender la vida poscosecha. Entre las más comúnmente empleadas se incluye la aplicación de atmósferas modificadas y controladas. Su empleo ofrece la posibilidad de extender la vida útil y mantener el nivel de compuestos bioactivos de los productos vegetales en mayor medida que el almacenamiento convencional (Li y col., 2012). En ambas tecnologías se eliminan o añaden gases para crear una composición atmosférica alrededor del producto que difiere a la del aire. En general, se busca la reducción del nivel de oxígeno ( $O_2$ ) y/o elevación del dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Estas condiciones, reducen la tasa de respiración, la producción y sensibilidad al etileno, la sensibilidad al deterioro patológico, la pérdida de peso y los cambios fisiológicos, como puede ser la oxidación (Fonseca y col., 2002).

El envasado en atmósfera modificada consiste en el empaque de pequeñas cantidades de producto en películas con propiedades particulares de permeabilidad a los gases y al vapor de agua (Salveit, 2003). Es un proceso dinámico en el que el producto y el envase herméticamente cerrado, interactúan haciendo que la atmósfera en el interior del empaque alcance el equilibrio adecuado. (Artés, 2006). Mientras que en una atmósfera controlada el producto es conservado en una cámara donde existe un continuo ajuste y monitoreo de la composición gaseosa (Raju y col., 2011; Artés, 2006).

Cantwell y Suslow (2000) han indicado que las berenjenas muestran una respuesta moderada a la aplicación de atmósfera modificada y controlada durante el almacenamiento o transporte. Según los autores, las bajas concentraciones de  $O_2$  (3-5%) pueden retrasar el deterioro y la aparición de pudriciones sólo por unos pocos días, a su vez que aunque los frutos toleran hasta 10% de  $CO_2$ , la vida de almacenamiento no se extendería mucho más en

presencia de altos niveles de este gas. Otros autores sin embargo han encontrado ciertas ventajas en el empleo de estas tecnologías. Arvanitoyannis y col. (2005) observaron que frutos de berenjenas almacenados en bolsas de polietileno a 10 °C bajo atmósfera activa (70% N<sub>2</sub> y 30% CO<sub>2</sub>) presentaron mejores niveles de vitamina C, firmeza y calidad sensorial que aquellas refrigeradas. Por su parte, Rodríguez y col. (2001) y Fallik y col (1995) encontraron que el almacenamiento de berenjenas en bolsas de polietileno no perforado (atmósfera modificada pasiva) a 3 °C u 8 °C, respectivamente, redujo el daño por frío. Concellón (2003) también halló un retraso del 15-20% de los síntomas de daño por frío al almacenar berenjenas de tipo Japonesa con films PD941 y LDPE (Cryovac) a 0 °C por 15 días, logrando una atmósfera de 15,3-1,8 y 18,0-3,0 de O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>, respectivamente. Asimismo, en un estudio reciente, las películas de polietileno conservaron eficazmente la apariencia externa y redujeron la pérdida de peso en frutos de berenjena cv. 'Embú', almacenados por 15 d a temperatura ambiente (De Souza y col., 2009). Mientras que Catalano y col. (2007) observaron que la aplicación de atmósfera modificada mejoró los parámetros de vida útil y la calidad de berenjenas frescas cortadas. La aplicación de atmósfera controlada con niveles de 3% O<sub>2</sub> y 3% de CO<sub>2</sub>, logró prolongar la vida útil de los frutos de berenjena por un período de 6 semanas, observándose mejor aspecto general y escasa reducción en el nivel de azúcares totales y ácido ascórbico (Kaynas y col., 1995). Mientras que en el mismo estudio los autores hallaron que un alto nivel de CO<sub>2</sub> (2% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) generó daños.

### **1.11. Procesamiento**

El consumo y comercialización de frutas y vegetales frescos está generalmente limitado a un corto período de tiempo debido a varias razones, entre ellas la perecibilidad de los productos, la estacionalidad y la naturaleza regional de la producción. Sumado a esto, un pobre manejo poscosecha podría determinar un incremento de las pérdidas por deterioro

microbiológico y por reducción de la calidad (Alvarez y Trystram 1995). Más allá de la refrigeración, la congelación y la deshidratación o secado de los vegetales, son las formas de preservación más ampliamente difundidas y tienen relevancia económica tanto para productos enteros como elaborados. Por ello se cree que un procesamiento eficaz, en muchas ocasiones es necesario. Estas operaciones permiten preservar los vegetales por un período de tiempo más amplio del que abarca su ciclo de producción, y también ofrecer otras formas de presentación (Wu y col., 2004; Muthukumarappan y Tiwari, 2011).

La congelación es generalmente considerada superior en la retención de la calidad nutritiva y sensorial respecto de otros métodos como el enlatado y secado, y suele emplearse con éxito en el almacenamiento a largo plazo de numerosas frutas y vegetales (Fennema, 1977). Con la congelación se busca reducir o inhibir las reacciones químicas y enzimáticas, el crecimiento microbiano, la pérdida de agua, la respiración, entre otros factores que afectan la calidad y la vida útil (Campañone y col. 2002). Sin embargo, estas reacciones en muchos casos no se detienen por completo, por lo que puede requerirse un tratamiento complementario como el escaldado para su control. Este implica, el tratamiento térmico de los productos en agua o vapor, por cortos períodos de tiempo. Las ventajas asociadas a escaldado incluyen la inactivación de enzimas, reducción de la carga microbiana, eliminación de los gases en el tejido, fijación de la textura y el color, participando en la prevención del desarrollo de malos olores, cambios en la textura y pérdidas de nutrientes (Bahçeci, y col., 2005).

A pesar de esto, sólo unos pocos estudios han informado sobre el efecto de la congelación en la calidad de los frutos de berenjenas. Si bien es un método de preservación ampliamente utilizado en frutas y vegetales, cierta pérdida de calidad durante el almacenamiento congelado puede ocurrir. En berenjenas particularmente, suele producirse el pardeamiento de las semillas y la modificación de la textura (Maestrelli y col., 2003). En relación a esto, Wu y col. (2008), evaluaron la estructura del tejido de berenjena por

espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS), después de un tratamiento de congelación-descongelación y determinaron que la muestra pierde su carácter original dado que las membranas celulares resultan dañadas por los cristales de hielo, generando durante la descongelación pérdida de turgencia y electrolitos, junto a un detrimento de la textura y apariencia. El estudio de estas propiedades, resultaría entonces necesario a fin de encontrar condiciones de proceso que minimicen estos efectos. Por su parte, Maestrelli y col. (2003), analizaron berenjenas partenocárpicas sometidas a congelación, y hallaron que estos frutos presentaron luego de 15 meses de almacenamiento a -20 °C, bajo nivel de pardeamiento y mejor textura respecto de los frutos control (con semillas). Según los autores, la partenocarpia puede ser un rasgo importante a considerar cuando se requiera el procesamiento congelado.

En tanto, el secado es utilizado en frutas y vegetales dado que ofrece diversas ventajas respecto del producto fresco: reducción de la masa para un fácil manejo y transporte, extensión del tiempo de conservación y reducción del deterioro enzimático y microbiológico. Así, una amplia gama de vegetales secos pueden hallarse en el mercado, en forma de finas rodajas o en polvo. La reducción de la humedad induce cambios en la forma, densidad y porosidad del tejido; y se busca que luego de la rehidratación, los productos muestren una buena calidad sensorial y nutricional (Ahmed, 2011; Brasiello y col., 2013). La calidad de los vegetales secos depende del tipo y las condiciones de secado (tiempo y temperatura), así como de la composición y las propiedades físicas de la materia prima. Los principales problemas a resolver, en términos de calidad, se deben a la ocurrencia de contracción, disminución de la capacidad de rehidratación, cambios en sabor, aroma o color y pérdida de nutrientes (Sablani, 2006). Además del secado convencional por aire o solar, otras tecnologías como el secado a vacío, por microondas, la deshidratación osmótica o liofilización están siendo cada vez más empleadas.

En berenjena los estudios se han basado en general en la evaluación de los efectos del secado sobre las propiedades texturales de los productos secos y/o rehidratados. Santacatalina y col. (2011), analizaron el efecto de diferentes tipos de procesamiento (aire caliente, secado por congelación a presión atmosférica y liofilización) sobre la textura de cubos de berenjena (10 mm de lado) y su cinética de rehidratación. Las muestras sometidas a secado por congelación a presión atmosférica presentaron propiedades intermedias, con una capacidad de rehidratación más rápida que aquellas secadas por aire caliente y una dureza ligeramente superior a las muestras liofilizadas. Según los autores, esta sería una alternativa interesante para lograr productos secos de berenjena de buena calidad y a menor costo. Por su parte, Russo y col. (2013), investigaron los cambios estructurales (firmeza) inducidos en rodajas de berenjena por el secado por aire a diferentes temperaturas (40, 50, 60 y 70 °C), y su efecto sobre el proceso de rehidratación. Los mejores resultados fueron obtenidos a temperatura intermedia (60 °C). Un mayor tiempo o temperatura de secado, determinaron daños en la estructura del tejido. Una tecnología de secado novedosa fue aplicada por Puig y col. (2012), quienes evaluaron los cambios estructurales en berenjena inducidos por un secado por aire convencional y uno asistido por ultrasonido (45 o 90 W). Mientras que la microestructura del tejido se vio negativamente afectada durante el secado convencional, ésta se conservó en mayor medida ante la aplicación de una energía ultrasónica moderada (45 W), debido al menor tiempo de secado y a los menores efectos mecánicos sobre las células de un tratamiento de ultrasonido leve.

## 2. ANTIOXIDANTES

### 2.1. Especies reactivas del oxígeno y daño oxidativo

El cuerpo humano está bajo constante estrés oxidativo, esto se debe a que todos los organismos aerobios requieren oxígeno para la producción eficiente de energía, sin embargo durante la respiración ocurren procesos oxidativos que implican transferencia de electrones y liberación de radicales libres. Un radical libre es una especie química con uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos. Debido a su configuración electrónica, son inestables y extremadamente reactivos, tendiendo a captar un electrón de moléculas biológicas, a fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. La molécula que cede el electrón se convierte a su vez en un radical libre, iniciándose así una reacción en cadena (Halliwell, 1999).

Aunque ciertas condiciones ambientales favorecen la formación de radicales libres, los procesos fisiológicos normales del organismo generan *per se* cierta cantidad de estas sustancias oxidantes y no todas las reacciones de radicales libres en los sistemas vivos son perjudiciales (Beckman y Ames 1998; Lee y col., 2004). En la cadena respiratoria se generan a partir del oxígeno, especies parcialmente reducidas y altamente reactivas denominadas *especies reactivas del oxígeno* (ERO's). Estas moléculas son el resultado de la excitación del  $O_2$  a la forma de oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), o de la transferencia de uno, dos o tres electrones, para formar el radical superóxido ( $O_2\cdot$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ), respectivamente. En condiciones de estrés, las ERO's se producen en cantidades exacerbadas (Halliwell, 1999). Por su parte, los estímulos exógenos que incrementan la generación de especies oxidantes se destacan diversos tipos de radiación, contaminantes ambientales, la metabolización de fármacos, el humo del tabaco, la acción de células del sistema inmunológico, o dietas deficientes en antioxidantes (Beckman y Ames, 1998).

De acuerdo a esto, la citotoxicidad de las ERO's en los seres vivos se produce cuando su generación excede la capacidad antioxidante del organismo, en un proceso denominado "estrés oxidativo". Las alteraciones celulares y metabólicas por acción de las ERO's sobre proteínas (alteraciones estructurales), lípidos (reacción en cadena de peroxidación) y ADN (deleciones, roturas), dan lugar a numerosos procesos fisiopatológicos (Lee y col., 2004). Así, cuando las moléculas biológicas son dañadas oxidativamente, sufren alteraciones en su funcionalidad, con la consecuente pérdida de homeostasis, aparición de enfermedades y posible muerte celular (Jeremy y col., 2004). Numerosos trabajos han estudiado la implicancia de las ERO's en el desarrollo de patologías humanas, especialmente en relación a enfermedades cardiovasculares, neurológicas, inflamatorias, cáncer y en los procesos de envejecimiento (Ames y col., 1993; Halliwell, 1996; Yang y col., 2008).

Para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo, los seres vivos poseen diferentes sistemas de defensa antioxidante integrados por sistemas enzimáticos y no enzimáticos o químicos. Desde el punto de vista biológico los antioxidantes son compuestos capaces de oponerse a la oxidación celular (Vicente y col., 2009). Mientras que en una definición más amplia, Halliwell (1999), los describe como aquellas moléculas capaces de retrasar o inhibir la oxidación de un sustrato. A nivel celular existen diversas enzimas que son capaces de modular el estrés oxidativo y que resultan una primera línea de defensa al prevenir la generación de las especies radicales derivadas del oxígeno molecular. Entre ellas se destacan la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT). La SOD facilita la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno, mientras que GPX, APX y CAT son capaces de transformar el peróxido de hidrógeno en agua (Morales-Gómez, 2011). Si el desbalance continúa, un grupo de enzimas reparadoras actúa a continuación, para revertir el daño o prevenir futuras lesiones en los constituyentes celulares (Castenmiller, 2000). Para apoyar estos sistemas de defensa, actúan diferentes tipos de antioxidantes que

incluyen componentes endógenos, como las proteínas de suero y sus grupos tiol, bilirrubina y glutatión y compuestos antioxidantes provenientes de la dieta, que incluyen entre otros grupos importantes a algunas vitaminas y a los compuestos fenólicos (Castenmiller, 2000; Morales-Gómez, 2011).

## **2.2. Antioxidantes en frutas y hortalizas**

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que las dietas ricas en frutas y hortalizas y otros alimentos de origen vegetal (como el té y el vino), se asocian con un menor riesgo de muerte por patologías crónicas, tales como enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer, entre otras (Stanner y col., 2004; Scalbert y col., 2005). Estos efectos beneficiosos se han atribuido en gran parte al aporte de compuestos que poseen actividad antioxidante, dentro de los que se encuentran el ácido ascórbico (AA, vitamina C), carotenoides, tocoferoles y tocotrienoles (vitamina E), y compuestos fenólicos (Ames y col., 1993; Li y col., 2012). En la actualidad, todos ellos se incluyen dentro del grupo de compuestos denominados bioactivos, los cuales se definen como sustancias no nutritivas, que se encuentran en concentraciones muy bajas, intervienen en el metabolismo secundario de los vegetales y pueden tener un impacto significativo en la salud humana por su contribución al sistema de defensa antioxidante. Estas moléculas no pueden ser sintetizadas por el organismo y deben ser obtenidas de la dieta (Kris-Etherton y col., 2002).

A continuación se detallarán las características de los compuestos antioxidantes más representativos presentes en frutas y hortalizas:

### **2.3. Ácido ascórbico (AA)**

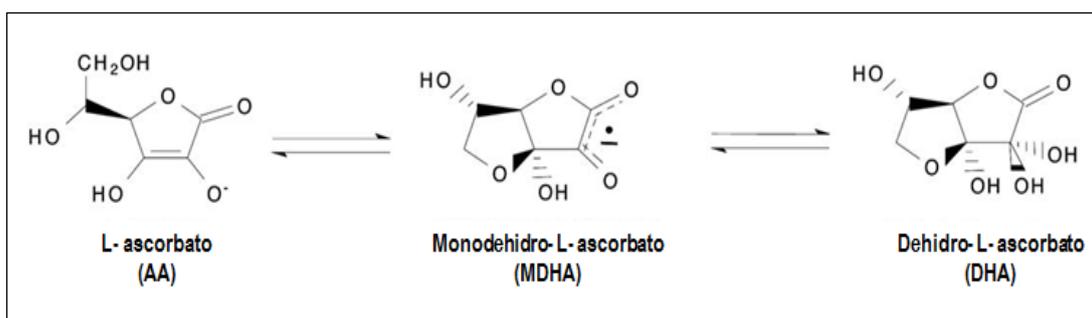
El concepto vitamina C engloba a dos compuestos: el ácido ascórbico (AA) y su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico (DHA), ambos solubles en agua y considerados potentes antioxidantes (Sanchez-Mata y col., 2000). La importancia nutricional de la vitamina C resulta del hecho de que se encuentra dentro del grupo de vitaminas esenciales y su carencia produce deficiencias en la formación de colágeno, afectando a los huesos y articulaciones (Moralez-Gomez, 2011). Además del colágeno, la vitamina C participa en la síntesis de ADN, bilis y neurotransmisores tales como la serotonina y la carnitina, esta última transporta los ácidos grasos de cadena larga desde el citosol a las mitocondrias para la producción de energía. La vitamina C también ayuda a asegurar los niveles adecuados de diversas hormonas como tiroxina, epinefrina, norepinefrina y esteroides (Thompson y col., 2010). El ser humano es incapaz de sintetizarla, debido a que el gen que codifica para la última enzima en la ruta biosintética no es funcional, por lo que debe ingerirse a través de la dieta (Chatterjee, 1973).

Para los adultos, las necesidades dietéticas se cumplen por un consumo mínimo de 60 y 75 mg día<sup>-1</sup> para hombres y mujeres en edad adulta, respectivamente. Las frutas y vegetales son las principales fuentes dietéticas de vitamina C. Su concentración depende del producto considerado, pudiendo variar entre 1 a 150 mg 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco. Algunas frutas tropicales y vegetales de hoja son ricos en ácido ascórbico. También se consideran buena fuente frutos como la frutilla, el kiwi, los pimientos y los cítricos (Vicente y col., 2009). El AA se caracteriza por ser un compuesto muy inestable, sensible a la luz, al oxígeno y a la temperatura, especialmente cuando la reacción de oxidación está catalizada por iones metálicos como el Cu<sup>2+</sup> y el Fe<sup>3+</sup> (Fennema, 2000).

La acción antioxidante del AA es bien conocida, reaccionando directamente con los radicales libres al donar electrones a estas especies, por lo que previene el daño oxidativo de células y tejidos (Thompson y col., 2010). El ácido ascórbico es eficaz en la captación de los

radicales anión superóxido e hidroxilo, así como en la neutralización del peróxido de hidrógeno, oxígeno singulete y óxido de nitrógeno reactivo (Barros y col., 2011).

Como puede observarse en la **Figura 2.1.**, el primer producto de la oxidación del AA es un radical libre denominado monodehidroascorbato (MDHA), que dismuta espontáneamente a AA y a ácido deshidroascórbico (DHA), por lo que en principio se mantendría el valor como vitamina C (Macarrone, 1993; Potters y col., 2002). Estas dos formas oxidadas son utilizadas por la célula para regenerar ácido ascórbico mediante la acción de enzimas solubles o ligadas a membrana que emplean al glutatión como donador de electrones. El glutatión se restaura a su forma antioxidante por la enzima glutatión reductasa, en una reacción dependiente de selenio (Thompson y col., 2010, Carocho y Ferreira, 2013). Esta combinación de reacciones que regeneran el AA se conoce como el ciclo de Halliwell-Asada. La vitamina C es además esencial en la protección de enzimas que poseen metales de transición (Buettner y Jurkiewicz, 1996; Sharma y Buettner, 1993) y regenera la vitamina E mediante la reducción del radical tocoferoxilo, pudiendo el tocoferol recuperar así su funcionalidad.



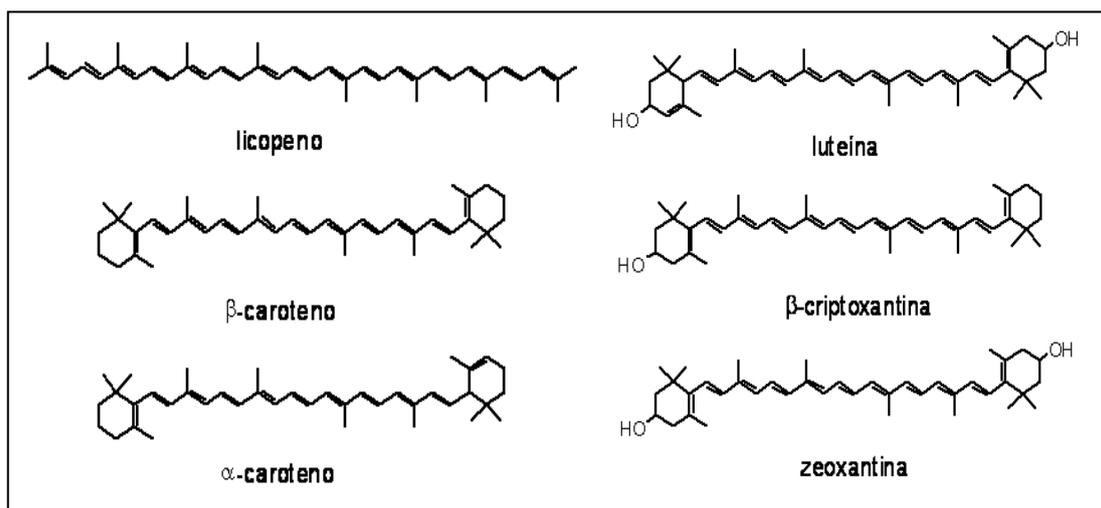
**Figura 2.1.** Ácido ascórbico y sus productos de oxidación. Adaptado de Potters y col. (2002).

## 2.4. Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de pigmentos liposolubles, comunes en la naturaleza y responsables del color amarillo, naranja y rojo de muchas plantas, flores y frutos. Estos pigmentos poseen en las plantas la función de colaborar en la intercepción de radiación que se transfiere a los centros fotosintéticos (Kopsell y Kopsell, 2006). Su importancia radica en la función clásica que cumplen en el metabolismo de los mamíferos algunos carotenoides como precursores de la vitamina A, y más actualmente han recibido a su vez gran atención por sus propiedades antioxidantes (Vicente y col, 2009; Stahl y Sies, 2003). Las provitaminas son formas inactivas de vitaminas que el cuerpo no puede utilizar hasta que se convierten en su forma activa. El organismo humano puede convertir  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina a retinol, por lo que sólo estos compuestos se refieren como provitamina A. Frutas y vegetales de color rojo, naranja y amarillo, presentan altos contenidos de  $\beta$ -caroteno y otros carotenoides, como luteína y licopeno. Los tomates, zanahorias, melón, batata, calabaza, damascos y verduras de hoja como la col rizada y las espinacas, son buenas fuentes de carotenoides. Consumir las cantidades recomendadas de frutas y vegetales cada día garantiza una ingesta adecuada (Thompson y col., 2010).

La estructura de los carotenoides determina sus funciones biológicas y antioxidantes (**Figura 2.2**). La mayoría de estos compuestos derivan de una cadena basal de 40 carbonos, que incluye un sistema de dobles enlaces conjugados. Esta cadena puede llevar grupos cíclicos terminales que en algunos casos se encuentran sustituidos con grupos funcionales que contienen oxígeno. De acuerdo a esto y sobre la base de su composición, los carotenoides se dividen en dos clases: *carotenos* que contienen sólo átomos de carbono e hidrógeno como el  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno y *xantófilas* que llevan al menos un átomo de oxígeno en su molécula, entre ellas se encuentran la luteína,  $\beta$ -criptoxantina y zeaxantina (Stahl y Sies, 2003). El patrón de dobles enlaces conjugados en la cadena poliénica determina sus

propiedades de absorción de luz e influye en la actividad antioxidante. Los carotenoides son moléculas lipofílicas que tienden a acumularse en membranas celulares o formando parte de lipoproteínas. Esta propiedad también influye en sus características de absorción, transporte y excreción en el organismo (Britton, 1995; Stahl y Sies, 2003).



**Figura 2.2.** Estructura de los principales compuestos carotenoides en frutas y vegetales.

Entre las diversas estrategias de defensa celular frente al estrés oxidativo, los carotenos ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno), y algunas xantófilas (zeaxantina y luteína) se reconocen por ser muy efectivos en el secuestro de dos especies reactivas del oxígeno, el oxígeno singlete molecular ( $^1O_2$ ) y los radicales peroxilo (Castenmiller, 2000; Stahl y Sies, 2003). La capacidad de estos compuestos de desactivar el oxígeno singlete se relaciona con el número de dobles enlaces en la molécula. Los carotenoides con 9-11 dobles enlaces conjugados, son ricos en electrones y pueden absorber la energía del oxígeno singlete y distribuirla a través de los enlaces simples y dobles en la molécula. Luego de esta reacción, el oxígeno vuelve a su estado triplete basal ( $^3O_2$ ) de menor energía. Los carotenoides, no se destruyen durante el proceso y pueden repetir el ciclo con moléculas adicionales de oxígeno singlete (Castenmiller, 2000). Por su parte, el mecanismo antioxidante de los carotenoides propuesto para el control

de radicales peroxilo, generados en la oxidación de lípidos, incluye la transferencia de electrones resultando en la formación de cationes radicales carotenoides; reacciones de adición que forman radicales carotenoides aductos y reacciones en las que los carotenoides actúan como donantes de átomos de hidrógeno formando radicales carotenoides neutros (Castenmiller, 2000). Como se mencionó anteriormente, su carácter lipofílico y la propiedad específica para eliminar radicales peroxilo, les permite desempeñar un importante papel en la protección de las membranas celulares. La actividad antioxidante de los carotenoides depende además de la tensión de oxígeno presente en el sistema. A bajas presiones parciales de oxígeno, tales como las que se encuentran en la mayoría de los tejidos en condiciones fisiológicas, el  $\beta$ -caroteno inhibe la oxidación. En contraste, su actividad antioxidante inicial es seguida por una acción pro-oxidante a altas presiones de oxígeno (Stahl y Sies, 2003).

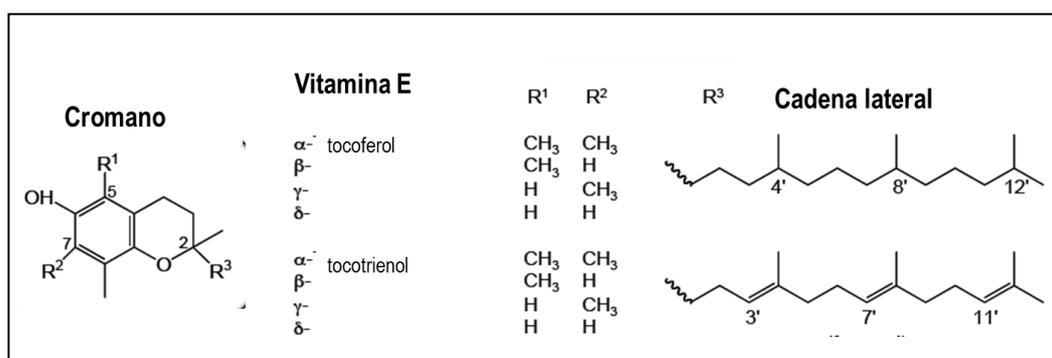
Finalmente, existen evidencias de efectos cooperativos de los carotenoides con otros antioxidantes, por ejemplo experiencias "*in Vitro*" han demostrado que el  $\beta$ -caroteno puede regenerar el tocoferol desde el radical tocoferil, mientras que el radical carotenoide resultante puede posteriormente ser reparado por la vitamina C. En comparación con los antioxidantes individuales, las vitaminas E, C y el  $\beta$ -caroteno mostraron efectos sinérgicos en el secuestro de especies reactivas de nitrógeno. Asimismo, interacciones sinérgicas entre  $\beta$ - caroteno y  $\alpha$ - tocoferol resultaron en una inhibición de la peroxidación lipídica significativamente mayor que la suma de las inhibiciones individuales (Stahl y Sies, 2003).

## 2.5. Tocoferoles y tocotrienoles

La vitamina E, comprende ocho isoformas que incluyen cuatro tocoferoles ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol) y cuatro tocotrienoles ( $\alpha$ -tocotrienol,  $\beta$ -tocotrienol,  $\gamma$ -tocotrienol y  $\delta$ -tocotrienol), siendo el  $\alpha$ -tocoferol la forma más activa y abundante de la vitamina E en los sistemas biológicos (Carocho y Ferreira, 2013). La dosis diaria recomendada

de  $\alpha$ -tocoferol es de 15 mg por día (Thompson y col., 2010). En general sus niveles son abundantes en semillas oleaginosas, aceitunas, nueces, maní, palta y almendras. En brócoli y hortalizas de hoja si bien se presentan en menor cantidad, estos productos se encuentran bien provistos (Vicente y col., 2009).

Como puede observarse en la **Figura 2.3**, todos los constituyentes de vitamina E contienen una cabeza cromano (con un anillo heterocíclico y un anillo fenólico) y una cola fitol que contiene tres enlaces dobles aislados en el caso de los tocotrienoles.



**Figura 2.3.** Estructura de las diferentes isoformas de la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles).  
Adaptado de Lampi (2011).

Estructuralmente las diferencias entre estas formas se basan en el grado de metilación del anillo cromano. El anillo aromático presente en todos los isómeros posee un grupo hidroxilo el cual puede donar un átomo de hidrógeno para reducir los radicales libres (Vicente y col., 2009; Meyer, 2011). En este sentido, la actividad antioxidante constituye la principal función de la vitamina E. Dada su naturaleza lipofílica, es frecuente en los tejidos adiposos y en las membranas celulares, protegiendo especialmente a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's). La vitamina E también protege de la oxidación a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), glóbulos rojos y blancos junto a otros componentes del sistema inmunológico, y juega un papel crítico en la protección de las células de los pulmones que están constantemente expuestos al oxígeno. Es fundamental para el normal desarrollo de los nervios y músculos

durante la primera infancia. La vitamina E también mejora la absorción de la vitamina A si la ingesta dietética es baja (Thompson y col., 2010).

## **2.6. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos se distribuyen ampliamente en el reino vegetal y son los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas. En la actualidad se conocen más de 8.000 estructuras fenólicas diferentes que parten de moléculas simples a compuestos altamente polimerizados. Todas ellas se caracterizan por presentar al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo y pueden dividirse en varias clases, de acuerdo al número de átomos de carbono presentes en conjunción con la estructura fenólica básica. Entre los más importantes se distinguen: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y otros compuestos menos comunes como estilbenos y lignanos (Dai y Mumper, 2010; Michalak, 2006). Como puede observarse, los compuestos fenólicos son un grupo heterogéneo de productos, con distintas características de solubilidad de acuerdo a la complejidad de su estructura: algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos y por lo tanto solubles en agua, y otros son polímeros de gran tamaño y resultan insolubles (Taiz y Zeiger, 2006).

Los fenoles muestran también una multiplicidad de funciones en la planta: pueden actuar como mecanismo de defensa ante herbívoros y patógenos, proveen soporte mecánico, atraen polinizadores, algunos de ellos son pigmentos que absorben la radiación ultravioleta y otros actúan como agentes alelopáticos, reduciendo por ejemplo el crecimiento de plantas competidoras (Taiz y Zeiger, 2006). Los compuestos fenólicos se encuentran en frutas, vegetales, cereales y algunas bebidas como el té, café, vino y cerveza; y son por lo tanto constituyentes integrales de la dieta humana. En los alimentos de origen vegetal los fenoles contribuyen a la estabilidad oxidativa y son en parte responsables de algunas propiedades

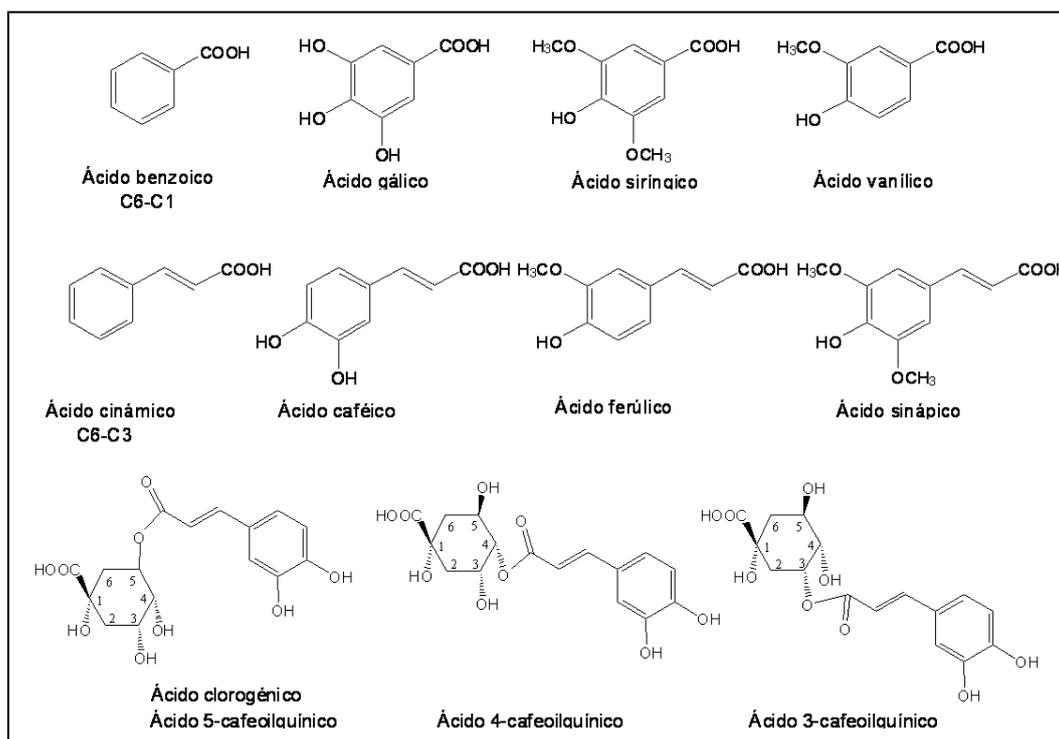
organolépticas, como amargor, astringencia, color, sabor y olor (Pandey y Rizvi, 2009; Dai y Mumper, 2010).

En los últimos años la atención sobre los compuestos fenólicos se ha incrementado marcadamente, esencialmente por el conocimiento en base a estudios epidemiológicos, tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”, de sus propiedades antioxidantes y de los efectos en la prevención de diversas enfermedades crónicas. Asimismo, se ha hallado que los compuestos fenólicos pueden modular la actividad de una amplia gama de receptores enzimáticos y celulares. De esta manera, estos compuestos cumplirían además otras funciones biológicas en la prevención y el tratamiento de enfermedades (Dai y Mumper, 2010). Entre éstas se destacan efectos vasodilatadores, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, efectos estrogénicos, o inhibición de enzimas pro-oxidantes (Pandey y Ibrahim Rizvi, 2009).

### 2.6.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos pueden dividirse en dos clases: derivados del ácido benzoico (C6-C1) y derivados del ácido cinámico (C6-C3) (**Figura 2.4**). En el primer grupo se incluyen el ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido siríngico, ácido salicílico y ácido vainílico. Mientras que los derivados hidroxicinámicos comunes son: ácido cinámico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido sinápico. Se ha encontrado que el ácido caféico es el compuesto más abundante en frutas (75-100% del total de ácidos hidroxicinámicos), mientras que el ácido ferúlico es el más abundante en cereales (Gharras, 2009). Raramente estos ácidos se encuentran de forma libre, sino que en general forman derivados glicosilados o ésteres. Normalmente forman ésteres con los ácidos quínico, shikímico o tartárico. Por ejemplo, el ácido clorogénico (CGA), éster de los ácidos cafeico y quínico (**Figura 2.4**), es uno de los más abundantes en la naturaleza y constituye el principal compuesto fenólico soluble en berenjena

resultando el mayor contribuyente a la alta actividad antioxidante de este fruto. De hecho, las berenjenas se encuentran entre los diez vegetales con mayor capacidad antioxidante (Cao y col., 1996; Plazas y col., 2013b). El CGA es predominante también en papa, ciruela, alcaucil y café (Niggeweg y col., 2004; Vermerris y Nicholson, 2006).



**Figura 2.4.** Estructura del ácido benzoico, ácido cinámico, ácido clorogénico y sus derivados.

En general se denomina ácido clorogénico al ácido 5-cafeoilquinico, mientras que también pueden hallarse los correspondientes isómeros esterificados en las posiciones 3 y 4 (ácidos 3-cafeoilquinico y 4-cafeoilquinico) (Figura 2.4).

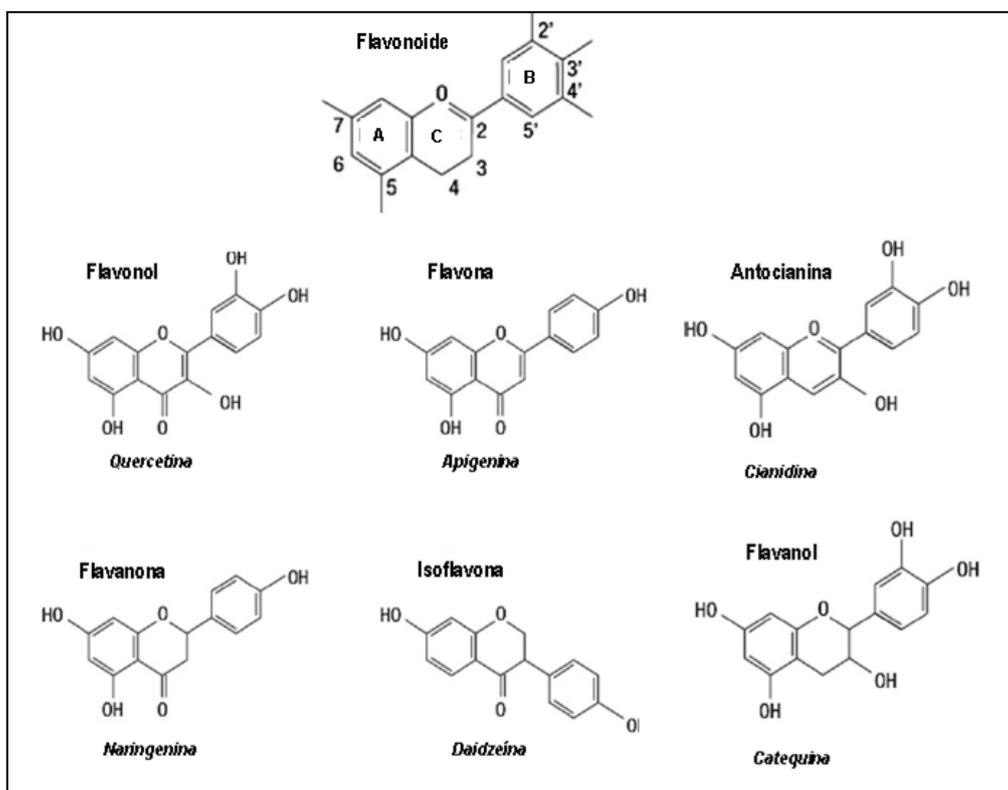
La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre, y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático con especial incidencia en el control de radicales hidroxilo, peroxilo, aniones superóxido y peroxinitritos (Duthie y col., 2003, Carochó y Ferreira, 2013). Los compuestos fenólicos poseen

además una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre) y por tanto para inhibir la formación de radicales libres a través de la reacción de Fenton (Rice-Evans y col., 1997). La efectividad como antioxidantes de estos compuestos se relaciona, de esta forma, con el número y posición de los grupos –OH en relación al –COOH. Así compuestos di y tri-hidroxilados (ácidos cafeico y gálico, respectivamente) poseen mayor capacidad antioxidante que un ácido mono-hidroxilado. Esto conlleva a que el CGA clorogénico y otros ésteres del ácido cafeico sean considerados dentro de los agentes secuestradores de radicales más potentes existentes en plantas (Sawa y col., 1999; Nakatani y col., 2000). El CGA es bien conocido por tener diversas acciones biológicas. Estas incluyen propiedades antiinflamatorias y analgésicas, anticancerígenas, antimicrobianas, antimutagénicas, efectos neuro- y cardio- protectoras, hipotensoras, entre otras (Garras y col., 2009; Plazas y col., 2013b).

### **2.6.2. Flavonoides**

La estructura básica de los flavonoides es el núcleo flavano, que contiene 15 átomos de carbono dispuestos en tres anillos (A, B y C). En él, dos anillos aromáticos (A y B) se unen entre sí por tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (**Figura 2.5**). De acuerdo a la variación de la función del heteroátomo involucrado y el grado de insaturación del anillo C, los flavonoides pueden dividirse en seis sub-clases: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, antocianinas e isoflavonas, las cuales se detallan en la **Figura 2.5**. La estructura básica de los flavonoides puede tener numerosos sustituyentes. Los grupos hidroxilo están normalmente presentes y los azúcares son muy comunes, de forma tal que la mayoría de los flavonoides existen naturalmente como glucósidos (Crozier y col., 2009). De acuerdo a esto, las diferencias individuales dentro de cada grupo surgen de la variación en el número y disposición de los grupos hidroxilo y del grado de alquilación y/o glicosilación (Dai y Mumper, 2010; Pandey y Rizvi, 2009). Existe una relación directa entre la estructura de los flavonoides y la capacidad

secuestrar radicales libres y quelar metales como el hierro. Actúan además inhibiendo enzimas como lipoxigenasa, NADPH oxidasa y xantina oxidasa (Heim y col., 2002).



**Figura 2.5.** Estructura básica y estructuras de las diferentes sub-clases de flavonoides. Adaptado de Ignat y col. (2011).

Los flavonoles son los flavonoides más extendidos en las plantas. Singh y col. (2009) hallaron por primera vez trazas de compuestos de este tipo (quercetina-3-glucósido, quercetina-3-ramnósido y miricetina-3-galactósido) en extractos de la pulpa de berenjena.

Por su parte las antocianidinas también se encuentran ampliamente difundidas en el reino vegetal y constituyen una clase de pigmentos hidrosolubles, responsables de los colores rojo, azul y violeta de flores y frutos. Se encuentran a su vez en otros órganos de las plantas como hojas, tallos, semillas y raíces. Las antocianidinas se nombran de acuerdo a la planta de la que se obtuvieron originalmente, recibiendo el nombre de pelargonidina, cianidina, delphinidina (Salisbury y Ross, 1994). Otras antocianidinas importantes presentes en vegetales

son la peonidina, petunidina y malvinidina (**Figura 2.5**). Estas antocianidinas difieren sólo en el número de grupos hidroxilo unidos al anillo B de la estructura flavonoide básica. Las antocianidinas se hallan glicosiladas en los tejidos de las plantas para formar las antocianinas, por lo común con una o dos unidades de glucosa, galactosa o rutinósido, unidas al grupo hidroxilo del anillo central o al grupo hidroxilo localizado en la posición 5 del anillo (Leng y Qi, 2003, Kaihkonen y Heinonen, 2003).

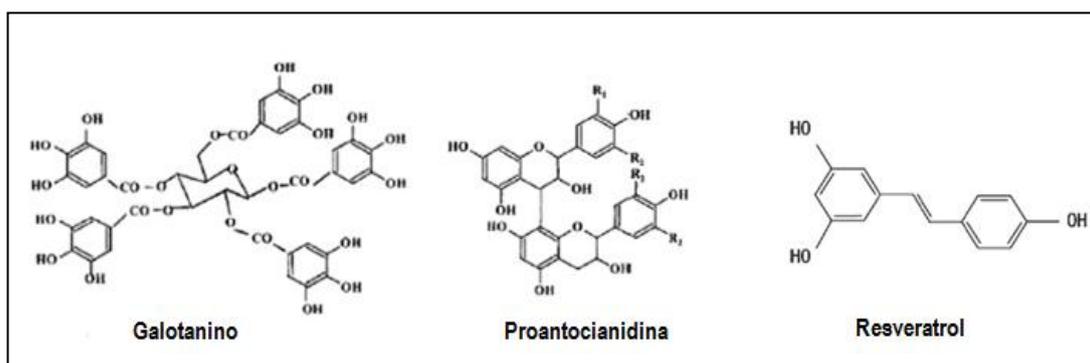
Las antocianinas pueden existir en una variedad de formas: protonadas, desprotonadas, hidratadas o isoméricas. La proporción de cada una de estas depende el pH. El catión flavilio rojo predomina a pH muy ácido (pH 1-3), mientras que en medios acuosos (pH 4-5), las reacciones de hidratación generan carbinol incoloro, que puede promover a su vez la formación de chalconas de color amarillo (pH 2,5-5,0). El catión flavilio puede ser también transformado por transferencia de protones, en aniones de color azul púrpura a pH entre 6 y 7. Estas formas desempeñan un papel importante en la acción antioxidante. Asimismo, los enlaces conjugados permiten la deslocalización electrónica generando radicales muy estables. El grado de hidroxilación y metoxilación y la posición de estos en el anillo B afectan también su estabilidad, reactividad y capacidad antioxidante. En conjunto, estos factores estructurales modulan la capacidad de las antocianinas para actuar como captadores de radicales libres y quelantes de metales (Kaihkonen y Heinonen, 2003).

Sakamura y col. (1965) hallaron que el color violeta oscuro de la berenjena es impartido principalmente por antocianinas derivadas de la delfinidina, lo que más tarde fue confirmado por Matsuzoe y col. (1999). Así se conoce que en algunos casos prevalece la estructura delfinidin-3-(*p*-coumaril-rutinósido)-5-glucósido (Nasunin), mientras que en otros se presenta mayoritariamente delfinidin-3-rutinósido (Tulipanin). Noda y col. (2000) hallaron que nasunin presenta una fuerte actividad antioxidante, en muchos casos mayor a otras antocianinas, considerándola un potente eliminador de radicales anión superóxido y un efectivo quelante de

hierro. Aunque la composición de antocianinas se ha estudiado en varios cultivares de berenjena, podrían existir otros con componentes mayoritarios diferentes a nasunin o D3R, e incluso con mayor actividad antioxidante (Azuma y col., 2008).

### 2.6.3. Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos de alto peso molecular con funciones en los sistemas biológicos como quelantes de metales, agentes de precipitación de proteínas y antioxidantes (Ignat y col., 2011). Suelen subdividirse en dos grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados. Los taninos hidrolizables son compuestos que contienen un núcleo central de glucosa esterificado con ácido gálico (galotaninos) o con ácido elágico (elagitaninos). Los taninos condensados son polímeros de flavonoides vinculados a través de un enlace de carbono, también se conocen como proantocianidinas, como se mencionó anteriormente (Dai y Mumper, 2010). Los taninos suelen ser reconocidos por generar la sensación de astringencia en algunas frutas (caqui, membrillo, manzana y mora) y bebidas (te, café y vino) (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Estructura de tanino hidrolizable (galotanino), tanino condensado (proantocianidina) y resveratrol. Adaptado de Ignat y col. (2011).

### 2.6.4. Estilbenos

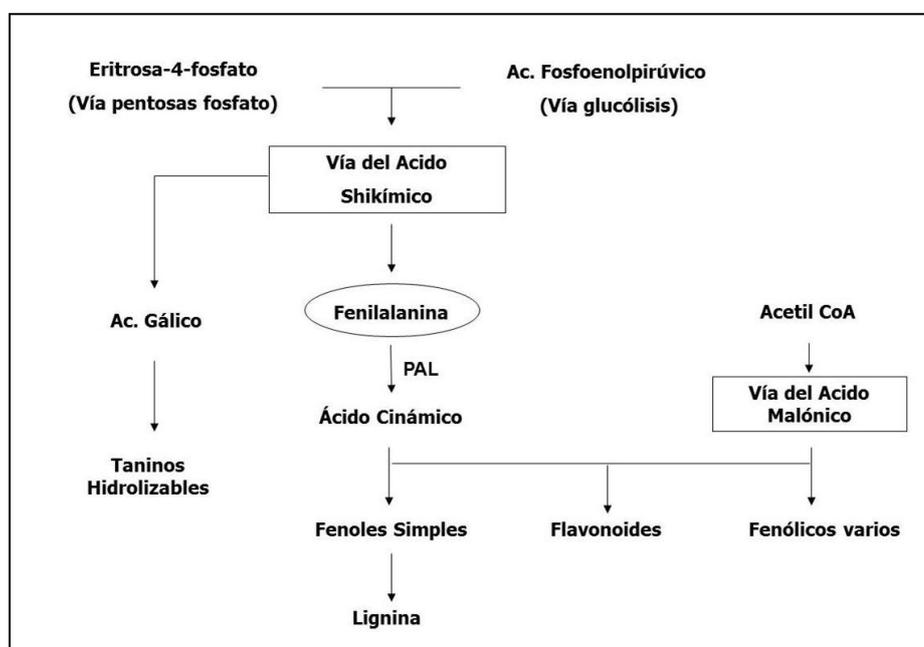
La mayoría de estos compuestos actúan en las plantas como fitoalexinas, compuestos que se sintetizan sólo en respuesta a una infección o lesión. Aunque la ocurrencia de

estilbenos en la dieta humana es bastante baja, el resveratrol (**Figura 2.6**) es reconocido por encontrarse en cantidades significativas en las uvas y el vino tinto, y ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antioxidantes (Pandey y Rizvi, 2009, Manach y col., 2004)

## 2.7. Biosíntesis de compuestos fenólicos

Los fenoles de las plantas son sintetizados por muchas vías diferentes y por lo tanto son un grupo heterogéneo también desde el punto de vista metabólico, sin embargo como se observa en la **Figura 2.7**, dos vías básicas están involucradas en su biosíntesis la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico (Taiz y Zeiger, 2006):

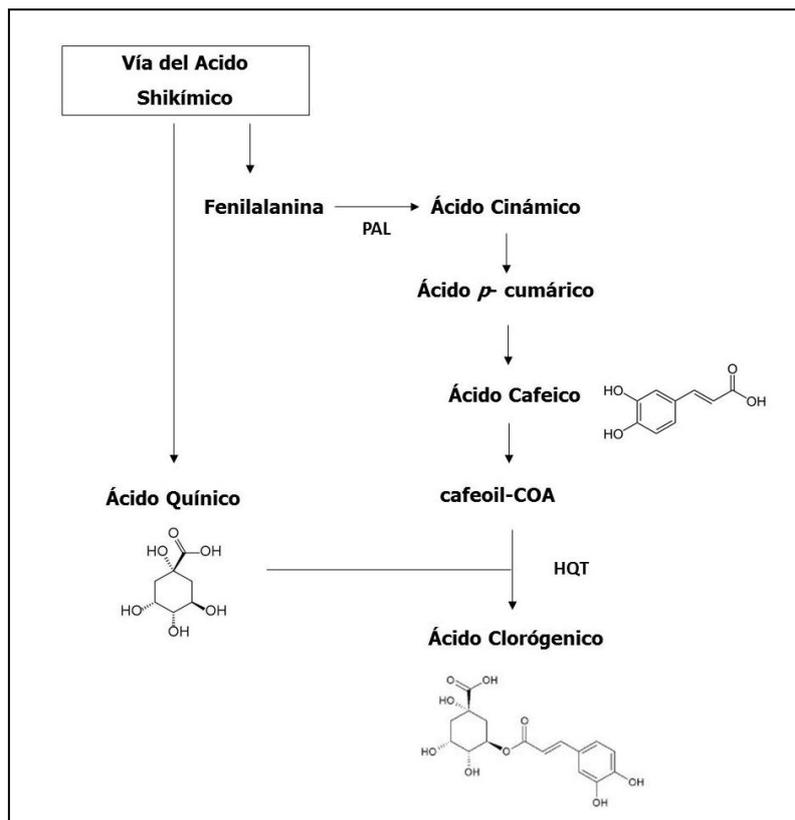
Así, la ruta del *ácido shikímico* participa en la biosíntesis de la mayoría de los fenoles de las plantas superiores. Utiliza como sustrato a precursores de hidratos de carbono simples derivados de la glucólisis (ácido fosfoenolpirúvico) y de la vía de las pentosas fosfato (eritrosa-4-fosfato) para formar aminoácidos aromáticos.



**Figura 2.7.** Biosíntesis de compuestos fenólicos. PAL: fenilalanina amonio-*l*iasa. Adaptado de Taiz y Zeiger (2006).

Uno de los productos de esta vía es la fenilalanina, de la que derivan la mayoría de los fenoles. La fenilalanina, aminoácido esencial del metabolismo primario, pasa al metabolismo secundario cuando la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza su conversión a ácido *trans*-cinámico. Este producto es a su vez, convertido a ácido *p*-cumárico por la adición de un grupo hidroxilo en posición *para* en el anillo aromático. Subsecuentes reacciones conducen a la adición de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes, para formar compuestos derivados y que constituyen la base de fenoles estructuralmente más complejos (**Figura 2.7**). La biosíntesis del ácido clorogénico, el compuesto fenólico más relevante en berenjena, sigue también esta ruta. El ácido *p*-cumárico, es transformado a ácido cafeico y seguidamente a cafeoil-CoA. Este compuesto finalmente se combina con ácido quínico (proveniente de la vía del ácido shikímico) en una reacción mediada por la enzima hidroxicinamoil-CoA quinato hidroxicinamoil transferasa (HQT) para formar ácido clorogénico, como puede observarse en la **Figura 2.8** (Niggeweg y col., 2004, Wu y col., 2013).

Por otro lado, la vía del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en bacterias y hongos, sin embargo en las plantas superiores aunque existe, no es tan utilizada. Su sustrato es el acetil-CoA. Junto con la vía del ácido shikímico participa en la biosíntesis de flavonoides, lignina y otros fenoles (**Figura 2.7**). Por su parte la biosíntesis de los compuestos flavonoides incluye ambas vías. En su estructura básica, uno de los anillos aromáticos (B) y el heterociclo se forman por la ruta del ácido shikímico, mientras que el segundo anillo aromático (A) proviene de la vía del ácido malónico (**Figura 2.7**).



**Figura 2.8.** Biosíntesis de ácido clorogénico. PAL: fenil alanina amonio liasa. HQT: hidroxicinamil-CoA quinato hidroxicinamil transferasa. Adaptado de Wu y col. (2013).

## 2.8. Factores que afectan el contenido de compuestos fenólicos

El nivel de compuestos fenólicos en frutas y vegetales es muy variable, y numerosos factores puede influir en su estabilidad, biosíntesis y degradación. Entre estos se incluyen factores genéticos, estado de desarrollo del producto, prácticas de cultivo, condiciones ambientales de pre-cosecha, características del almacenamiento y aplicación de tratamientos poscosecha, así como el tipo de procesamiento hogareño o industrial (Lattanzio, 2003; Kalt, 2005; Li y col., 2012). Según Kalt (2005), los compuestos fenólicos suelen ser más sensibles, respecto de otros grupos de antioxidantes, a las modificaciones en su contenido en respuesta a factores ambientales de pre-cosecha, contribuyendo a la amplia variabilidad en el nivel de AOX que en general presentan los productos con altos niveles de fenoles. A su vez, las condiciones de almacenamiento, y la temperatura en especial, generan mayores

modificaciones en estos compuestos que aquellas que ocurren por ejemplo en productos ricos en carotenoides o ácido ascórbico. A pesar de esto, el genotipo ejerce sin duda el mayor efecto en el contenido de estos metabolitos secundarios (Li y col., 2012; Lattanzio, 2003).

### **2.8.1. Factores genéticos**

El contenido de fenoles en las plantas depende tanto cuantitativamente como cualitativamente de su información genética. En general, puede observarse una amplia variabilidad en el nivel de estos antioxidantes entre diferentes especies de un mismo género, e igualmente significativas pueden ser las diferencias entre cultivares de una misma especie (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Como se indicó anteriormente, las berenjenas presentan una gran diversidad genética y morfológica. Asimismo, numerosos estudios han analizado la amplia variabilidad entre los distintos tipos o cultivares en términos de su composición química, incluyendo al nivel de fenoles totales y CGA (Hurtado y col., 2012; Prohens y col., 2005; Arivalagan y col., 2012; Hanson y col., 2006; Okmen y col., 2009; Prohens y col., 2007; Raigón y col., 2008). En relación a ello, algunos autores han estudiado un número importante de genotipos a fin de caracterizar y cuantificar los AOX fenólicos de estos frutos. Stommel y Whitaker (2003), encontraron un gran rango de variación y diferencias de hasta 4 veces en el contenido de CGA, en una colección de 97 accesiones de berenjena. Estos autores estudiaron además siete cultivares comerciales, en donde las diferencias en el nivel de antioxidantes fue de 2 a 3 veces entre los frutos evaluados (Whitaker y Stommel, 2003). En otros trabajos, se han hallado resultados similares al evaluar el contenido de compuestos fenólicos totales, con diferencias de concentración que van desde 1,7, 1,8, 2,2 y hasta 3,0 veces en estudios que incluyeron 35, 69, 31 y 26 cultivares de berenjena, respectivamente (Hanson y col., 2006; Prohens y col., 2007; Raigón y col., 2008; Okmen y col., 2009).

Por todo lo expuesto, es posible observar la amplia variación del contenido fenólico en berenjena, y en consecuencia de CGA. Teniendo en cuenta esto varias estrategias convencionales o moleculares, podrían emplearse para la selección o el desarrollo de cultivares con un alto contenido de compuestos fenólicos. Sin embargo, una nueva variedad comercial exitosa debería también presentar buenas características agronómicas y comerciales, como son el rendimiento y la apariencia. Es relevante también la susceptibilidad al pardeamiento de estos frutos. Sin embargo, dado que también existen diferencias en la actividad de la enzima PPO entre los cultivares, la selección simultánea de frutos con características de alto contenido de fenoles y baja actividad de PPO podría dar lugar a materiales con una mayor calidad nutricional y de apariencia (Plazas y col., 2013b).

### **2.8.2. Factores de precosecha**

Ciertos estudios han permitido determinar que el contenido de compuestos fenólicos de frutas y vegetales en un cultivar particular, puede variar de forma significativa debido a factores de pre- cosecha. Las condiciones ambientales en que se realiza el cultivo, tales como el tipo de suelo, la temperatura o la disponibilidad de luz, agua y nutrientes, se encuentran entre los factores reportados con más frecuencia como fuentes de variación de estos compuestos (Li y col., 2012). La fertilización tiene un efecto importante tanto en el rendimiento como en la calidad de los frutos. A su vez, factores de estrés biótico y abiótico pueden cambiar el metabolismo de los compuestos fenólicos en diferentes situaciones medioambientales (Dixon y Paiva, 1995). En este sentido, se ha observado que la disminución en el contenido fenólico en las hojas de arándano, inducida por fertilización nitrogenada, se revirtió por una infección fúngica (Witzell y Shevtsova, 2004). Asimismo, en un estudio llevado a cabo en frutillas se halló una interacción significativa entre el orden de las frutas y la fecha de siembra. La cosecha de la última fecha de siembra tuvo un mayor contenido de fenoles totales

y actividad antioxidante. Por su parte, estos parámetros se incrementaron en las frutas terciarias (Antonnen y col., 2006).

El estado de desarrollo o madurez del producto al momento de cosecha, muestra a su vez sustanciales efectos en el nivel de antioxidantes fenólicos (Li y col., 2012). En berenjena, sólo unos pocos trabajos han evaluado este aspecto, el cual será analizado en detalle en el presente Trabajo de Tesis. Sin embargo, es sabido que la relación entre el estado de madurez, el contenido fenólico y la capacidad antioxidante se diferencia entre tipos de productos vegetales (Kalt, 2005). Así por ejemplo, algunos estudios mostraron que en frutos como los arándanos, los estados inmaduros tuvieron un potencial antioxidante similar a los frutos maduros (Kalt y col., 2003), mientras que en frambuesas y frutillas una mayor capacidad antioxidante se dio en frutos en estados más tempranos de desarrollo (Wang y Lin, 2000).

La variación estacional y anual, o ciertas prácticas agronómicas como el cultivo orgánico también podrían modificar el contenido de compuestos fenólicos de frutas y vegetales (Kalt, 2005; Li y col., 2012). Mennella y col. (2010) encontraron pequeñas diferencias entre dos años de cultivo consecutivos, para el contenido de CGA en genotipos de *Solanum melongena* L., sin embargo las diferencias anuales fueron mucho mayores (46%) en líneas de berenjena *S. aethiopicum* L. De igual manera, Hanson y col. (2006) reportaron diferencias de hasta un 50% en el contenido de fenoles totales al comparar los valores obtenidos en dos años. En cuanto a las prácticas de cultivo, los resultados encontrados en bibliografía pueden ser muy variables. En berenjena, Luthria y col. (2010) no observaron diferencias en el contenido de CGA al comparar frutos manejados en condiciones convencionales y en cultivo orgánico. Singh y col (2009) reportaron que la respuesta depende de la variedad, así el nivel de compuestos fenólicos de berenjenas cv. 'Blackbell' crecidas convencionalmente fue similar a los frutos cultivados orgánicamente, mientras que en frutos cv. 'Millonaire'. Por su parte, Raigón y col. (2010) reportaron un contenido fenólico 30% mayor en berenjenas producidas orgánicamente

e interacciones significativas entre cultivar y método de cultivo, sugiriendo como se expresó anteriormente, que algunos cultivares resultan más apropiados para su cultivo en forma orgánica. Similares aumentos en el contenido de compuestos fenólicos bajo cultivo orgánico han sido hallados también en otros vegetales, como tomate o pimiento (Chassy y col., 2006; Mitchell y col, 2007). Las diferencias en las prácticas de fertilización entre los métodos de cultivo, estarían involucradas en estos incrementos. Dado que el nitrógeno limita el crecimiento en la producción orgánica, ante esta situación de estrés se activaría el metabolismo de los compuestos fenólicos por una mayor asignación de recursos hacia la diferenciación de los tejidos, antes que al crecimiento (Brandt y Molgard, 2001; Herms y Mattson, 1992).

### **2.8.3. Factores de poscosecha**

Durante la poscosecha de frutas y vegetales, pueden ocurrir modificaciones en la composición y el contenido de los compuestos fenólicos, sin embargo, esto depende en gran medida de las condiciones de almacenamiento. En general, el empleo de baja temperatura retrasa el deterioro poscosecha y puede en algunos casos generar incrementos en el contenido de compuestos fenólicos. Sin embargo, la reducción de la temperatura puede tener un impacto negativo, especialmente en aquellos productos sensibles al frío (Li y col., 2012).

El incremento de los compuestos fenólicos a bajas temperaturas puede estimularse debido al estrés por enfriamiento sufrido por el vegetal, existiendo una temperatura por debajo de la cual se induce el metabolismo de los fenilpropanoides. Sin embargo, esta temperatura umbral se relaciona con aquella que induce el daño por frío (Lattanzio, 2003). En relación a ello, pudo observarse que durante el almacenamiento de manzanas cv. '*Golden delicious*' a 2 °C, los cambios en el contenido de compuestos fenólicos de tipo flavonoides mostraron un incremento relevante en un período inicial de conservación, seguido de un decrecimiento gradual a través del almacenamiento prolongado (Lattanzio y col., 2001). Un

comportamiento similar fue observado en el nivel de compuestos fenólicos totales y de CGA, en cabezas de alcaucil almacenadas a 4 °C (Gil-Izquierdo y col., 2001). Este efecto implicaría una estimulación de la actividad PAL (enzima clave del metabolismo fenólico) ya que su biosíntesis es inducida también en respuesta a otros factores externos de estrés como la radiación UV y la infección por microorganismos. Estos cambios resultan beneficiosos en términos nutricionales, sin embargo, el contenido de antioxidantes fenólicos disminuyen durante el almacenamiento prolongado, lo que explicaría la mayor susceptibilidad a las infecciones de vegetales conservados por períodos extensos. Por otra parte, la senescencia y/o el estrés por baja temperatura pueden inducir formas tóxicas de oxígeno, afectando a las membranas celulares con la consecuente descompartmentalización y permitiendo así el contacto entre enzimas, como PPO y sus sustratos fenólicos. En estas condiciones, los tejidos vegetales almacenados en frío sufrirían pardeamiento y un detrimento del nivel de compuestos bioactivos (Latanzio y col., 2003).

Como se indicó en las **Secciones 1.9.2 y 1.9.3**, el daño por frío y el pardeamiento enzimático son causas importantes de deterioro durante la poscosecha de berenjena. De acuerdo a esto, se han realizado algunos estudios, tendientes a contrarrestar estos efectos negativos. Mishra y col. (2012), observaron que el corte de los frutos puede tener importantes efectos en el proceso de pardeamiento. Este fenómeno se inhibió significativamente cortando con una cuchilla (0,04 mm de espesor) y por inmersión inmediata en agua durante 10 min. Este tipo de corte causó lesiones menores a las células, reduciendo la lixiviación de compuestos fenólicos y la actividad de PPO, con la consecuente reducción del pardeamiento. Estas muestras cortadas, pudieron almacenarse hasta 5, 12 y 16 d a temperatura ambiente, 10 °C o 4 °C, respectivamente, con puntuaciones organolépticamente aceptables. Por otra parte, Massolo y col. (2011) observaron que respecto de un control, berenjenas tratadas con 1-MCP podían ser almacenadas enteras por 21 días a 10 °C, con menor pardeamiento y baja

acumulación de fenoles totales, lo cual se atribuyó a la reducción de la actividad de las enzimas PAL, PPO y POD e indicó que los frutos tratados presentaron una mayor conservación de la integridad del tejido. Finalmente, el empleo de ciertas tecnologías poscosecha permite extender la vida útil de los productos frescos que luego serán refrigerados y en ciertos estudios se ha informado, que pueden mantener o incluso mejorar el nivel de compuestos bioactivos, respecto de los vegetales conservados sólo en refrigeración. Este es el caso de las atmósferas modificadas y otros tratamientos poscosecha tales como la aplicación de radiación UV, el tratamiento térmico, la aplicación de técnicas de conservación con niveles de oxígeno superiores a la atmosférica o a concentraciones de ultra bajo oxígeno (Schreiner y Huyskenskel, 2006). Todas ellas, permiten el control sobre el desarrollo de microorganismos y generan ciertas condiciones de estrés en el tejido vegetal que pueden inducir de forma relevante la biosíntesis de compuestos fenólicos (Kalt, 2005; Tomás-Barberán y col., 2000; Tomás-Barberán y Espín, 2001).

#### **2.8.4. Efectos del procesamiento**

Los compuestos fenólicos son también notablemente afectados por la aplicación de tecnologías de procesamiento, tales como el secado, congelado, prensado, tratamientos enzimáticos, fermentación, entre otros (Tomás-Barberán y Espín, 2001). En general se considera que los productos procesados presentan menor valor nutricional, que sus respectivos productos frescos (García-Carmona, 2000). Esto puede deberse a reacciones químicas de degradación por el empleo de altas temperaturas o la lixiviación durante procesos como la descongelación por pérdida de la integridad estructural (Kalt, 2005). Sin embargo, se ha demostrado que el procesamiento puede inducir la formación de compuestos con nuevas propiedades antioxidantes o la liberación de antioxidantes fenólicos unidos a la matriz,

conservando o incluso mejorando las propiedades antioxidantes del alimento (Nicoli y col., 1997; Tomás-Barberán y Spín, 2001).

A su vez, los vegetales son en general consumidos luego de someterlos a cocción, lo que también puede provocar cambios significativos en la composición química, afectando la concentración de los compuestos bioactivos. Los métodos de cocción más comunes incluyen el hervido, la cocción al vapor, el fritado, horneado y el empleo de microondas (Pellegrini y col., 2009). Efectos positivos y negativos en la retención de los compuestos fenólicos han sido reportados dependiendo del tipo y características morfológicas de la especie vegetal (Dewanto y col., 2002; Ismail y col., 2004; Zhang y Hamauzu, 2004; Turkmen y col., 2005). Las condiciones de temperatura y tiempo, así como el medio en que se lleva a cabo el calentamiento son determinantes en el efecto sobre las propiedades antioxidantes (Zhang y Hamauzu 2004; Miglio y col., 2008).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

“Determinar la influencia de la variedad, condiciones de cultivo, cosecha, poscosecha y procesamiento sobre los antioxidantes fenólicos en berenjena”.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. “Estudiar la evolución del contenido de los antioxidantes durante el desarrollo del fruto en dos variedades de berenjena violeta, así como determinar la influencia de las condiciones de almacenamiento sobre el deterioro poscosecha de los frutos en diferente estado ontogénico”.
  
- II. “Analizar los cambios en los antioxidantes fenólicos de frutos de berenjena violeta completamente desarrollados, en condiciones de almacenamiento poscosecha recomendadas (10 °C) y en condiciones de daño por frío (0 °C)”.
  
- III. “Estudiar la distribución y estabilidad de los compuestos fenólicos en berenjenas de tipo violeta y blanca”.
  
- IV. “Determinar el grado de retención de los antioxidantes fenólicos presentes en berenjena de tipo violeta y blanca, luego de la aplicación de diferentes métodos de pre-tratamiento, procesamiento y cocción”.

## **CAPÍTULO I.**

***“Influencia del estado de desarrollo sobre los antioxidantes fenólicos y el comportamiento poscosecha de berenjenas (Solanum melongena L.)”***



## I. INTRODUCCIÓN

Anatómicamente, los frutos son los ovarios maduros de la flor, que pueden contener piezas florales asociadas. Su desarrollo sigue a la fertilización y se produce simultáneamente con la maduración de las semillas. Inicialmente, los frutos crecen como consecuencia de un proceso de división celular, para posteriormente continuar su expansión por aumento del volumen de las células. El proceso de maduración involucra e implica los cambios bioquímicos y estructurales que determinan el aroma, textura, componentes nutricionales y el color. El fruto se expande a tasas no uniformes desde el cuajado hasta la maduración. En la mayoría de los casos, los patrones de desarrollo se describen como curvas sigmoides simples o dobles. Aquellos que presentan curvas sigmoideas simples, como es el caso de la berenjena, experimentan un incremento de peso inicial lento, seguido de una etapa de crecimiento exponencial que se desacelera hacia el final del desarrollo (Ezura y Hiwasa-Tanase, 2010).

Como ya se mencionó, a partir de los patrones de producción de etileno y tasa respiratoria durante la maduración, los frutos se clasifican en climatéricos y no climatéricos. La berenjena es considerada no climatérica por lo que el etileno no juega un rol central como modulador del proceso de maduración (White, 2002; Passam y col., 2011). Estos frutos se cosechan en un estado fisiológicamente inmaduro, a partir de un índice de cosecha basado en el tamaño, dado que el color se desarrolla en forma muy temprana (Cantwell y Kasmire, 2007). El momento óptimo de cosecha responde normalmente a necesidades del mercado. Sin embargo, si los frutos permanecen mucho tiempo en la planta, la calidad se reduce (Zhang y Chen, 2006; Mennella y col., 2012). Durante el período de cosecha las berenjenas se encuentran en una fase de crecimiento activo por lo que es necesario efectuar recolecciones frecuentes de los frutos para asegurar el estado de desarrollo y tamaño deseados (Cantwell y Kasmire, 2007). Una vez alcanzadas las dimensiones esperadas, los frutos deben separarse de la planta con especial cuidado.

Más allá del tamaño, son importantes otras características como la firmeza, la uniformidad de color, la ausencia de defectos o manchas en la piel y el brillo superficial. El cáliz debe presentarse verde intenso y sin marchitamiento o desarrollo de hongos (Rodríguez y col., 1999). Estos frutos son propensos a la deshidratación y pérdida de firmeza, por lo que debe prestarse especial cuidado a su manipulación poscosecha (Cantwell y Kasmire, 2007).

La calidad organoléptica de los frutos puede estar influenciada por la etapa de desarrollo o madurez. A su vez, más allá de los cambios en atributos relacionados con la apariencia y sabor, en varias especies se ha demostrado que también se observan cambios marcados desde el punto de vista nutricional, entre ellos en el contenido de compuestos antioxidantes como de otros fitoquímicos que revisten interés en la prevención de ciertas enfermedades (Luthria y Sudarsan, 2006; Robbins, 2003). La berenjena posee un alto contenido de ácido clorogénico, como principal compuesto fenólico, ácido ascórbico en un grado muy por debajo y carotenoides en un nivel aún menor. Dado el alto nivel de antioxidantes fenólicos, los estudios se han centrado en berenjena principalmente en el análisis de los factores determinantes de su acumulación (Sudheesh y col., 1997; Huang y col., 2004; Singh y col., 2009; Okmen y col., 2009).

Como se mencionó anteriormente las berenjenas se separan de la planta en función de su tamaño, existiendo un período de tiempo óptimo en el que puede realizarse la cosecha en condiciones de producción. Para estos estados, de frutos con calibre y calidad comercial aceptable, es pobre lo que se conoce en relación a si presentan diferencias en su composición o nivel de AOX. Por otra parte en los últimos años se ha comenzado a comercializar berenjenas “baby” o de tamaño pequeño, al igual que ocurre con otras hortalizas. Es así que en el mercado hoy existen diversos productos “baby”, algunos de los cuales corresponden a vegetales cosechados en estados tempranos de desarrollo, como en el caso de berenjena, mientras que otros resultan de una selección de semillas que logran un producto final de

tamaño pequeño. Se introdujeron en primer lugar en los restaurantes más sofisticados de Europa, después llegaron a Estados Unidos y ya tienen su sitio en cantidad de países del mundo. Resultan exóticos y atractivos en la preparación de platos, tiernos, delicados, de textura firme y color brillante. Si bien en un principio fue el tomate “cherry”, después llegaron otros como: zanahoria, choclos, pepino, espinaca, lechuga, berro, zucchini, alcaucil, palta, remolacha, rábano, coliflor, entre otros. Este mercado está en pleno auge, por lo que resultaría valioso conocer la capacidad y contenido de antioxidantes. En berenjena, este aspecto ha sido levemente explorado y pocos resultados se han informado sobre las modificaciones en los AOX durante el desarrollo de los frutos de berenjena y los trabajos existentes muestran algunas contradicciones. Esteban y col. (1992), indicaron que el contenido de compuestos fenólicos en 3 variedades de berenjena resultó alto en estados intermedios de desarrollo. Por su parte, Mennella y col. (2012), en una detallada caracterización de los compuestos fenólicos en diferentes genotipos y especies relacionadas, observaron que los AOX disminuyeron durante el crecimiento de los frutos. Aquí los autores solo evaluaron tres estados de desarrollo, comenzando en uno intermedio y encontrándose el último en una etapa senescente no comercial, sin evaluar tampoco los frutos de tamaño “baby”. Por su parte Hanson y col. (2006) encontraron en su estudio sobre 33 variedades de berenjena en estado de madurez comercial, una alta capacidad antioxidante en variedades de frutos pequeños.

El momento de cosecha puede determinar también diferencias en términos del comportamiento durante el almacenamiento. Las berenjenas que han alcanzado un tamaño comercial son sensibles al daño por frío y su almacenamiento a 10 °C es recomendado para maximizar la vida poscosecha (Concellón y col., 2007). Sin embargo, en productos de menor o mayor tamaño, respecto de aquél considerado como óptimo, no se conoce si existen diferencias por ejemplo en la susceptibilidad a este desorden. De existir tales diferencias requeriría una mayor atención por parte de los comerciantes, dado que debieran almacenar de

forma diferenciada productos con distinto tamaño o grado de avance en el desarrollo, como se realiza con otros vegetales donde ya se conoce este aspecto. En términos generales la susceptibilidad al daño por frío disminuye a medida que avanza el desarrollo (Maul y col., 2012). Resultaría de interés evaluar este aspecto en los frutos de berenjena dentro del rango de tamaños comerciales. Asimismo, la incorporación creciente al mercado de berenjenas “baby”, requiere determinar cuáles son las condiciones óptimas de manipulación y almacenamiento luego de la cosecha para este producto en particular.

En función de lo expresado, en el presente capítulo se decidió estudiar los cambios en los antioxidantes asociados al desarrollo de los frutos de berenjena así como la influencia del momento de cosecha en la respuesta a diferentes regímenes de almacenamiento. El estudio se realizó a su vez en dos variedades para determinar si el genotipo posee marcada influencia sobre los patrones de acumulación y cambio de antioxidantes, y en el comportamiento en poscosecha.

## I. MATERIALES Y MÉTODOS

### I.1. Influencia del desarrollo en la estructura de los frutos y el nivel de antioxidantes

Se emplearon berenjenas violetas (*Solanum melongena* L.) cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN), producidas en un invernadero de la ciudad de La Plata, Argentina. Las plantas se ubicaron en filas con una distancia de 25 cm entre ellas. El riego y la fertilización se realizaron por un sistema de goteo, aplicado tres veces al día por un período de 15 min cada uno. La fertilización consistió en cloruro de potasio, nitrato de calcio y sulfato de magnesio al inicio del cultivo y durante la cosecha, con un equivalente de conductividad de  $1,7 \mu\text{S cm}^{-1}$  y pH 6,5. La toma de muestra se llevó a cabo a partir de la selección de 5 o 6 surcos de cada variedad, localizados en la zona media de la plantación y el subsiguiente marcado de 250 frutos con cintas de tela de color, considerando a éste como día 0. Los frutos de ambas variedades fueron cosechados en diferentes estados de madurez teniendo en cuenta el número de días luego de la fructificación o día 0 ("Days After Fruit Set", DAFS). A los 12, 15, 18, 20 y 23 DAFS (correspondientes a los estados de desarrollo denominados de aquí en adelante I, II, III, IV, V; respectivamente), se realizó la cosecha de 50 frutos de cada variedad e inmediatamente se llevaron al laboratorio para su análisis. Se efectuaron 3 marcados de frutos, independientes y desplazados entre sí por un lapso de 7-10 días, junto con sus correspondientes cosechas. Una vez en el laboratorio los frutos se seleccionaron por ausencia de daños y defectos, se lavaron por inmersión durante 3 min en agua clorada ( $\text{NaClO } 100 \text{ mg L}^{-1}$ ; pH 6,5) y se dejaron secar.

Seguidamente se determinó empleando un calibre, el tamaño individual de los frutos (longitud y diámetro ecuatorial), su peso y el área de cáliz. Se midió el volumen y se utilizó para el cálculo de la densidad de los frutos. Se analizó además la tasa respiratoria y firmeza. Seguidamente se determinó el contenido de materia seca y el residuo insoluble en alcohol (RIA).

Se emplearon rodajas de frutos para la localización histoquímica del ácido clorogénico, y muestras de piel y pulpa fueron congeladas en N<sub>2</sub> líquido y almacenadas a -80 °C para realizar el análisis del contenido de carotenoides, fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos, flavonoides totales, antocianinas y CGA como se describe en la **Sección I.3**.

## **I.2. Efecto del desarrollo sobre el comportamiento poscosecha de berenjena**

Berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) fueron cultivadas como se describe en la **Sección I.1** y se cosecharon luego de 12, 18 y 20 DAFS (estados de desarrollo I, III y IV; respectivamente). El estado I representa a las berenjenas tipo “baby”, mientras que III y IV fueron seleccionados como los estados de desarrollo normalmente cosechados en madurez comercial, a fin de contar con berenjenas de cosecha temprana y tardía, respectivamente. Se emplearon 40 frutos de cada variedad y estado de desarrollo, los cuales fueron envasados de a dos en bandejas plásticas, cubiertos con PVC perforado y almacenados a 0 o 10 °C (85-90% RH) por 0 o 12 d. Luego del almacenamiento refrigerado las muestras se mantuvieron 2 d a 20 °C (12+2 d), a fin de simular las condiciones de comercialización. Seguidamente se determinó el índice de deterioro, pérdida de peso, color superficial, firmeza y tasa de respiración como se indica en la **Sección I.3**.

## **I.3. Determinaciones analíticas**

### **I.3.1. Área de cáliz**

Los cálices se retiraron cuidadosamente del fruto y luego se digitalizaron en un escáner (HP modelo C4480, USA). El área se calculó empleando el programa AutoCAD<sup>®</sup> 2014. Diez frutos fueron analizados por cada variedad y estado de desarrollo, y los resultados se expresaron en cm<sup>2</sup>.

### I.3.2. Contenido de materia seca

Se tomaron 3 g de pulpa de los frutos, se cortaron en finas láminas y se secaron a 70 °C en estufa de vacío (2,5 kPa) hasta peso constante. El contenido de materia (MS) seca se calculó por diferencia de peso de acuerdo a:

$$MS (\%) = 100 - \frac{[100 \times (P_i - P_f)]}{P_i}$$

Donde  $P_i$  es el peso inicial de la muestra fresca y  $P_f$  es el peso luego del secado. Los resultados se expresaron en porcentaje de peso fresco y las determinaciones se realizaron por triplicado para cada variedad y estado de desarrollo.

### I.3.3. Tasa respiratoria

Para la determinación de la actividad respiratoria, dos frutos fueron colocados dentro de un frasco de vidrio hermético de 3 L de capacidad. La producción de  $\text{CO}_2$  se determinó con un sensor infrarrojo IR (Compu-Flow, Modelo 8650, Alnor CA, Estados Unidos) al inicio y luego de una incubación de 15 min a 20 °C. Se realizaron cuatro repeticiones para cada variedad y estado de desarrollo, y los resultados se expresaron en  $\mu\text{L CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

### I.3.4. Firmeza

Se analizó con texturómetro Texture Analyzer (TA.XT2, Stable Microsystem Texture Technologies, Scardale, Estados Unidos) equipado con una sonda plana de 3 mm de diámetro. Se realizó un ensayo de penetración a 0,8 cm de profundidad y velocidad de  $1 \text{ mm s}^{-1}$  sobre la zona central o globosa de un fruto ubicado en forma horizontal. Se registró la fuerza efectuada por el equipo durante el ensayo en función del tiempo y los resultados se expresaron como la pendiente inicial de la curva en  $\text{N s}^{-1}$ . Se realizaron tres medidas en cada fruto, empleando un total de 30 frutos por variedad y estado de desarrollo.

### I.3.5. Densidad

Para el cálculo de la densidad, se determinó el volumen de los frutos por la técnica de desplazamiento de agua. Cada berenjena se ubicó dentro de un recipiente graduado conteniendo un volumen de agua conocido y se sumergió completamente, registrando el aumento de volumen. Seguidamente la densidad ( $\delta$ ) se calculó como:

$$\delta = \frac{W}{(V_f - V_i)}$$

Donde W es la masa del fruto, Vf es el volumen final y Vi el volumen inicial. Se analizaron 10 frutos de cada variedad y estado de desarrollo, y los resultados se expresaron en  $\text{kg m}^{-3}$ .

### I.3.6. Obtención del Residuo Insoluble en Alcohol (RIA)

Las paredes celulares se aislaron según Vicente y col. (2007), con pequeñas modificaciones. La pulpa congelada se procesó en un molinillo (Modelo A11, IKA Works Inc., SP Brasil) y se añadieron 7,5 g del polvo resultante a un vaso de precipitado que contenía 50 mL de etanol. La mezcla se hirvió durante 20 min para asegurar la inactivación de las enzimas y a fin de extraer los solutos de bajo peso molecular. El material insoluble se filtró y se lavó secuencialmente con 50 mL de etanol, 50 mL de cloroformo:metanol (1:1 v/v) y 50 mL de acetona, obteniéndose el extracto de pared celular o Residuo Insoluble en Alcohol (RIA). El RIA se secó en estufa a 37 °C hasta peso constante. Las medidas se realizaron por triplicado para cada variedad y estado de desarrollo, y los resultados se expresaron en  $\text{g RIA kg}^{-1}$ .

### I.3.7. Contenido de antocianinas por espectrofotometría

La extracción y cuantificación de los pigmentos se llevaron a cabo de acuerdo a Concellón y col. (2007), con ligeras modificaciones, a partir de la obtención de la piel en finas láminas de al menos seis frutos. Las muestras se congelaron en  $\text{N}_2$  líquido, se pulverizaron en molinillo (Modelo A11, IKA Works Inc., SP Brasil) y 0,5 g del polvo resultante se extrajo 4 veces

con una mezcla de metanol:HCl (99:1 v/v). Seguidamente se centrifugó a  $14.000 \times g$  durante 5 min y el sobrenadante se llevó a un volumen final de 50 mL con el mismo solvente. El contenido total de antocianinas se determinó espectrofotométricamente a 540 nm (UV-Mini modelo 1240, Shimadzu Corporation, Japón). Los análisis se realizaron por triplicado para cada variedad y estado de desarrollo evaluados, y los resultados se expresaron como  $DO \text{ kg}^{-1}$ .

### **I.3.8. Análisis del contenido de antocianinas por HPLC**

Los extractos preparados como se describe en la **Sección I.3.7**, se concentraron en un evaporador rotatorio (Büchi R-124, Labortechnik AG, Flawil, Suiza) hasta un volumen final de 2 mL. Seguidamente se filtraron con un filtro de nylon de  $45 \mu\text{m}$  y  $10 \mu\text{L}$  fueron utilizados para el análisis por HPLC en un equipo modular HP 1100 (Hewlett-Packard, CA, Estados Unidos) equipado con un desgasificador por vacío, una bomba binaria, un inyector automático y un detector de arreglo de diodos (DAD). El sistema se conectó a un controlador y adquisidor de datos Agilent Chemstation LC System. Se utilizó una columna Symmetry C18 (Waters,  $150 \times 3,9 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$  de diámetro de partícula) y una fase móvil hidro-orgánica compuesta por 5% (v/v) de ácido fórmico (A) y metanol (B). El gradiente de elución elegido fue el utilizado por Wu y col. (2004): 0-2 min: 5% B; 2-10 min: 5-20% B; 10-15 min: 20% B; 15-30 min: 20-30% B; 30-35 min: 30% B; 35-45 min: 5% B. El caudal de fase móvil se mantuvo en  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  y la detección se realizó a 540 nm. Los cambios relativos en la concentración en función del desarrollo se determinaron calculando el área de los picos por kilogramo de fruto y las medidas se realizaron por triplicado para cada variedad y estado de desarrollo.

### **I.3.9. Contenido de compuestos carotenoides**

Se molió el tejido de la pulpa congelada y se pesó 6 g. Seguidamente, el polvo obtenido se extrajo con 10 mL de una mezcla de hexano: acetona: etanol (2:1:1 v/v), se agitó en vortex y a continuación se añadieron 2 mL de agua. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5

min para permitir la separación de las fases y finalmente se midió a 472 nm la absorbancia de la fase de hexano en espectrofotómetro (UV-Mini modelo 1240, Shimadzu Corporation, Japón). El contenido de compuestos carotenoides se calculó a partir de una curva de calibración empleando  $\beta$ -caroteno como estándar. Las muestras se midieron por triplicado y los resultados se expresaron como mg  $\beta$ -caroteno  $\text{kg}^{-1}$ .

#### **I.3.10. Contenido de ácido ascórbico**

La pulpa de berenjenas fue triturada en un molinillo y 8 g del polvo resultante se extrajeron con 12 mL de ácido tricloroacético (TCA) 6% (m/v), con agitación constante por 30 min a 0 °C y protegido de la luz. El homogeneizado se centrifugó a  $14.000 \times g$  durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se utilizó para el análisis del contenido de ácido ascórbico (AA) de acuerdo a Lemoine y col. (2010), con pequeñas modificaciones. Se tomaron 900  $\mu\text{L}$  de extracto y se añadieron a un tubo de ensayo conteniendo 600  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 0,2 M (pH 7,4). A continuación, se adicionaron 1,5 mL de TCA 10% (p/v), 1,2 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  42% (v/v) y 1,2 mL 2,2'-dipiridilo 4% (m/v) en etanol 70% (v/v). Finalmente 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3$  3% (m/v) preparados en el momento, se agregaron con agitación constante. La mezcla se dejó reaccionar 40 min en un baño de agua a 42 °C y a continuación se midió la absorbancia a 525 nm en espectrofotómetro (UV-Mini modelo 1240, Shimadzu Corporation, Japón). Un tubo sin muestra (blanco) se utilizó para las correcciones en el desarrollo de color por parte de los reactivos. Se empleó una solución de AA estándar para obtener una curva de calibración. Las muestras se realizaron por triplicado para cada variedad y estado de desarrollo, y los resultados se expresaron como mg AA  $\text{kg}^{-1}$ .

### I.3.11. Compuestos fenólicos totales

La pulpa congelada de berenjenas fue triturada en un molinillo, se pesó 1 g y se añadió a 10 mL de etanol. La suspensión se extrajo con agitación constante durante 30 min y luego se centrifugó a  $14.000 \times g$  por 10 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y el pellet se re-extrajo con 10 mL de etanol. Los sobrenadantes se combinaron y se utilizaron para los análisis posteriores. El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó de acuerdo a Singleton y col (1999), empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Para ello se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de reactivo (1:1 v/v en agua) y se agregaron a tubos de ensayo conteniendo 350  $\mu\text{L}$  de extracto etanólico y 1.000  $\mu\text{L}$  de agua. Luego de 3 min de reacción a temperatura ambiente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20% (m/v) en NaOH 0,1 M y 1 mL de agua destilada. La mezcla de reacción se agitó en vórtex y se incubó durante 90 min a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro (UV-Mini modelo 1240, Shimadzu Corporation, Japón). El contenido de compuestos fenólicos se calculó utilizando ácido clorogénico como estándar. Se prepararon tres extractos para cada variedad y estado de desarrollo analizados, y cada uno se midió por triplicado. Los resultados se expresaron como  $\text{mg CGA kg}^{-1}$ .

### I.3.12. Capacidad antioxidante

Los extractos etanólicos de berenjena preparados como se describe en la **Sección I.3.11**, se utilizaron para medir la capacidad antioxidante con el radical estable  $\text{ABTS}^{*+}$ , según la metodología descrita previamente por Arnao y col. (2001). La solución madre de reactivo se preparó pesando 7 mmol de la sal de amonio de ABTS y 2,45 mmol de persulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) en 1000 mL de agua, se dejó reaccionar 12-16 h en oscuridad a temperatura ambiente. Para el estudio en las muestras, la solución madre fue diluida en etanol hasta obtener una absorbancia de  $0,700 \pm 0,02$  medida a 734 nm en espectrofotómetro (UV-Mini modelo 1240, Shimadzu Corporation, Japón). Una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de extracto fue añadida a

1 mL de solución de trabajo de ABTS<sup>•+</sup>, se homogeneizó e incubó durante 6 min. A continuación se registró la disminución de la absorbancia por parte de las muestras, que deben encontrarse en el rango del 20-80% de inhibición respecto de la absorbancia del blanco de reactivo. Se utilizó Trolox<sup>®</sup> como patrón y los resultados se expresaron como Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) en mg kg<sup>-1</sup>. Las medidas se realizaron por triplicado.

### I.3.13. Sub-clases de compuestos fenólicos

Se evaluaron de acuerdo al método descrito por Obied y col. (2005), con pequeñas modificaciones. La pulpa de berenjenas se congeló y trituró en molinillo, y 4 g del polvo resultante se extrajo con 10 mL de metanol 70% (v/v) durante 30 min, luego se centrifugó a 14.000 × g por 10 min a 4 °C. Finalmente el pellet se re-extrajo con 5 mL de solvente. Una alícuota de 500 µL de extracto se añadió a 1 mL de etanol 96% (v/v) acidificado con HCl 0,1% (v/v). Finalmente se completó un volumen de 10 mL con HCl 2% (v/v). Se midió la absorbancia a 320 nm para determinar el contenido de derivados de ácidos hidroxicinámicos (HCA), utilizando CGA como estándar; y a 360 nm para estimar los derivados flavonoides (FL), empleando quercetina como estándar. Las muestras se analizaron por triplicado para cada variedad y estado de desarrollo, y los resultados se expresaron en concentración molar relativa, de acuerdo a:

$$\text{Fracción molar HCA (o FL)} = \frac{\text{mol HCA (o FL)}}{\text{mol (HCA + FL)}}$$

### I.3.14. Contenido de ácido clorogénico

Antes del análisis por HPLC-DAD los extractos preparados como se describió en la **Sección I.3.11**, fueron concentrados a 40 °C en evaporador rotatorio (Büchi R-124, Labortechnik AG, Flawil, Suiza). El residuo obtenido se resuspendió en 5 mL de una mezcla

agua:metanol (90:10 v/v) y seguidamente, los extractos se filtraron a través de un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  (Osmonics Inc., Minnesota, USA). La determinación cromatográfica del contenido de CGA se realizó en un cromatógrafo HP 1100 (Hewlett-Packard, CA, USA) equipado con una columna C18 (XSelect CSH, Waters) de una dimensión de 750 mm de longitud x 4,6 mm de diámetro y 35  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula. La fase móvil se constituyó por 0,4% (v/v) ácido fórmico (A) y metanol (B). El gradiente de elución utilizado fue: 0-15 min: 5-35% B; 15-35 min: 35-65% B. El caudal de la fase móvil se fijó en 0,5 mL  $\text{min}^{-1}$ , el volumen de muestra inyectado fue 20  $\mu\text{L}$  y la detección se realizó a 320 nm. El CGA presente en los extractos de berenjenas se cuantificó mediante el empleo de un patrón estándar. Las muestras se analizaron por triplicado para cada variedad y estado de desarrollo, y los resultados se expresaron en mg CGA  $\text{kg}^{-1}$ .

### I.3.15. Índice de deterioro de frutos almacenados

A cada tiempo de muestreo, los síntomas de daños externos fueron analizados visualmente. El grado de deterioro o índice de daño (ID) se calculó de acuerdo a Concellón y col. (2004), con una escala hedónica de cuatro grados: 1 = sin daños, 2 = daños leves, 3 = daños moderados, 4 = daños severos, teniendo en cuenta el grado de pardeamiento de la piel, el punteado superficial, la deshidratación y la presencia de pudriciones. Las observaciones se realizaron en 20 frutos para cada variedad, estado de desarrollo, temperatura y tiempo de almacenamiento. El índice de deterioro se calculó según:

$$\text{Índice de deterioro} = \frac{\sum (\text{Nivel de deterioro} \times \text{N}^\circ \text{ de frutos en el nivel})}{\text{N}^\circ \text{ total de frutos}}$$

### **I.3.16. Pérdida de peso de frutos almacenados**

Los frutos se pesaron individualmente, al inicio del experimento y a la salida del almacenamiento. La pérdida de peso porcentual se calculó como:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{100 \times (P_i - P_f)}{P_i}$$

Donde  $P_i$  y  $P_f$  son el peso inicial y final de la muestra, respectivamente. Los resultados se expresaron como porcentaje. Se evaluaron treinta frutos para cada cultivar, estado de desarrollo y condición de almacenamiento.

### **I.3.17. Color superficial de frutos almacenados**

El color de la piel de los frutos que fueron almacenados se evaluó con un colorímetro (Minolta, Model CR-400, Osaka, Japan) por medida de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . Se analizaron treinta frutos de cada variedad, estado de desarrollo y condición de almacenamiento, y las medidas se realizaron por triplicado en la zona ecuatorial de cada fruto.

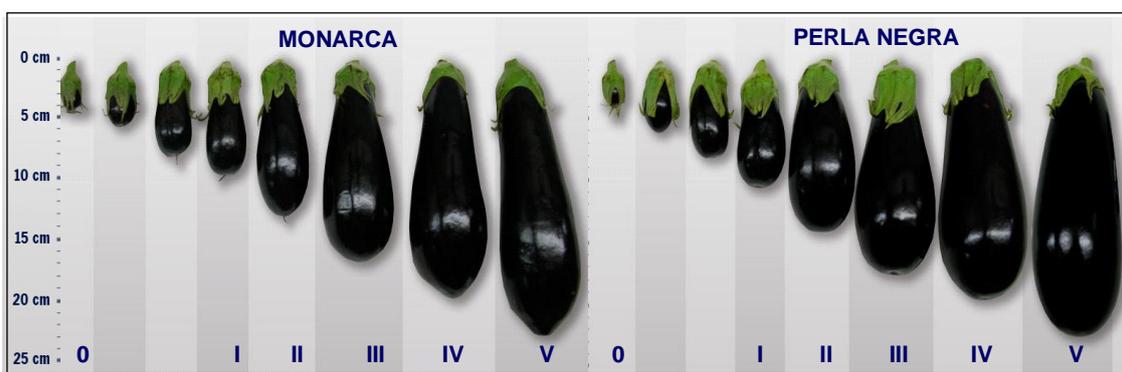
## **I.4. Análisis estadístico**

Los experimentos se llevaron a cabo bajo un diseño completamente aleatorizado. Los resultados se sometieron a un análisis por ANOVA y las medias se compararon mediante el test de mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

## I. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### I.1. Apariencia de los frutos, crecimiento, materia seca y tasa respiratoria

En la **Figura I.1** se observa la apariencia de los frutos de berenjenas violetas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN), cosechadas en los diferentes estados de desarrollo (I, II, III, IV y V). Las berenjenas PN mostraron mayor diámetro ecuatorial (15%) y fueron menos elongadas que M (**Tabla I.1**). Analizando un mismo estado de desarrollo el peso fue 20% más alto en PN que en M (**Tabla I.1**). El estado I representa a los frutos de berenjena denominados “baby”, mientras que el estado IV se definió como el correspondiente al rango normal de madurez seleccionado para la cosecha de berenjenas completamente desarrolladas. Los frutos “baby” fueron menos redondeados que aquellos de tamaño comercial, alcanzando un 40-50% de la longitud y diámetro final, pero solo el 13% del peso (**Tabla I.1**).



**Figura I.1.** Apariencia de berenjenas cv. Monarca y Perla Negra a los 0, 12, 15, 18, 20 y 23 días luego de la fructificación (0, I, II, III, IV y V; respectivamente).

Los frutos se expanden rápidamente entre los estados I y III ( $25 \text{ g d}^{-1}$ ), sin embargo, ambas variedades mostraron una máxima tasa de crecimiento ( $40\text{-}60 \text{ g d}^{-1}$ ) en la transición al estado IV. Por su parte, la expansión del cáliz se produjo en estados tempranos de desarrollo. Para ambas variedades este alcanzó un 70% del área final en el estado I, mientras que el fruto solo presentó un 13% de la masa final (**Tabla I.1**). La masa total del fruto continúa incrementándose hasta el estado IV, indicando que una cosecha anticipada reduciría el

rendimiento. A pesar de esto, retrasar la recolección hacia estados más avanzados no es recomendable, ya que podría resultar en la obtención de frutos esponjosos, con excesivo desarrollo de semillas y sabor amargo (Chen y Li, 1996).

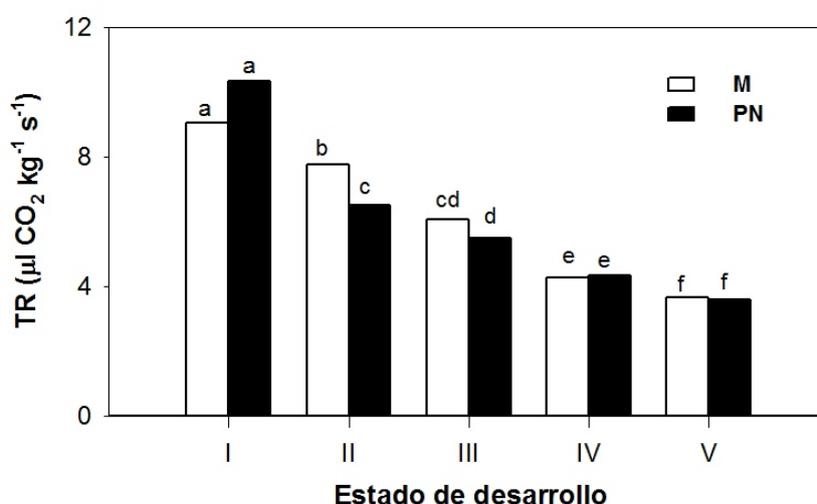
**Tabla I.1.** Peso, longitud, diámetro, área de cáliz y contenido de materia seca (MS) de berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) durante el desarrollo (Estados I, II, III, IV y V). Valores con letras distintas en una columna, indican diferencias significativas de acuerdo al test de Fisher de mínima diferencia significativa (LDS test= least significant difference) ( $P < 0,05$ ).

cv.	Estado	Peso (kg)	Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Área de cáliz (cm <sup>2</sup> )	MS (%)
<b>M</b>	<b>I</b>	0,05 i	8,60 g	3,98 j	2,02 f	7,48 a
	<b>II</b>	0,11 h	12,95 e	5,02 h	2,31 ef	7,05 abc
	<b>III</b>	0,19 f	15,59 d	6,14 f	2,70 de	6,80 cd
	<b>IV</b>	0,29 d	17,71 c	7,36 d	3,08 cd	6,81 bcd
	<b>V</b>	0,37 b	21,10 a	7,70 c	3,29 c	6,85 bcd
<b>PN</b>	<b>I</b>	0,06 i	7,84 h	4,18 i	3,08 cd	7,35 ab
	<b>II</b>	0,15 g	12,46 f	5,82 g	3,27 c	6,60 cd
	<b>III</b>	0,23 e	15,79 d	6,86 c	3,46 c	6,57 cd
	<b>IV</b>	0,35 c	17,55 c	8,19 b	4,14 b	6,46 d
	<b>V</b>	0,44 a	20,20 b	8,84 a	4,97 a	6,49 cd
<b>LSD</b>		<b>0,01</b>	<b>0,39</b>	<b>0,18</b>	<b>0,53</b>	<b>0,45</b>

La decisión del momento de cosecha en berenjena es tomada en base al tamaño. Dado el rápido crecimiento entre los estados III y IV, en ambas variedades, los frutos deberían comercializarse cuando alcancen un peso en el rango de 0,20 a 0,35 kg (**Tabla I.1**). Si esta drástica diferencia en tamaño, afecta o no el nivel de antioxidantes y la respuesta en poscosecha de las berenjenas, aún no ha sido determinado.

En concordancia con otros autores (San José y col., 2013) el contenido de material seca (MS) en los frutos de berenjena varía del 6,5 al 7,5% durante el desarrollo (**Tabla I.1**). La disminución de MS entre los estados I y III, sugeriría que el crecimiento del fruto se produce predominantemente por la absorción de agua. A continuación el peso seco se mantiene estable (**Tabla I.1**).

Al igual que en otras especies, las más altas tasas respiratorias (TR) se produjeron en los frutos menos desarrollados del estado I (**Figura I.2**) (Fawole y Opara, 2013). Las berenjenas “baby” de ambas variedades mostraron una TR comparable (8,8-10,3  $\mu\text{L CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Similar a lo detallado por Rodríguez y col. (1999), y en concordancia con un patrón de madurez no climatérico, una disminución de la TR fue observada durante el desarrollo. Los frutos cosechados en el estado IV tuvieron una TR 20-30% menor a aquellos del estado III.



**Figura I.2.** Tasa respiratoria (TR) de berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) durante el desarrollo (estados I, II, III, IV y V). Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

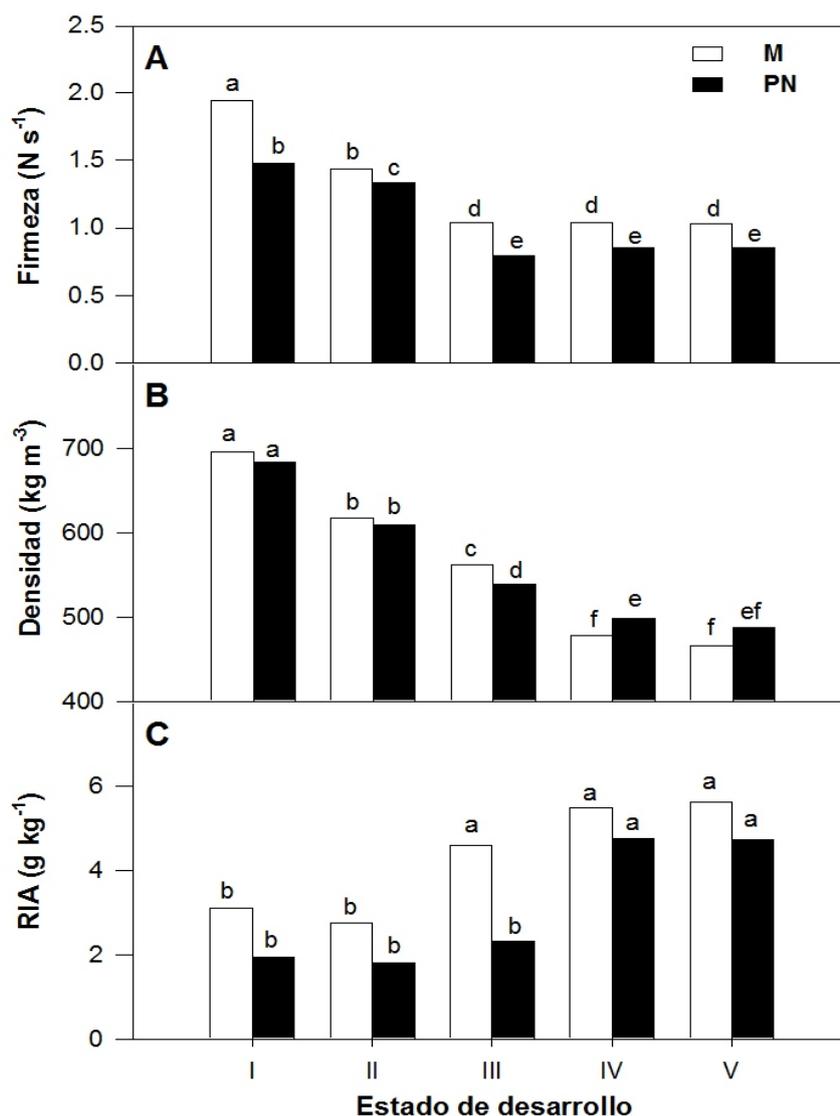
### I.2. Firmeza, densidad y RIA

Para ambas variedades la mayor firmeza se halló en el estado I (**Figura I.3.A**). Los frutos se ablandaron marcadamente en la transición entre los estados I y II, sin observarse cambios luego. Las modificaciones estructurales y bioquímicas asociadas con el ablandamiento de las berenjenas han recibido poca atención hasta la actualidad. Contrariamente con lo informado para la mayoría de otros frutos, Esteban y col (1993) encontraron que el contenido de pectina se incrementa durante el desarrollo de estos frutos, indicando que se deposita nuevo material en la pared celular. A pesar de que el ablandamiento ha sido usualmente asociado con

cambios en la composición de la pared celular, la arquitectura del tejido puede también conducir a marcados cambios en las propiedades mecánicas (Vicente y col., 2007).

La densidad de los frutos decreció durante el desarrollo de 700 a 500 kg m<sup>-3</sup> (**Figura I.3.B**) y mostró una alta correlación con la firmeza ( $r = 0,84$  y  $0,89$  para M y PN, respectivamente). Esto indicaría que los cambios en los espacios intercelulares del fruto pueden estar relacionados al ablandamiento de berenjena, que ocurre a medida que la maduración progresa. De todos modos, siendo PN la variedad menos firme y que presenta mayor densidad en los estados IV y V, sugeriría que otros factores determinan la textura en los estados de desarrollo más avanzados. Futuros estudios son necesarios para profundizar en el conocimiento de estas variables.

En contraste con la mayoría de los frutos en los que el RIA decrece durante la ontogenia (Brummell, 1999), en ambas variedades de berenjena se produjo una progresiva acumulación del material insoluble en alcohol (**Figura I.3.C**). Un marcado incremento del RIA se observó para la variedad M en el estado III, mientras que en PN se produjo en el estado IV. Para frutos que no acumulan almidón, como las berenjenas, el RIA comprende la mayoría de los polímeros estructurales de la pared celular, incluyendo pectinas, hemicelulosa, celulosa y lignina. El aumento en RIA puede ser en parte debido a la deposición de pectinas como ha sido reportado por Esteban y col. (1993). La progresiva lignificación de semillas, fibras y tejidos vasculares a través del desarrollo puede también contribuir a este incremento.

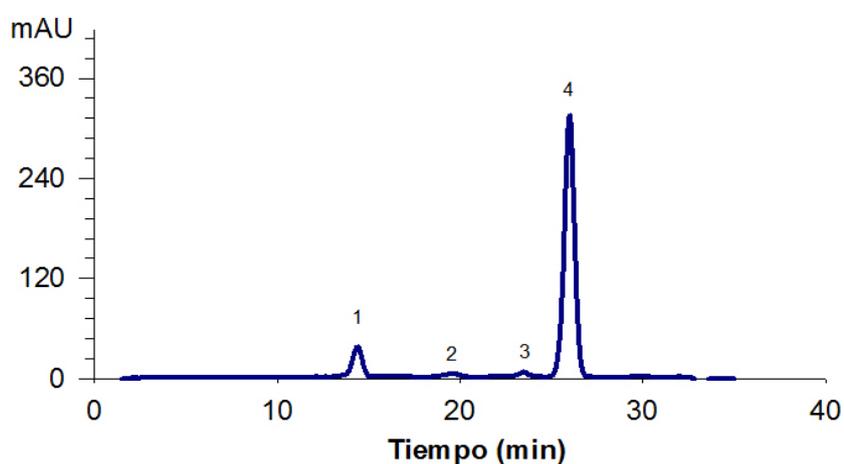


**Figura 1.3.A)** Firmeza, **B)** densidad y **C)** Residuo Insoluble en Alcohol (RIA) de berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) durante el desarrollo (estados I, II, III, IV y V). Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

### 1.3. Contenido de antocianinas

Las berenjenas presentan una gran diversidad de colores entre variedades, que resultan de las diferencias en el tipo, cantidad y distribución de los pigmentos presentes en la piel de los frutos (Daunay y col., 2004). El color es determinado por la presencia de antocianinas, pigmentos también comunes en muchos otros frutos cuyo color sea de la gama de los rojos-azules (Mazza y col., 2004). Trabajos previos han demostrado que las variedades de berenjena de piel oscura pueden diferir en el tipo de antocianina mayoritaria, así en algunos casos

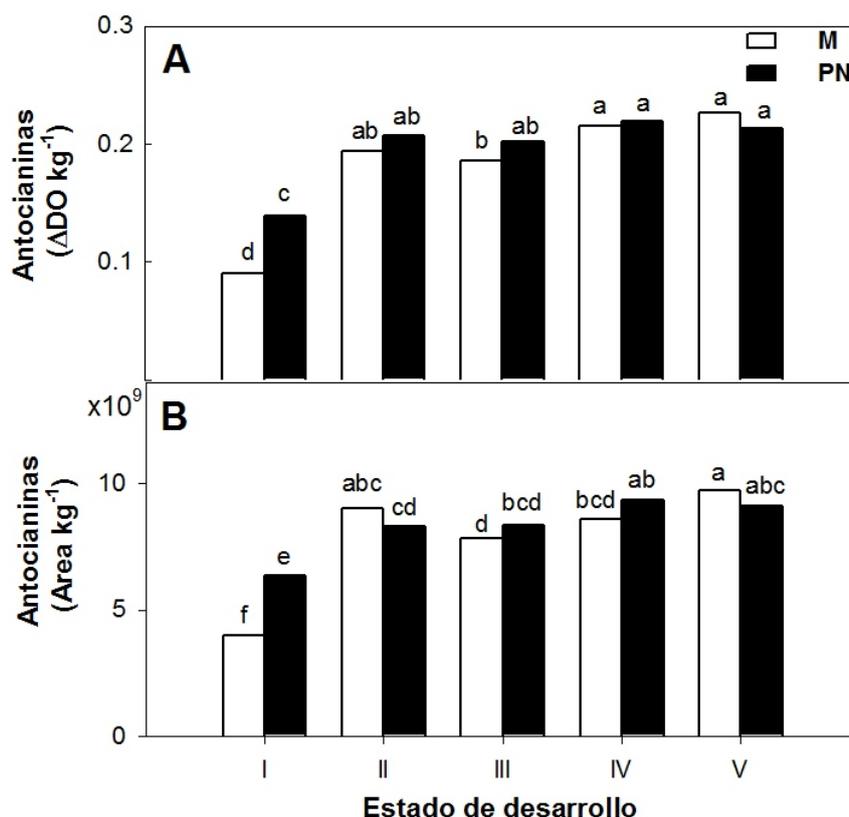
predomina el pigmento delfinidina-3-(*p*-coumaroilrutinosido)-5-glucósido o Nasunina (NAS), mientras que en otros se presenta mayoritariamente delfinidina-3-rutinósido (D3R) o Tulipanina (Matsubara y col., 2005; Wu y Prior, 2005). En nuestro caso, las berenjenas de ambas variedades presentaron un perfil cromatográfico donde el pico mayoritario (pico 4, **Figura I.4**) era D3R. La identidad de la misma fue chequeada empleando un HPLC-MSD (Modelo 1100 LC, Agilent Technologies Inc., EE.UU.). El MSD fue operado con una interfaz de ionización por electrospray en el modo positivo (ESI<sup>+</sup>) y se hallaron los fragmentos *m/z* de 611, 465, 303; siendo estos característicos de D3R.



**Figura I.4.** Perfil representativo de HPLC de las antocianinas presentes en la piel de berenjenas Monarca y Perla Negra. Pico 1: delfinidina 3-rutinósido-5-galactósido, Pico 2: delfinidina 3-rutinósido-5-glucósido, Pico 3: delfinidina 3-glucósido y Pico 4: delfinidina 3-rutinósido.

Al igual que Wu y Prior (2005), también fueron identificadas otras tres antocianinas minoritarias (**Figura I.4**) en ambas variedades y estados de desarrollo: delfinidina 3-rutinósido-5-galactósido (D3R-5Gal, pico 1), delfinidina 3-rutinósido-5-glucósido (D3R-5Glu, pico 2) y delfinidina 3-glucósido (D3Glu, pico 3).

La variación del contenido de antocianinas totales (evaluado espectrofotométricamente, **Figura I.5.A**) se correspondió con el hallado para la antocianina mayoritaria (D3R, pico 4) medido por HPLC (**Figura I.5.B**).



**Figura 1.5.** Contenido de **A)** antocianinas totales y **B)** antocianina mayoritaria (pico 4) en berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) durante el desarrollo (estados I, II, III, IV y V). Valores con letras distintas indican diferencias según el test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

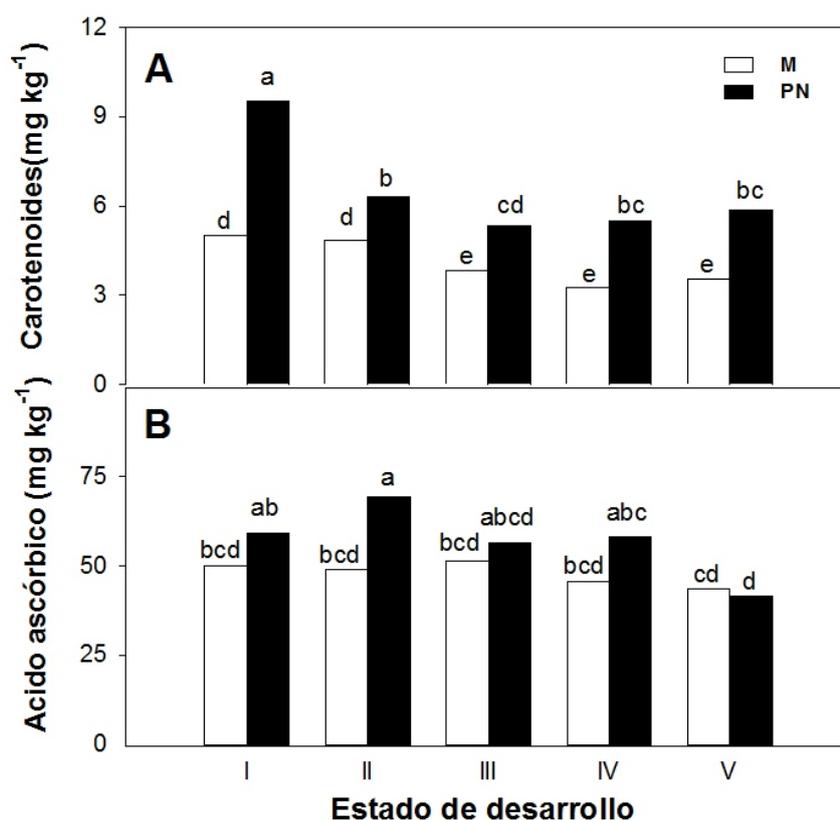
Ambas variedades presentaron color violeta-negro en la piel desde el inicio. Si bien en el estado I, se registró el menor contenido de antocianinas, este alcanzó un alto porcentaje respecto del valor final (40% y 60% para M y PN, respectivamente), ya que en el estado II se obtuvo la máxima concentración de pigmento. A partir de allí, el nivel de antocianinas en la piel se mantuvo sin cambios. De esta forma en el presente trabajo el color de las berenjenas se define en etapas tempranas de desarrollo, en contraposición con lo reportado por Esteban y col. (1992), quienes indican que la intensidad del color se incrementa a medida de que el fruto se aproxima al momento óptimo de cosecha.

#### I.4. Contenido de compuestos antioxidantes

Los principales grupos de compuestos que contribuyen a la capacidad antioxidante de los alimentos vegetales son los compuestos fenólicos, los carotenoides y el ácido ascórbico (Lako, 2007; Singh y col., 2007). De acuerdo a esto, se decidió evaluar el nivel y evolución de los AOX más representativos en la pulpa de berenjena, durante el desarrollo de los frutos.

El contenido de carotenoides se ubicó en el rango de los 4 a 10 mg kg<sup>-1</sup> (**Figura I.6.A**), resultados similares fueron hallados en trabajos previos (EL-Qudah, 2008; Speek y col., 1988). De acuerdo a Aizawa e Inakuma (2007) y EL-Qudah (2009), los principales tipos de estos compuestos encontrados en berenjena son  $\beta$ -caroteno y luteína. PN presentó en todos los estados de desarrollo, mayores contenidos que M, con la más amplia diferencia observada para berenjenas “baby”. En ambas variedades, los frutos cosechados en estados III y IV, no presentaron diferencias significativas entre sí. A pesar de que el nivel de carotenoides fue mayor en estados tempranos, las berenjenas no se consideran buena fuente y comparados con los contenidos observados en otros productos ricos en este grupo de AOX, los valores hallados resultan bajos (El-Qudah, 2009, Aizawa e Inakuma, 2007). La presencia de carotenoides en estas variedades se visualiza con un color blanco-amarillento de la pulpa, siendo algo más intenso el color en el tejido cercano a la piel. Esta particularidad ha sido hallada por otros autores en berenjenas que poseen la antocianina D3R como mayoritaria en la piel (Mennella y col., 2012; Todaro y col., 2009).

Aunque el ácido ascórbico (AA) es un potente antioxidante, el bajo nivel hallado en berenjenas limita su participación en la capacidad antioxidante de estos frutos (Hanson y col., 2006). Como se observa en la **Figura I.6.B**, el contenido de AA varió entre 40 y 70 mg kg<sup>-1</sup>, y no mostró marcadas diferencias entre variedades.

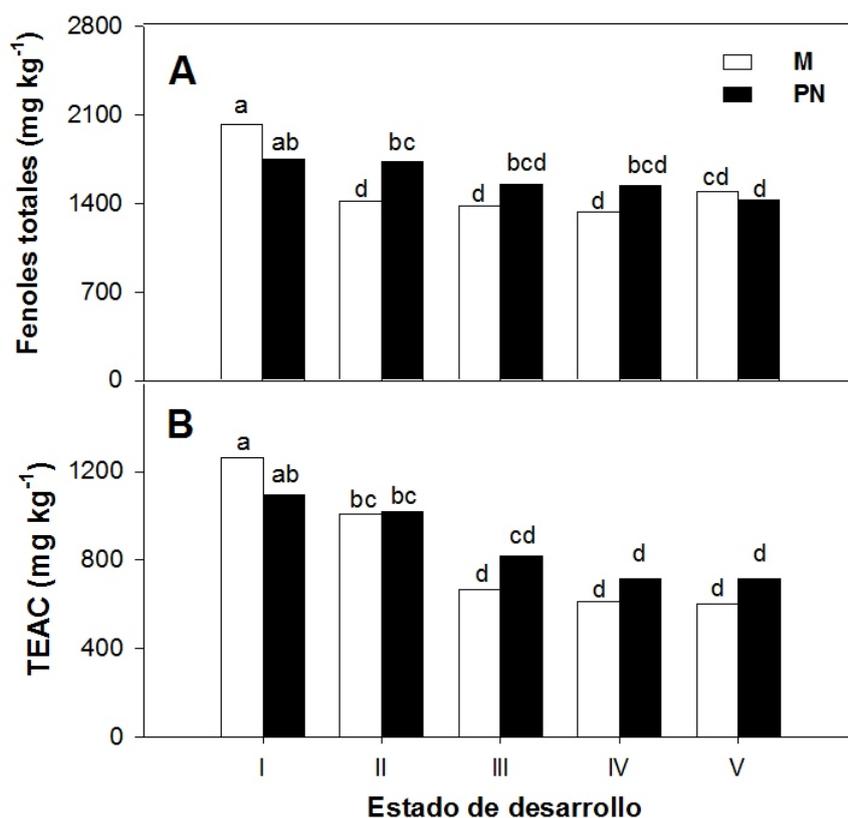


**Figura 1.6.** Contenido de **A)** carotenoides y **B)** ácido ascórbico en berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) durante el desarrollo (estados I, II, III, IV y V). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

Estos valores están en concordancia con los hallados por Esteban y col. (1989, 1992) y Das y col. (2011). A su vez, resultaron superiores a los reportados por Prohens y col. (2007) en diferentes variedades comerciales de berenjenas. A pesar de esto, los niveles de AA en las variedades PN y M también resultaron bajos respecto de vegetales ricos en este AOX (Hanson y col., 2006; Lee y Kader, 2000). Una leve tendencia a la disminución del contenido de AA, fue observada durante el desarrollo de los frutos, sin embargo solo fue significativa para el estado V de PN. Estos resultados difieren de los hallados por Esteban y col. (1992), quienes encontraron un mayor contenido cuando los frutos alcanzaron la madurez de cosecha.

Para ambas variedades, los compuestos fenólicos se presentaron en alta concentración en los estados tempranos de desarrollo ( $2.000 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Estos valores están de acuerdo a los

reportados por Whitaker y Stommel (2003) y Mennella y col. (2010), pero superan casi al doble a los informados por Hanson y col. (2006), Prohens y col. (2007) y Raigón y col. (2008). El máximo nivel fue hallado en el estado I (**Figura 1.7.A**), mientras que el contenido disminuyó marcadamente cuando los frutos alcanzaron el estado III, permaneciendo posteriormente sin cambios. En contraste, Esteban y col (1992), reportaron que los compuestos fenólicos alcanzan su máximo en estados intermedios de desarrollo. El comportamiento observado concuerda con el reportado por Mennella y col. (2012). A pesar de ello, estos autores solo evaluaron tres estados de desarrollo, partiendo de uno intermedio hasta frutos sobremaduros. Cabe destacar entonces, que los frutos de berenjena tipo “baby” analizados aquí, resultaron los más ricos en compuestos fenólicos, carotenoides y AA.

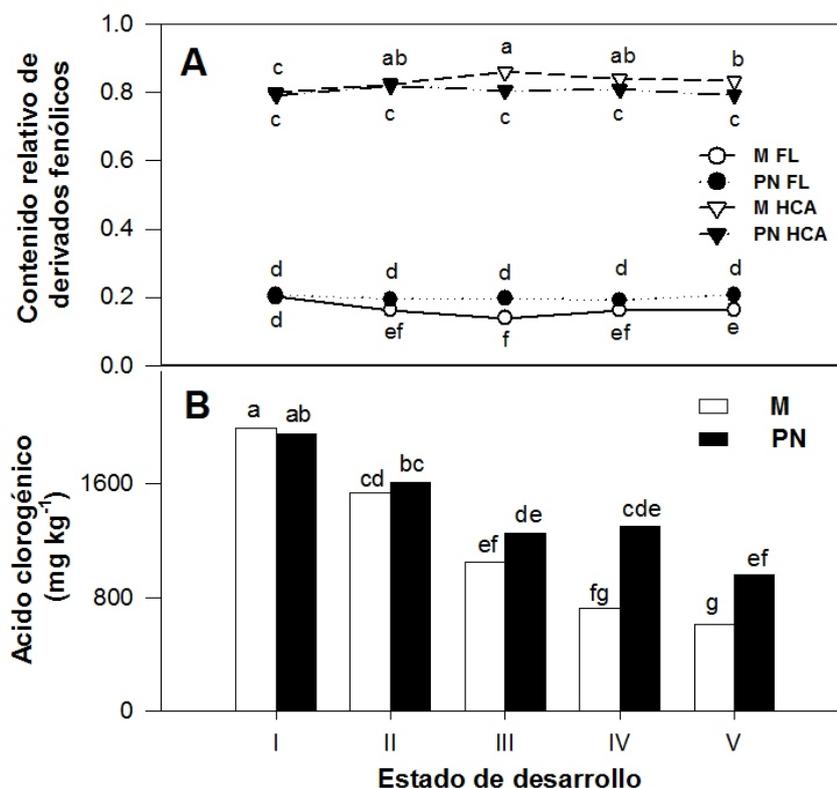


**Figura 1.7. A)** Contenido de fenoles totales y **B)** capacidad antioxidante (TEAC) en berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) durante el desarrollo (estados I, II, III, IV y V). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

Finalmente, la capacidad antioxidante evaluada mediante TEAC mostró, para ambas variedades, una tendencia similar a la descrita para los compuestos fenólicos totales, evidenciándose una disminución con el desarrollo y una amplia reducción entre los estados II y III (**Figura I.7.B**). Esto confirma que en todos los estados, los compuestos fenólicos representan los principales antioxidantes hidrofílicos en la pulpa. A su vez, vale destacar que las propiedades antioxidantes de las berenjenas están dadas esencialmente por los compuestos presentes en esta parte del tejido, esto se debe a que a pesar de las conocidas propiedades antioxidantes de las antocianinas que se hallan en la piel de variedades violetas, su baja contribución relativa al peso hace que solo aporten 3% de la capacidad antioxidante total cuando el fruto completo es analizado (datos no mostrados).

#### **I.5. Sub-clases de compuestos fenólicos y contenido de ácido clorogénico**

Se determinó la proporción relativa de compuestos derivados de flavonoides (FL) y de ácidos hidroxicinámicos (HCA) al contenido de fenoles totales presentes en los frutos de berenjena durante su desarrollo. Para ambas variedades en todos los estados, HCA representaron el 75-80% de los compuestos fenólicos totales. De esta forma, e independientemente de la etapa ontogénica, los FL sólo contribuyeron al 20% (**Figura I.8.A**). Ambos grupos mostraron una tendencia, en valor absoluto, a disminuir con el desarrollo. Así los compuestos derivados de HCA decrecieron de 6,2-7,0 a 2,3-3,1 mmol kg<sup>-1</sup> para M y PN, respectivamente, mientras que los derivados FL cayeron de 1,5-1,8 a 0,5-0,8 mmol kg<sup>-1</sup> para M y PN, respectivamente (datos no mostrados).



**Figura 1.8. A)** Contenido relativo de derivados flavonoides (FL) y de ácidos hidroxicinámicos (HCA) y **B)** Contenido de ácido clorogénico en berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) durante el desarrollo (estados I, II, III, IV y V). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

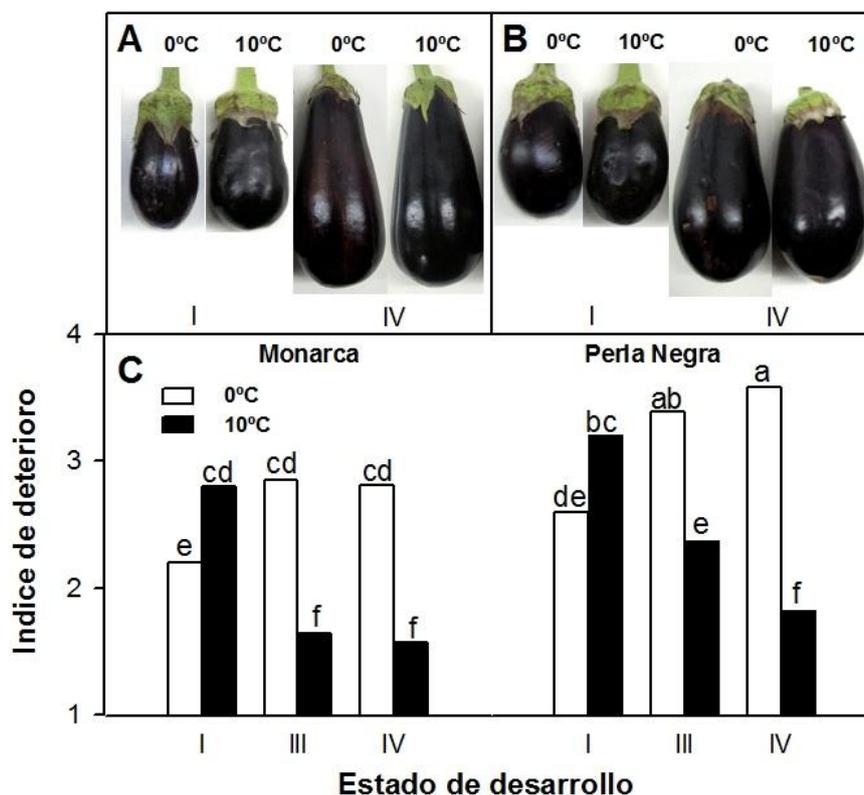
El ácido clorogénico ha sido identificado como el derivado HCA predominante, encontrado en berenjenas correspondientes a un rango de madurez que va desde estados intermedios de desarrollo hasta la sobremadurez (Mishra y col., 2012; Prohens y col., 2007; Raigón y col., 2010; Stommel y Whitaker, 2003). En concordancia, en el presente trabajo, el análisis por HPLC de las muestras de berenjena mostró un solo pico mayoritario, correspondiente a CGA, para ambas variedades y a lo largo de todo el desarrollo. Los cambios en CGA presentaron una tendencia similar a la descrita anteriormente para la capacidad antioxidante, siendo el contenido más alto para las berenjenas “baby”, respecto de los frutos cosechados en estados III y IV. El nivel de CGA fue cercano a  $2.000 \text{ mg kg}^{-1}$  en berenjenas del estado I, disminuyendo en el estado V a valores de  $900$  y  $600 \text{ mg kg}^{-1}$  para PN y M, respectivamente (**Figura 1.8.B**).

Asimismo, una continua y significativa pérdida de CGA a través del desarrollo fue observada por Mennella y col. (2012) en otras variedades de berenjena. De todos modos en estos estudios previos no se han identificado los estados de desarrollo tempranos en los que el conocimiento del nivel de AOX pudiera resultar de interés comercial. En el presente trabajo y considerando las prácticas actuales de manejo del cultivo de berenjena, se incluye al estado I para berenjena “baby”, además de los estados III y IV para el rango de cosecha comercial de frutos grandes, pero aún aceptables en los canales de distribución.

#### **I.6. Efecto del desarrollo en la respuesta a diferentes regímenes de almacenamiento**

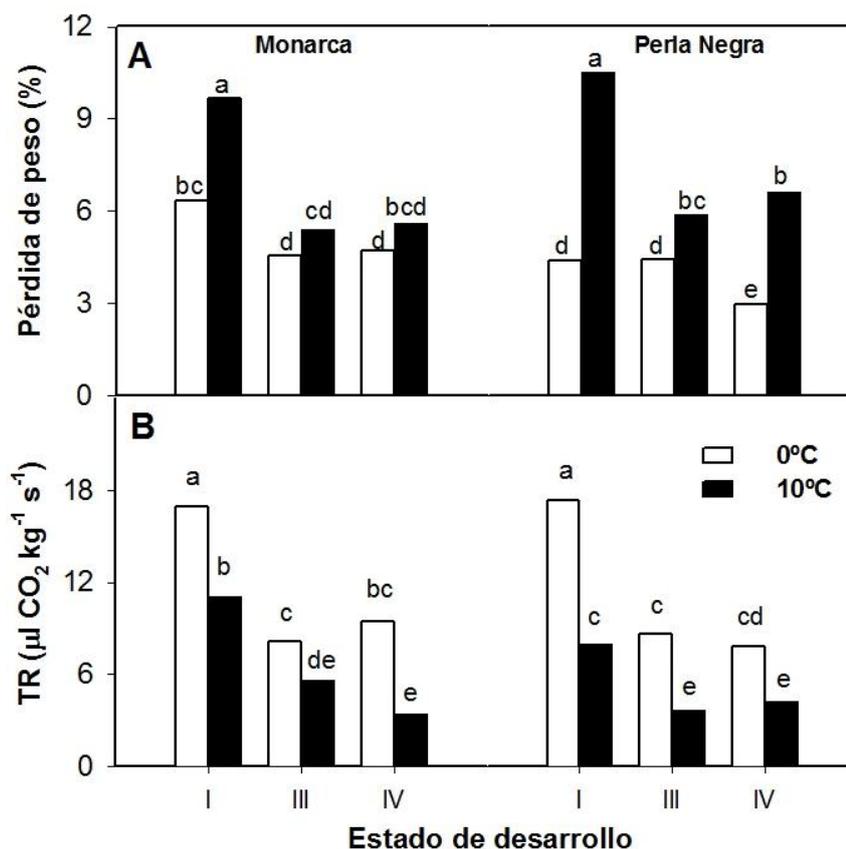
El estado de desarrollo de los frutos a la cosecha puede ejercer marcados efectos en la respuesta a diferentes regímenes de almacenamiento. Esto ha sido claramente establecido en numerosas especies de frutos (Qian y col., 2013; Shin y col., 2008), pero ha recibido escasa atención en berenjena. Igualmente, las condiciones óptimas de almacenamiento poscosecha para berenjenas “baby” no han sido aún determinadas.

Como se observa en la **Figura I.9.A y B**, el principal factor que contribuyó a la pérdida de calidad de los frutos en estados III y IV cuando se almacenaron a 10 °C, fue el marchitamiento del cáliz y la aparición de pudriciones, así como el pardeamiento de la piel. Mientras que a 0 °C, presentaron síntomas de daño por frío (punteado y escaldaduras superficiales). Luego de 12+2 d y para ambas variedades, las berenjenas de tamaño comercial mostraron menor índice de deterioro a 10 °C, respecto de aquellos frutos conservados a 0 °C (**Figura I.9.C**).



**Figura 1.9.** **A)** Apariencia de berenjenas cv. Monarca en estados I y IV, **B)** Apariencia de berenjenas cv. Perla Negra en estados I y IV, **C)** Índice de deterioro de berenjenas almacenadas por 12 d a 0 °C o 10 °C y transferidas a 20 °C por 2 d (12+2 d). Estado de desarrollo: I (berenjenas “baby”), III (comercial pequeño) y IV (comercial). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

Por su parte las berenjenas “baby” sufrieron una importante pérdida de peso cuando se almacenaron a 10 °C, siendo este el principal factor de deterioro (**Figuras 1.9.A y B**). La gran susceptibilidad a la deshidratación, puede explicarse por la alta relación superficie/volumen de los frutos, aunque también podría deberse a la incompleta deposición de cera en la cutícula. A su vez, en estudios previos se ha informado que la pérdida de peso se produce en berenjena principalmente a través del cáliz (Díaz-Pérez, 1998). El hecho de que el caliz se desarrolla en estados tempranos como se observó anteriormente, explicaría también la alta tendencia a la deshidratación. Para berenjenas pequeñas, el almacenamiento a 0 °C y 90% HR resulto el más propicio, observándose escasa presencia de síntomas de daño por frío y una reducción significativa de la pérdida de peso (**Figura 1.10.A**).



**Figura 1.10. A)** Pérdida de peso y **B)** tasa respiratoria (TR) de berenjenas cv. Monarca y Perla Negra almacenadas por 12 d a 0 °C o 10 °C y transferidas a 20 °C por 2 d (12+2 d). Estado de desarrollo: I (berenjenas “baby”), III (comercial pequeño) y IV (comercial grande). Valores con letras distintas indican diferencias según test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

Estos resultados contrastan con los obtenidos para otros frutos, que en general muestran mayor susceptibilidad a las bajas temperaturas cuando se encuentran menos desarrollados. Por ejemplo, el pimiento conservado a 2 °C es mucho más sensible a este desorden en el estado verde maduro que cuando ha alcanzado la coloración roja (Serrano y col., 1997). Similarmente, se recomienda almacenar tomates verdes a temperaturas no inferiores a 12-14 °C, mientras que cuando han completado su madurez, la temperatura puede reducirse a 7 °C (Suslow y Cantwell, 2012). Finalmente, mientras que el régimen poscosecha no resultó en marcadas diferencias en el color de la piel de los frutos (**Tabla I.2**), el almacenamiento a 0 °C previno el ablandamiento de las berenjenas “baby”, en ambas variedades (**Tabla I.2**).

**Tabla I.2.** Color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) y firmeza de berenjenas cv. Monarca (M) y Perla Negra (PN) en estados de desarrollo I, III y IV, almacenadas a 0 °C o 10 °C por 12 d y transferidas 2 d a 20 °C. Valores con letras distintas en una columna, indican diferencias significativas de acuerdo al test de Fisher de mínima diferencia significativa (LSD test= least significant difference) ( $P < 0,05$ ).

cv.		$L^*$		$a^*$		$b^*$		Firmeza (N s <sup>-1</sup> )	
		0 °C	10 °C	0 °C	10 °C	0 °C	10 °C	0 °C	10 °C
M	I	25,24 bcde	24,90 def	4,01 bc	4,33 b	-0,41 d	0,15 a	1,38 a	1,41 a
	III	25,30 bcde	24,98 cdef	3,93 bcd	3,60 cd	-0,33 cd	-0,30 cd	1,05 cd	1,02 de
	IV	25,41 bc	24,70 f	4,23 b	3,48 d	-0,20 bc	-0,29 cd	1,16 bc	0,92 e
PN	I	26,08 a	25,59 b	4,33 b	3,68 cd	-0,10 b	0,17 a	1,26 b	1,45 a
	III	24,82 ef	25,20 cde	5,02 a	3,92 bcd	-0,24 bc	-0,20 bc	0,92 e	1,04 d
	IV	24,53 f	25,35 bcd	5,41 a	4,21 b	-0,21 bc	-0,31 cd	0,98 de	1,00 de
LSD		0,48		0,53		0,16		0,12	

Tanto los frutos tipo “baby” como los de tamaño comercial almacenados a 0 °C, mostraron luego de la transferencia a 20 °C, una exacerbada tasa respiratoria (TR) (**Figura I.10.B**). Esto indicaría que todos los estados de desarrollo evidenciaron daño por frío. Para ambas variedades, los frutos en estados III y IV presentaron similar respuesta al daño por frío en términos de su nivel de deterioro (**Figura I.9.B**) y TR (**Figura I.10.B**).

En síntesis los resultados observados aquí muestran que, si bien el almacenamiento a 0 °C es en general una condición que genera daño por frío y por tanto no recomendada para el almacenamiento de berenjenas, resultó ser la adecuada para preservar la calidad de frutos “baby” durante 12+2 d. Mientras que, 10 °C continuó siendo la temperatura recomendada para el estado comercial (III), de tamaño algo menor al estado comercial óptimo (IV).

## **I. CONCLUSIONES**

En el presente Capítulo se determinaron los cambios morfológicos y fisiológicos, así como la variación en el contenido de antioxidantes de dos variedades de berenjena violeta en diferentes estados de desarrollo. A su vez, se evaluó la influencia de la madurez a cosecha de los frutos en respuesta a diferentes regímenes de almacenamiento. Las berenjenas “baby” presentaron mayor capacidad antioxidante que los frutos en estados más avanzados de desarrollo y mostraron elevados niveles de ácido clorogénico, carotenoides y ácido ascórbico. Asimismo, los frutos en este estado de desarrollo ya poseían entre el 40-60% de antocianinas en la piel, 70% de desarrollo del cáliz, 40-50% de la longitud y diámetro final, pero solo el 13% del peso. La mayor tasa de crecimiento en masa se registró entre el estado III y IV. Las berenjenas “baby” fueron extremadamente susceptibles a la deshidratación y se almacenaron mejor a 0 °C, sin mayores síntomas de daño por frío.

En cambio, los resultados observados muestran que más allá de las diferencias en tamaño, las berenjenas en estados III y IV no presentan marcada variación en su contenido de materia seca, contenido de antocianinas, capacidad antioxidante y susceptibilidad al daño por frío. Las más claras diferencias entre los frutos en estas dos etapas de madurez de cosecha, se dieron en términos de su tasa respiratoria y densidad, pudiendo establecerse que un retraso de la cosecha resultaría en berenjenas menos densas y con una tasa respiratoria del 25% menor. Por su parte, el almacenamiento a 10 °C maximiza el mantenimiento de la calidad poscosecha. Comprender los cambios en los compuestos bioactivos y en la performance poscosecha en función del desarrollo de los frutos de berenjena, puede ayudar en la selección de las condiciones óptimas de cosecha y manejo para cada estado ontogénico en particular, así como para conocer las propiedades antioxidantes de estos frutos.

## **CAPÍTULO II.**

***“Cambios en los antioxidantes fenólicos y en la calidad durante el almacenamiento de berenjena en condiciones recomendadas y de daño por frío”***



## II. INTRODUCCIÓN

Como se describió anteriormente, los derivados del ácido hidroxicinámico (HCA) tales como el ácido clorogénico (CGA), son los antioxidantes más comunes en berenjena. El CGA es incluido en la amplia categoría de compuestos denominados fenólicos. El término CGA ha sido usado para referirse a la familia de ésteres formados por ciertos ácidos *trans*-cinámicos (cafeico, ferúlico o *p*-cumárico) y el ácido quínico. De cualquier manera el nombre de ácido clorogénico, se emplea para denominar específicamente al compuesto individual más común: el ácido 5-O-cafeoilquínico, éster del ácido caféico (AC) y quínico (AQ) (Clifford, 2000). A su vez, existen isómeros que incluyen el ácido 3-O-cafeoilquínico y ácido 4-O-cafeoilquínico, al ácido isoclorogénico con dos moléculas de ácido caféico, y otros como los ácidos 3,4-dicafeoilquínico y 3,5-dicafeoilquínico (Niggeweg y col., 2004).

El CGA se presenta en un gran número de especies vegetales con un rol central en la defensa de la planta y como antioxidante (Plazas y col., 2013b). Al igual que en berenjena, es también el principal compuesto fenólico soluble en otras Solanáceas populares como la papa o el tomate, y de los miembros de la familia Rubiáceas cultivados en todo el mundo como el café. Resulta de esta forma uno de los antioxidantes fenólicos más abundantes en la dieta humana (Niggeweg y col., 2004). En este sentido, su importancia radica en que los polifenoles como el CGA, han sido reconocidos en los últimos años por sus actividades biológicas con efectos beneficiosos para la salud humana, que incluyen: capacidad para captar radicales libres, regulación de la actividad enzimática y modulación de los mecanismos de señalización celular (Sato y col., 2011). A su vez, el CGA en particular presenta propiedades antioxidantes, anticarcinogénicas, antiinflamatorias, analgésicas, antimicrobianas; y efectos neuro y cardioprotectores (Plazas y col., 2013b).

Si bien se sabe que las condiciones pre y poscosecha pueden afectar en gran medida el nivel de CGA de los frutos, el desarrollo y la regulación ambiental de su metabolismo son aún

poco conocidos (Joët y col., 2010). En trabajos previos se ha informado que los AOX pueden ser influenciados en gran medida por factores genéticos. De hecho, una gran variación natural en la capacidad antioxidante se ha encontrado entre los distintos genotipos de berenjena (Stommel y Whitaker 2003; Hanson y col., 2006; Mennella y col., 2010). De aquí se desprende, el interés por los programas de mejoramiento genético que tienen como objetivo incrementar el contenido de fenoles totales y de CGA, particularmente. Sin embargo, es sabido que en frutas y vegetales, la oxidación de los fenoles luego de la exposición al aire de los tejidos internos resulta en la aparición de pardeamiento (Plazas y col., 2013a). La enzima polifenoloxidasasa (PPO) cataliza esta reacción, con el consecuente deterioro de la apariencia y reducción de la calidad nutricional por pérdida de AOX (Mishra y col., 2012).

Fuentes de variación en las condiciones ambientales del cultivo y la cosecha, pueden también afectar el contenido de compuestos fenólicos en berenjena. Raigón y col. (2010), informaron que el manejo orgánico y la fertilización aumentaron la acumulación de compuestos fenólicos. En contraste, Luthria y col., (2010) no observaron una tendencia consistente en el contenido fenólico de berenjenas cultivadas orgánica o convencionalmente. Asimismo, como pudo observarse en el Capítulo I, el estado de desarrollo del fruto al momento de cosecha es un factor determinante del nivel de AOX.

Aunque varios trabajos evaluaron el rendimiento poscosecha de berenjena (Kozukue y col., 1978, 1979; Fallik y col., 1995; Concellón y col., 2004, 2005 y 2007), sólo unos pocos estudios han analizado la influencia de distintos regímenes de almacenamiento sobre los compuestos antioxidantes y especialmente en CGA. Tratamientos con 1-MCP han demostrado reducir la degradación de los compuestos fenólicos en berenjenas violetas cuando se almacena a 10 °C (Massolo y col., 2011). Gajewski y col. (2009) encontraron que los fenoles totales en la piel se incrementaron, en tanto que no se vieron afectados en la pulpa durante el almacenamiento a 20 °C.

A pesar de estos antecedentes, los cambios que se producen en los AOX fenólicos a las temperaturas recomendadas para el almacenamiento de frutos completamente desarrollados (10 °C), o en las condiciones en que los frutos sufren daño por frío (0 °C), aún no han sido evaluados. En este sentido, si bien el deterioro asociado a la maduración y senescencia es retardado por el almacenamiento a bajas temperaturas, por debajo de 10 °C las berenjenas sufren daño por frío, manifestado principalmente por la aparición de punteado, escaldaduras superficiales, oscurecimiento de las semillas y pardeamiento de la pulpa mediado por PPO (Concellón y col., 2007). A su vez, la pérdida de electrolitos del tejido vegetal que ha sufrido estrés indica indirectamente, la ocurrencia de daño en las membranas celulares y se asocia a la intensidad del daño por frío (Murata, 1989).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente Capítulo fue investigar la influencia de las condiciones de almacenamiento poscosecha (tiempo y temperatura) en la calidad y contenido de antioxidantes fenólicos de berenjenas violetas.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1. Material vegetal y condiciones de almacenamiento

Berenjenas (*Solanum melongena* L.) cv. Lucía cultivadas en La Plata (Argentina) se cosecharon en estado de madurez comercial (estado IV, ver Capítulo I) y se transportaron al laboratorio. Después de la eliminación de frutos defectuosos, las berenjenas fueron lavadas, se dejaron secar al aire y se envasaron en grupos de 2 en bandejas de plástico (PET) y fueron cubiertas con PVC perforado. Los envases conteniendo los frutos se almacenaron a 0 °C o 10 °C (85-90% HR) durante 0, 3, 5, 10 y 14 d. En cada día de muestreo, se utilizaron 20 frutos para cada temperatura evaluada. Se analizó la pérdida de electrolitos, pérdida de peso, color de la pulpa y el daño por frío en el fruto fresco inmediatamente después de la salida de cámara. Se tomaron secciones de la zona ecuatorial de los frutos pelados que se analizaron inmediatamente o bien se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. El experimento se repitió tres veces, con cosechas independientes.

### II.2. Pérdida de peso

Los frutos individuales se pesaron al inicio del experimento, y durante el almacenamiento, calculándose la pérdida de peso como se indicara en la **Sección I.3.16**. Se evaluaron veinte frutos para cada temperatura y tiempo de almacenamiento.

### II.3. Pérdida de electrolitos

Las muestras se tomaron de la región ecuatorial de 6 frutos seleccionados al azar para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento analizado de acuerdo a Concellón y col. (2005). Con un sacabocado se obtuvieron discos (0,3 cm x 0,1 cm) de la pulpa del tejido hasta un peso aproximado total de 2 g y se incubaron a 20 °C en 20 mL de 0,6 mol L<sup>-1</sup> de manitol. La conductividad de la solución se midió con un conductímetro (Oakton Modelo 510, IL, USA) al

inicio (Ci) y después de 2 h a 20 °C (Cf). Luego el tejido se homogeneizó y se centrifugó a 14.000 × g durante 15 min a 20 °C, la conductividad del sobrenadante se midió para determinar electrolitos totales (Ct). La pérdida de electrolitos se calculó como:

$$\text{Pérdida de electrolitos (\%)} = \frac{100 \times (Cf - Ci)}{Ct}$$

Los resultados se expresaron como porcentaje total de electrolitos que salieron del tejido en el tiempo de incubación. Las medidas se realizaron por triplicado.

#### II.4. Daño por frío

En cada día de muestreo, los síntomas de daño por frío (DF) internos y externos fueron analizados visualmente. El grado de DF se calculó de acuerdo con la siguiente escala, similar a la propuesta por Lederman y col. (1997) y Concellón y col. (2004): 1 = sin daños, 2 = daños leves, 3 = daños normales, 4 = daños moderados, 5 = daños severos. Las observaciones se realizaron en 20 frutos para cada temperatura y tiempo de almacenamiento. El índice DF se calculó según:

$$\text{Índice DF} = \frac{\sum (\text{Nivel de deterioro} \times \text{N}^\circ \text{ de frutos en el nivel})}{\text{N}^\circ \text{ total de frutos}}$$

#### II.5. Pardeamiento de la pulpa

Se obtuvieron rodajas de la zona ecuatorial de 0,8 cm de espesor y se midió la luminosidad de la pulpa (L\*) inmediatamente después del corte con un colorímetro (Minolta, CR-400, Osaka, Japón). Se evaluaron veinte frutos para cada temperatura y tiempo de almacenamiento, y se realizaron dos mediciones por fruto.

## II.6. Extracción de compuestos fenólicos

Se realizó la extracción de los compuestos fenólicos de una manera similar a lo detallado en la **Sección I.3.11**. Aquí 1 g de tejido congelado y molido se extrajo dos veces con 5 mL de etanol. El extracto resultante se concentró en rotavapor según se detallara en la **Sección I.3.14**. El residuo obtenido se resuspendió en 2 mL de ácido fórmico: metanol: agua (1:10:89) y se filtró a través de un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  (Osmonics Inc., Minnesota, USA) para luego ser analizados. Se realizaron tres extractos para cada temperatura y tiempo de almacenamiento.

## II.7. Contenido de compuestos fenólicos totales

Se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales en el extracto antes mencionado empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) según Singleton y col. (1999), como se detallara en la **Sección I.3.11**, empleando en este caso una alícuota de 350  $\mu\text{L}$  de extracto. El contenido de compuestos fenólicos totales se calculó mediante el uso de CGA como estándar. Las medidas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en  $\text{mg CGA kg}^{-1}$ .

Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de FC a pH alcalino generando un complejo azul. Sin embargo, otros agentes reductores como el ácido ascórbico (AA) también pueden reaccionar. Dado que el AA forma el complejo incluso a pH ácido, es posible diferenciar su contribución de la asociada a los compuestos fenólicos (Singleton y col., 1999). Con el fin de evaluar esto en los extractos, se prepararon dos series de cuatro tubos conteniendo: 1- 500  $\mu\text{L}$  agua (control), 2- 500  $\mu\text{L}$  extracto de berenjena, 3- 500  $\mu\text{L}$  de AA (50  $\text{mg L}^{-1}$ ) o 4- 500  $\mu\text{L}$  de CGA (50  $\text{mg L}^{-1}$ ). Luego 50  $\mu\text{L}$  de reactivo de FC (diluido 1:1) se añadieron a cada tubo, se dejó reaccionar 3 min y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20% en NaOH 0,1 M fueron añadidos a la primera serie de cuatro tubos (FC a pH alto) y 100  $\mu\text{L}$  de agua se agregaron a la segunda serie (FC a pH bajo). Todas las mezclas se llevaron a volumen final de 2,5 mL con agua y se incubaron a 20 °C durante 90 min. Finalmente se midió la absorbancia a 760 nm.

La contribución total de CGA más AA se determinó en la serie de tubos en el que se llevó a cabo la reacción a pH alto, mientras que el AA en forma individual fue evaluado en los tubos en los que la reacción se llevó a cabo a pH bajo. Se realizaron curvas de calibración de AA y CGA en ambas condiciones de pH, con el fin de hacer las correcciones para las diferencias en el coeficiente de extinción del complejo azul de molibdeno.

### II.8. Capacidad antioxidante por método de DPPH<sup>•</sup>

La capacidad antioxidante medida empleando el radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH<sup>•</sup>) se evaluó según Brand-Williams y col. (1995). En esta prueba, los extractos reducen el radical estable DPPH<sup>•</sup> de color violeta-púrpura a difenil-picril-hidrazina de color amarillo. La pérdida del color púrpura de la solución indica la capacidad secuestrante de radicales de las muestras. Alícuotas de extracto etanólico (50, 70, 90, 100 y 120 µL) fueron añadidas a tubos de ensayo conteniendo 1 mL de DPPH<sup>•</sup> (40 mg L<sup>-1</sup> en etanol) y llevados a un volumen final de 1,25 mL con etanol. La absorbancia a 515 nm se midió en diferentes tiempos con un espectrofotómetro (UV-Mini modelo 1240, Shimadzu, Japón) hasta que la reacción alcanzó una meseta (60 min). La cantidad de fruto necesaria para disminuir la concentración de DPPH<sup>•</sup> inicial en un 50%, se calculó y se definió como EC<sub>50</sub>. Los resultados se expresaron como poder antioxidante, EC<sub>50</sub><sup>-1</sup> (kg<sup>-1</sup>), a fin de tener una relación directa y positiva en los resultados: mayor valor numérico, mayor poder antioxidante.

Con el fin de determinar la contribución de AA y CGA en la capacidad antioxidante de los extractos, las cinéticas de estándares con DPPH<sup>•</sup> se llevaron a cabo mediante la reacción en tubos de ensayo que contenían 75 µL de extracto o bien 50 µl de AA o CGA 100 mg L<sup>-1</sup>, completando 250 µL con etanol y finalmente agregados a 1 mL de DPPH<sup>•</sup> (40 mg L<sup>-1</sup>).

### II.8. Análisis de antioxidantes por HPLC-DAD

Los extractos preparados como se indica en la **Sección II.6**, se separaron y cuantificaron por HPLC usando un sistema Waters Model 6000A LC (Milford, MA, EE.UU.) acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD). La separación cromatográfica se realizó en una columna C-18 Altex Ultrasphere™-ODS (250 mm × 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm). El caudal de la fase móvil fue de 0,5 mL min<sup>-1</sup> y consistió en un gradiente de 1% (v/v) de ácido fórmico en agua (A) y metanol (B). El tiempo total de corrida fue de 21 min y el programa de gradiente fue el siguiente: 0-30% de B (5 min), 30-50% de B (5 min), 50-70% de B (4 min), 70% de B isocrático (4 min), 70-100% de B (2 min), 100-0% de B (1 min). Los espectros UV-Vis se registraron en el rango de 210 a 600 nm y los cromatogramas fueron adquiridos a 320 nm. El volumen de inyección fue de 20 µL. Se realizó una curva de calibración empleando CGA como estándar. Las mediciones se realizaron por triplicado para cada temperatura y tiempo de almacenamiento, y los resultados se expresaron en mg CGA kg<sup>-1</sup>.

### II.9. Análisis de antioxidantes por HPLC-MSD

La técnica de HPLC-MSD se utilizó para identificar ácido quínico (AQ) y clorogénico (CGA), y cuantificar AQ. Los experimentos se realizaron con un equipo HPLC Agilent 1100 LC (Agilent Technologies Inc., EE.UU.) equipado con una bomba binaria conectado directamente a un espectrómetro de masas (MS-VL cuadrupolo, Agilent Technologies, EE.UU.). El MSD fue operado con una interfaz de ionización por electrospray en el modo negativo (ESI<sup>-</sup>) con los siguientes parámetros: temperatura y voltaje del capilar, 350 °C y 3,0 kV, respectivamente; flujo del nebulizador de gas (N<sub>2</sub>) 0,2 mL s<sup>-1</sup>; presión del nebulizador, 0,3 MPa; voltaje de fragmentación, 140 V. Los datos fueron adquiridos en el modo de barrido completo (Scan) para seguir los fragmentos representativos para AQ (*m/z* 191) y CGA (*m/z* 191-353-707). Posteriormente, el modo negativo (ESI<sup>-</sup>, *m/z* 191) fue utilizado para la identificación. La sensibilidad del espectrómetro de masas se optimizó usando estándares de AQ y CGA. La

columna, fase móvil, gradiente de solvente, flujo y volumen de inyección fueron los mismos descritos para HPLC-DAD en la **Sección II.8**. La cuantificación se realizó a partir de una curva de calibración de una solución de AQ. Se realizaron tres mediciones para cada temperatura y tiempo de almacenamiento. Los resultados se expresaron en mg AQ kg<sup>-1</sup>.

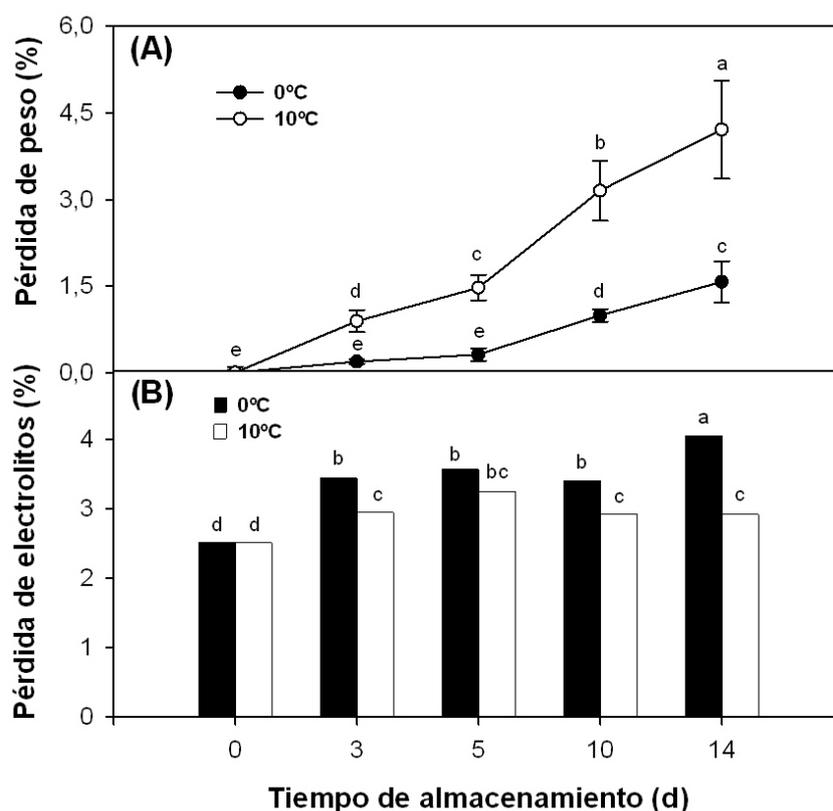
#### **II.10. Análisis estadístico**

Los experimentos se llevaron a cabo bajo un diseño completamente aleatorizado. Los resultados se sometieron a un análisis por ANOVA y las medias se compararon mediante el test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

## II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## II.1. Pérdida de peso, pérdida de electrolitos y daño por frío

La pérdida de peso se incrementó durante el almacenamiento a ambas temperaturas, pero fue mayor en los frutos mantenidos a 10 °C, así luego de 14 d ascendió a 4,2% y 1,6% en los frutos almacenados a 10 °C y 0 °C, respectivamente (**Figura II.1.A**). La pérdida de electrolitos también aumentó durante el almacenamiento a ambas temperaturas. Después de 3 d el mayor incremento se produjo en los frutos almacenados a 0 °C, sin embargo a ese tiempo todavía no se detectaron síntomas visibles de daño por frío (DF) (**Figura II.1.B**).

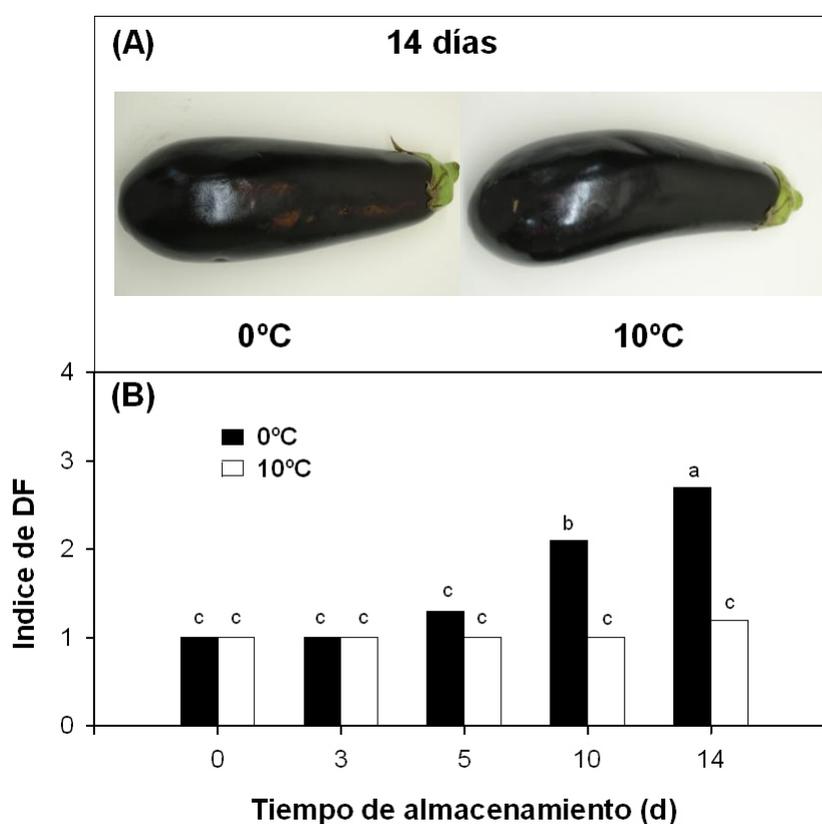


**Figura II.1. A)** Pérdida de peso y **B)** pérdida de electrolitos de berenjenas cv. Lucía, almacenadas a 0 °C o 10 °C por 14 d. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

Los valores de pérdida de electrolitos hallados en el presente trabajo con berenjenas americanas, fueron inferiores a los reportados en estudios previos en berenjenas japonesas,

que son muy susceptibles a las bajas temperaturas (Concellón y col., 2007). El parámetro continuó aumentando en los frutos almacenados a 0 °C, pero se mantuvo sin cambios en los conservados a temperatura recomendada. El mayor valor se registró luego de 14 d a 0 °C.

En lo que respecta al DF, durante los primeros días de almacenamiento (5 d) a ambas temperaturas, no se produjeron síntomas, pero a continuación pudo observarse pardeamiento interno y depresiones superficiales (**Figura II.2.A**). El índice DF aumentó rápidamente después de 10 d a 0 °C (**Figura II.2.B**) y al final del período de almacenamiento las diferencias fueron aún más notorias.



**Figura II.2. A)** Apariencia y **B)** índice de daño por frío (DF) en berenjenas cv. Lucía, almacenadas a 0 °C o 10 °C por 14 d. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

Teniendo en cuenta la apariencia externa, las berenjenas mantuvieron una calidad aceptable durante 14 d, cuando se almacenan a 10 °C. En el caso de requerirse un

almacenamiento a baja temperatura, éste no podrá extenderse por un período mayor a 5 d en berenjenas de este estado de desarrollo.

## II.2. Pardeamiento de la pulpa

El pardeamiento se ha descrito como una de las principales causas de pérdida de calidad poscosecha en berenjena (Pérez-Gilabert y García-Carmona, 2000). En este trabajo fue el principal síntoma de daño interno y se produjo en las áreas que rodean las semillas (**Figura II.3.A**). Los cambios en la pulpa, pueden evidenciarse a través del parámetro de color  $L^*$  (Luminosidad) que se muestra en la **Figura II.3.B**.

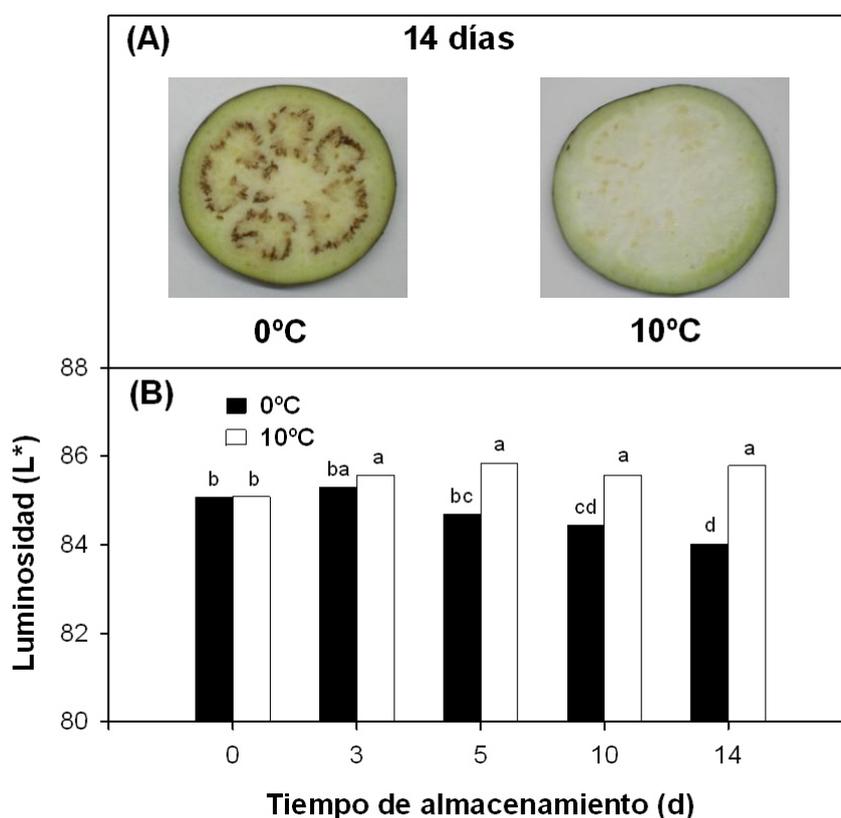


Figura II.3. A) Pardeamiento de la pulpa y B) luminosidad ( $L^*$ ) en berenjenas cv. Lucía, almacenadas a 0 °C o 10 °C por 14 d. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

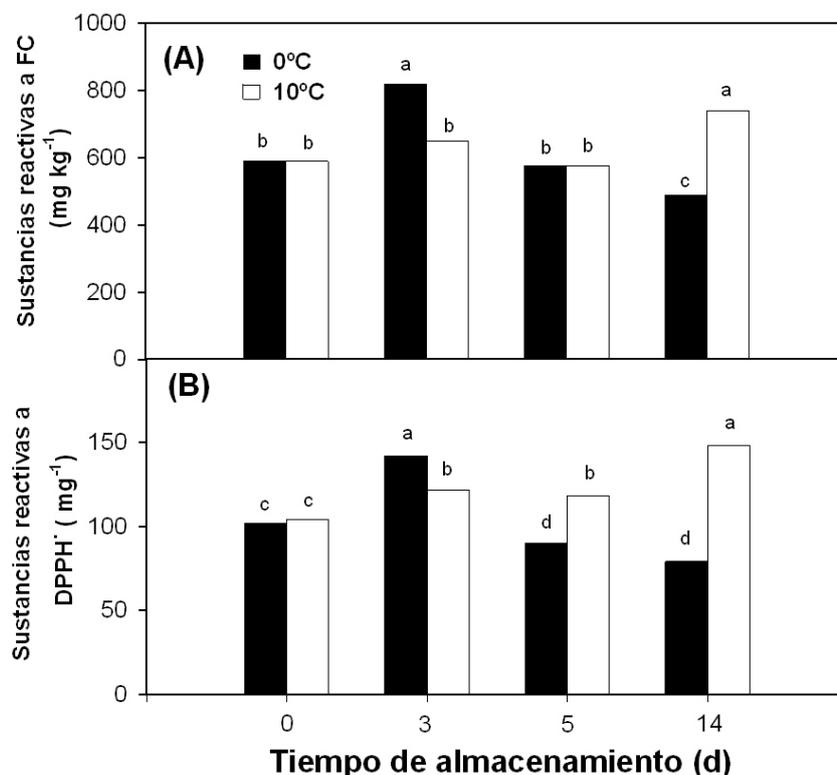
Cuando los frutos se almacenaron a 10 °C, L\* aumentó después de 3 d debido probablemente a la finalización de la degradación de la clorofila, sin observarse cambios posteriores.

### II.3. Contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante

Se evaluó la influencia de la temperatura de almacenamiento sobre el contenido de compuestos fenólicos totales de los frutos con el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) (**Figura II.4.A**). Durante los primeros 3 d de conservación a 0 °C, los antioxidantes se acumularon pero a continuación se detectó un descenso continuo, resultando en una reducción desde un máximo de 818 a 489 mg kg<sup>-1</sup>. Esteban y col. (1989), en su trabajo con frutos de berenjena violeta también encontraron un aumento inicial en el contenido de compuestos fenólicos en frutos almacenados a 10 °C. En contraste, en el presente trabajo, el contenido de compuestos fenólicos se mantuvo sin cambios a través del almacenamiento a 10 °C, excepto al final del período de conservación, momento en el que se observó un considerable incremento, que incluso fue mayor al valor inicial de cosecha.

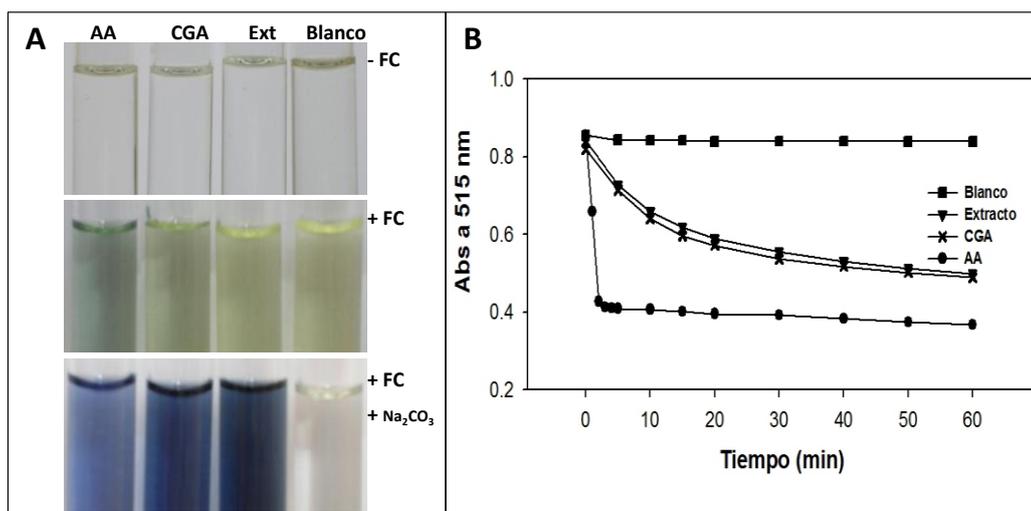
Para caracterizar mejor los cambios en los antioxidantes durante el almacenamiento poscosecha se determinó la capacidad antioxidante de los extractos, a través del análisis del contenido de sustancias reactivas a DPPH<sup>•</sup> (**Figura II.4.B**). Después de 3 d de almacenamiento en ambas temperatura, el contenido de compuestos capaces de secuestrar el radical DPPH<sup>•</sup> aumentó, con el mayor incremento cuando los frutos se mantuvieron a 0 °C. Más adelante, el contenido de AOX continuó aumentando a 10 °C, sin embargo una rápida degradación se encontró a 0 °C. Finalmente, luego de 14 d a esta temperatura, los frutos presentaron menor capacidad AOX que al momento de la cosecha, a diferencia de las berenjenas mantenidas a 10 °C, que tuvieron un importante aumento (60%). La capacidad AOX medido con el método de DPPH<sup>•</sup> mostró una tendencia similar a la del contenido de compuestos fenólicos totales. Ayala-

Zavala y col. (2004), han informado que la capacidad anti-radical de algunos productos vegetales puede aumentar durante el almacenamiento poscosecha.



**Figura II.4. A)** Sustancias reactivas a Folin–Ciocalteu (FC) y **B)** sustancias reactivas a DPPH<sup>•</sup> en berenjenas cv. Lucía, almacenadas a 0 °C o 10 °C por 14 d. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

Aunque el ensayo de FC fue desarrollado para la estimación de fenoles totales, el AA también reacciona con el polifosfotungstato en condiciones ácidas (pH 3) (Singleton y col., 1999). Al analizar el desarrollo del color en el ensayo FC a pH bajo o alto, se pudo establecer la contribución de AA y CGA como sustancias reactivas a FC en los extractos de berenjena. En las muestras analizadas, el desarrollo del color tras la reacción con el reactivo de FC se produjo sólo a pH alto (**Figura II.5.A**). Esto, junto con el estudio de la cinética de las muestras por reacción con el radical DPPH<sup>•</sup>, que evidenciaron un perfil similar al de CGA (**Figura II.5.B**), sugiere que las principales modificaciones durante el almacenamiento de berenjena se produjeron en los compuestos fenólicos.



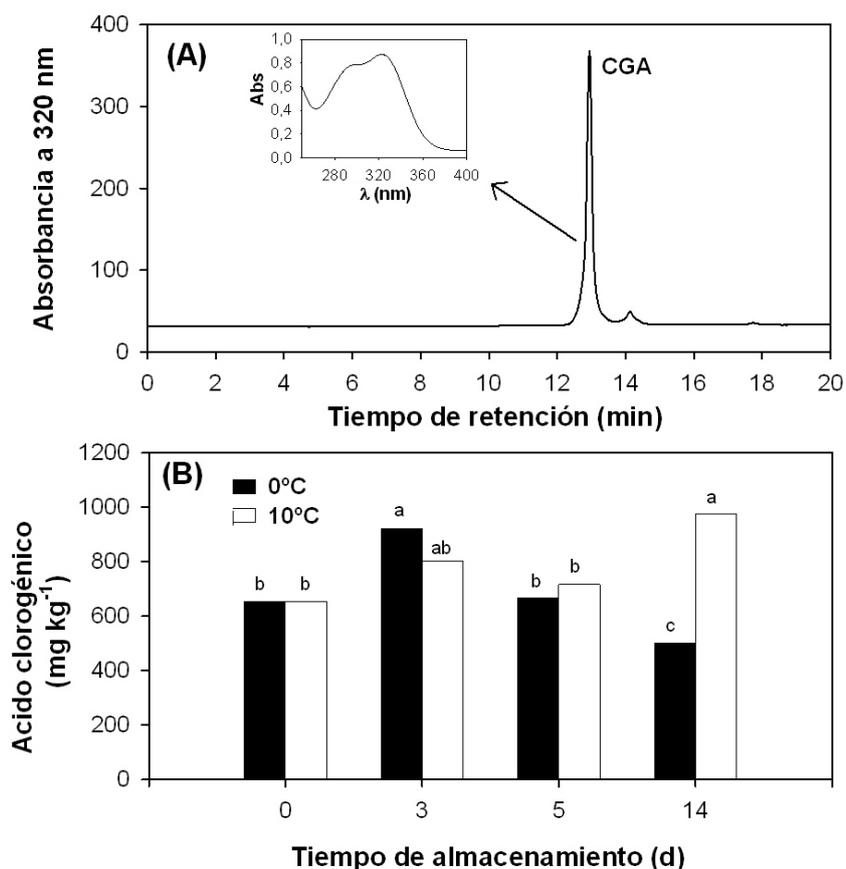
**Figura II.5.A)** Desarrollo de color en el ensayo de Folin-Ciocalteu (FC) por reacción con ácido ascórbico (AA), ácido clorogénico (CGA) o extracto de berenjena (Ext) y **B)** Cinéticas típicas de la reacción entre extractos de berenjena, CGA o AA con el radical DPPH<sup>•</sup>, medidas por su absorbancia (Abs) a 515 nm.

Se ha informado que la reducción en el nivel de los antioxidantes fenólicos durante el almacenamiento en berenjena, ocurre asociada con reacciones de pardeamiento. Interesantemente, en frutos almacenados a 0 °C y 10 °C, no se encontró correlación entre el pardeamiento y la actividad PPO o POD (Concellón y col., 2004; Massolo y col., 2011). La degradación de los compuestos fenólicos en berenjena, posiblemente estaría limitada por la compartimentalización de las enzimas y sustratos, que podría haberse perdido durante el almacenamiento a temperaturas de daño por frío. El rápido pardeamiento que ocurre durante el corte de los frutos, incluso antes de su almacenamiento, sugiere que las enzimas y los sustratos se encuentran fácilmente disponibles. Además de esto, el problema parece ser mucho más complejo. La pérdida de compuestos fenólicos solubles podría producirse en algunos productos asociada a la lignificación de semillas y tejidos vasculares, sin embargo estudios más profundos sobre este aspecto resultan necesarios (Liu y Jiang, 2006).

#### **II.4. Compuestos fenólicos por HPLC**

Las modificaciones de los compuestos fenólicos en berenjena se analizaron por HPLC-DAD. Un pico principal correspondiente a un compuesto con el mismo tiempo de retención y espectro que CGA, se detectó en todas las muestras (**Figura II.6.A**). Los cambios encontrados en CGA durante el almacenamiento de berenjena (**Figura II.6.B**), mostraron una tendencia similar a las descritas para las sustancias reactivas a DPPH<sup>•</sup> y FC. Estudios previos han demostrado que los ácidos hidroxicinámicos conjugados y en particular el CGA normalmente representan entre el 70% y 95% de los fenoles totales en la pulpa de berenjena (Whitaker y Stommel, 2003; Stommel y Whitaker, 2003).

Los resultados hallados, muestran que el incremento de la capacidad antioxidante en berenjenas almacenadas a 10 °C durante 14 d y la reducción en los frutos mantenidos a 0 °C (**Figura II.4.B**), se deben principalmente a los cambios producidos en el nivel de CGA (**Figura II.6.B**). En relación a ello, se ha demostrado que las variaciones de temperatura pueden modular la acumulación de CGA (Joët y col., 2010). De forma similar, en otros estudios se ha comprobado que los compuestos fenólicos se acumulan en respuesta a varios tipos de estrés, incluyendo la baja temperatura (Clé y col., 2008; Massolo y col., 2011). En este trabajo, el aumento de CGA ocurrió a ambas temperaturas de almacenamiento, pero a 10 °C se encontró un alto nivel CGA aún al final del período de conservación. Por su parte, a 0 °C el daño por frío favoreció una rápida disminución de este AOX. Aunque la biosíntesis de CGA no está completamente dilucidada, trabajos recientes sugieren que este compuesto podría estar formado a partir de ácido quínico (AQ) y cafeil-CoA, por acción de la enzima hidroxicinamato-hidroxicinamoilquinato-transferasa (HQT) (Sonnante y col., 2010), la que podría ser limitante en algunos casos. Clé y col. (2008) encontraron bajo contenido de CGA en líneas con genes HQT silenciados mientras que una sobreexpresión de HQT en tomate ha dado lugar a un aumento de 70 veces en el contenido de CGA (Niggeweg y col., 2004).



**Figura II.6. A)** Panel principal: Cromatograma típico de extractos de berenjena. Panel interno: espectro de máxima absorción del CGA y **B)** contenido de CGA en berenjenas cv. Lucía, almacenadas a 0 °C o 10 °C por 14 d. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

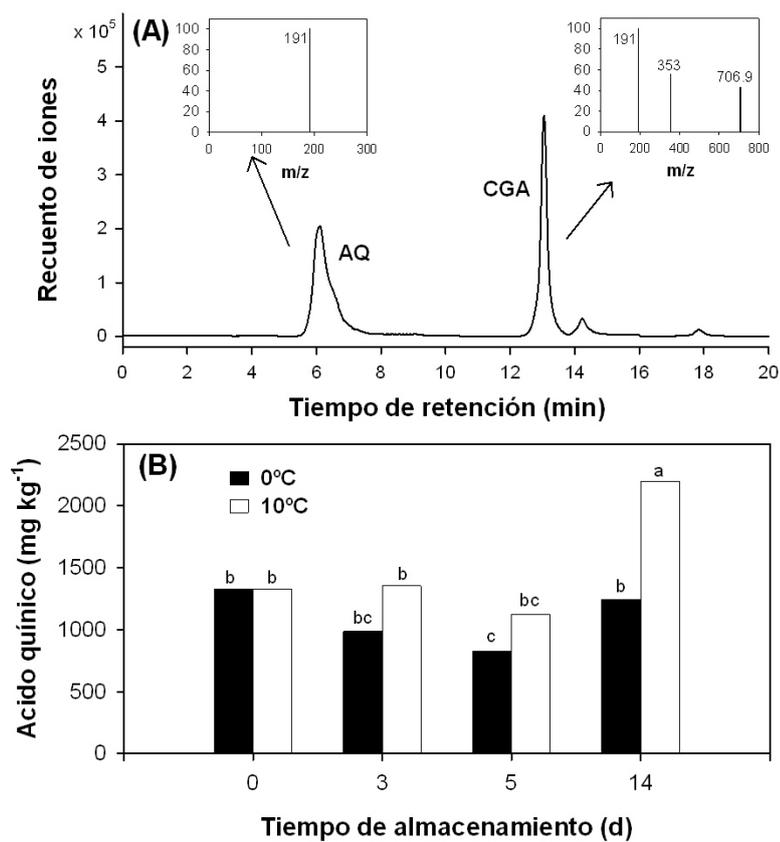
El dramático incremento de CGA encontrado a 10 °C sin detección de ácido cafeico (AC) libre, sugiere que este compuesto debe ser rápidamente esterificado con AQ durante su biosíntesis. Además, la producción de AC aumentaría a medida que se activa la ruta de biosíntesis de los derivados tales como CGA. Trabajos previos apoyan esta hipótesis ya que muestran que la enzima fenilalanina amonio-liasas (PAL), aumentó en berenjena a bajas temperaturas (Massolo y col., 2011) y que la biosíntesis de CGA podría aumentar en refrigeración (Joët y col., 2010). Sin embargo, la disponibilidad de AC conjugado, que sería indetectable sin hidrólisis de la muestra, no se puede descartar.

En frutos almacenados a 0 °C la caída del contenido de CGA después de un almacenamiento a largo plazo también se produjo sin acumulación de AC. Esto puede ser el

resultado de su participación directa en el pardeamiento mediado por la enzima PPO (**Figura II.3.B**) o por la rápida oxidación del AC tras la hidrólisis del CGA. En este último caso, un aumento transitorio de AQ, debería ser encontrado.

Para avanzar en la comprensión sobre los cambios del metabolismo de CGA en el almacenamiento poscosecha de berenjena, se evaluaron los extractos etanólicos por HPLC-MSD. Los resultados de las corridas típicas se muestran en la **Figura II.7.A**, detectándose dos picos principales con tiempos de retención de 6,2 y 13,0 min, que fueron identificados por sus espectros de masas como AQ y CGA, respectivamente. Debido a su estructura química (ausencia de dobles enlaces) AQ se detectó por MSD y no por DAD. Otros picos menores se observaron a tiempos de retención de 14,2 y 17,8 min. Sus espectros de masa muestran un  $m/z$  de 249 y 468, y son referidos en la literatura como N-cafeil-putrescina y N,N-dicafeil-espermidina (Whitaker y Stommel, 2003; Stommel y Whitaker, 2003).

Durante el almacenamiento, el AQ se incrementó al doble de su concentración luego de 14 d a 10 °C y mostró cambios menores en frutos mantenidos a 0 °C (**Figura II.7.B**). La acumulación de AQ a 10 °C, podría contribuir al incremento del “pool” de uno de los precursores para la biosíntesis de CGA, que permanece activa a esta temperatura. A 0 °C, la caída en CGA, junto con la ausencia de AC libre y la falta de acumulación de AQ, después de 14 d apoya la posibilidad de que CGA podría ser el principal sustrato para reacciones de pardeamiento. Sin embargo parte del AC podría ser también dirigido a la biosíntesis de lignina, ensayos referidos a esta hipótesis serían necesarios para determinar su destino de manera inequívoca.



**Figura II.7. A)** Panel principal: típico HPLC-MSD de extractos de berenjena. Panel interno: espectro de masas del AQ y CGA como los fragmentos más abundantes y **B)** contenido de AQ en berenjenas cv. Lucía almacenadas a 0 °C o 10 °C por 14 d. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

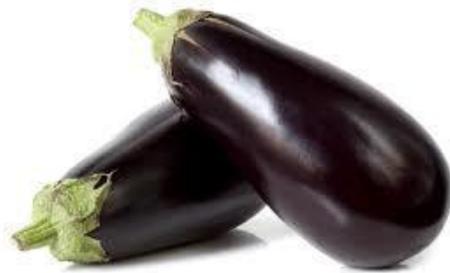
## **II. CONCLUSIONES**

En el presente Capítulo se observó que los antioxidantes fenólicos presentes en berenjena se ven muy afectados por la temperatura de almacenamiento poscosecha a la que son sometidos los frutos. Mientras que a 10 °C hay una continua acumulación de CGA, los frutos mantenidos a 0 °C mostraron un aumento transitorio de antioxidantes seguido de un notorio y rápido descenso, la aparición de pardeamiento de la pulpa y desarrollo de daño por frío, asociado también a una mayor pérdida de electrolitos.

El incremento de compuestos fenólicos observado a 10 °C, aumenta significativamente la capacidad AOX de los frutos y, potencialmente, los beneficios asociados con su consumo. Aunque la regulación de las vías que participan en la biosíntesis de compuestos fenólicos aún no han sido completamente dilucidadas, estos resultados podrían ser de interés desde el punto de vista nutricional para consumidores y mejoradores, sin embargo este comportamiento también daría lugar a un mayor contenido de sustratos para el pardeamiento.

## **CAPÍTULO III.**

***“Distribución, estabilidad y destino de los compuestos fenólicos en berenjenas violetas y blancas”***



### **III. INTRODUCCIÓN**

En el capítulo I del presente trabajo de Tesis, se determinó la influencia del estado de desarrollo de los frutos sobre los diferentes grupos de antioxidantes, mientras que en el Capítulo II se analizaron los cambios globales que ocurren en los AOX de naturaleza fenólica durante el almacenamiento a temperaturas recomendadas (10 °C) y de daño por frío (0 °C). Independientemente de la variable estudiada, en general se ha analizado el contenido antioxidante global y sólo unos pocos informes han intentado determinar su patrón de acumulación dentro del pericarpio de los frutos de berenjena. Whitaker y Stommel (2003) evaluaron la distribución longitudinal de los compuestos fenólicos y encontraron que los isómeros del ácido cafeoil-quinico, incluido el CGA se encuentran en la sección media del fruto para todos los genotipos evaluados, y también en el extremo apical en variedades violetas. En este sentido, los compuestos fenólicos son uno de los mayores grupos de compuestos bioactivos presentes en vegetales, y el interés en la identificación de su modo de acción, distribución, destino y estabilidad en productos frescos, ha aumentado notoriamente (El-Seedi y col., 2012; Sivakumar y col., 2012).

Sumado a esto, a pesar de la gran variación fenotípica encontrada en berenjena, la mayor investigación realizada hasta la fecha se ha centrado en las variedades de color violeta, mientras que las ralladas y blancas han recibido poca atención. El amplio grado de variación en el contenido de fenoles entre especies y variedades de berenjena (Whitaker y Stommel, 2003; Stommel y Whitaker, 2003), junto a un relativamente alto valor de heredabilidad de este compuesto, determinan que podrían generarse programas de mejoramiento para el desarrollo de nuevas variedades con alto contenido de compuestos fenólicos (Plazas y col., 2013b).

Los diferentes genotipos pueden mostrar grandes variaciones no sólo en términos de su concentración total de AOX, sino también en su estabilidad. Sin embargo, esto no se ha

determinado completamente. Por analogía con otros frutos y a partir de lo que ocurre en frutos procesados, la degradación de los compuestos fenólicos en berenjenas enteras se ha asociado con el pardeamiento, que resulta de la acción de enzimas polifenoloxidasas (PPO) y en ciertos casos de peroxidasas (POD) (Flick y col., 1977; Mennela y col., 2010). Si bien esto pareciera ser lo que ocurre en condiciones de almacenamiento que generan daño por frío (Capítulo II), no está claro cuál es la situación en frutos almacenados en condiciones recomendadas (10 °C) por largos períodos.

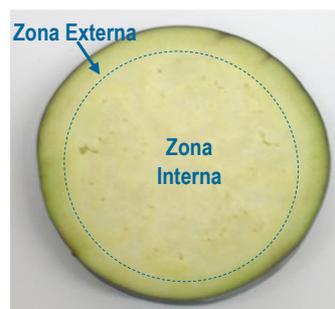
A fin de lograr una mayor comprensión sobre la deposición, estabilidad y destino de los compuestos fenólicos en frutos de berenjena, en el presente Capítulo se evaluó la distribución de antioxidantes y compuestos fenólicos en la zona interna (I) y externa (E) de la pulpa de berenjenas violetas y blancas, así como su estabilidad durante el almacenamiento a temperatura recomendada. El contenido de peróxido de hidrogeno, la histolocalización de PPO y POD, así como de CGA, el sustrato potencial de estas enzimas más abundante en los frutos, fueron también determinados.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. Material vegetal, condiciones de almacenamiento y muestreo

Berenjenas violetas y blancas (*Solanum melongena* L.) cv. Lucía y Cloud Nine, respectivamente, producidas en La Plata (Argentina), fueron cosechadas en madurez comercial (Estado IV, ver **Sección I.1**) y se transportaron al laboratorio. Después de la eliminación de los frutos defectuosos, las berenjenas se lavaron por inmersión durante 3 min en agua clorada (100 mg L<sup>-1</sup> NaClO, pH 6.5). Los frutos se envasaron luego en bandejas de polietileno-tereftalato (PET), se cubrieron con film de cloruro de polivinilo (PVC) perforado y se almacenaron a 10 °C (90-95% HR) durante 0, 14 o 30 d (d). La tasa respiratoria y la pérdida de peso se determinaron en los frutos enteros. Luego se tomaron tres discos o rodajas (10 mm de espesor) de la sección media de cada uno de ellos e inmediatamente se utilizaron para la determinación del color de pulpa y el análisis histoquímico de ácido clorogénico, enzima polifenoloxidasas y enzima peroxidasa. Muestras de frutos destinadas al análisis bioquímico se obtuvieron a partir de otros tres discos (10 mm de espesor) de la región ecuatorial.

Las rodajas se pelaron y dividieron en dos zonas diferentes de pulpa (zona interna, I, y zona externa, E). La zona E se obtuvo mediante la separación de 4 mm de tejido de la región más externa, mientras que la parte central restante fue considerada como la zona interior.



Las muestras correspondientes a cada zona del fruto se procesaron inmediatamente o se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Se emplearon treinta frutos para cada variedad y tiempo de almacenamiento. El experimento se repitió dos veces.

### III.2. Pérdida de peso

Los frutos individuales se pesaron al inicio del experimento, y durante el almacenamiento. La pérdida de peso se calculó como se indicara en la **Sección I.3.16**. Se evaluaron treinta frutos por cada variedad y tiempo de almacenamiento. Los resultados se expresaron como porcentaje de pérdida de peso.

### III.3. Tasa respiratoria

Para la determinación de la tasa respiratoria (TR), dos frutos fueron colocados dentro de un frasco de vidrio hermético según se detallara en la **Sección I.3.3**. Se realizaron cuatro repeticiones para cada variedad y tiempo de almacenamiento, y los resultados se expresaron en  $\mu\text{L CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

### III.4. Azúcares solubles

Aproximadamente 1 g de tejido congelado de la pulpa de berenjena perteneciente a las zonas I o E, fue procesado en molinillo (Modelo A11, IKA Works Inc., SP Brasil) y transferido a un tubo Corex® conteniendo 5 mL de etanol. La suspensión se agitó en vórtex y después se centrifugó a 14,000  $\times g$  durante 10 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y el pellet se volvió a extraer con 5 mL de etanol y se centrifugó como se describió anteriormente. Los sobrenadantes se combinaron y se utilizaron para los análisis posteriores. Las determinaciones para cada zona, variedad y tiempo de almacenamiento se realizaron por duplicado.

Los azúcares se midieron de acuerdo a Yemm y Willis (1954), empleando el reactivo de antrona. Se tomaron alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de los correspondientes extractos etanólicos y se llevaron a 500  $\mu\text{L}$  con agua. Se añadió 1 mL de antrona (2 g  $\text{L}^{-1}$  en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98% p/p) y se mantuvo durante 10 min en un baño de agua a 100 °C. Los tubos se enfriaron y seguidamente se midió la absorbancia a 620 nm en espectrofotómetro (UV-Mini modelo 1240, Shimadzu Corporation,

Japón). Se empleó glucosa (Glu) como estándar. Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en g Glu kg<sup>-1</sup>.

### III.5. Acidez

La pulpa congelada de las zonas I y E de los frutos se procesó en un molinillo (Modelo A11, IKA Works Inc., SP Brasil) y 15 g del polvo resultante se pesaron en un vaso de precipitado. Se añadieron 100 mL de agua y la acidez se determinó mediante titulación con NaOH 0,1 M hasta pH 8,2 (AOAC, 1980). Se realizaron cuatro repeticiones para cada zona, variedad y tiempo de almacenamiento. Los resultados se expresaron como mmol H<sup>+</sup> kg<sup>-1</sup>.

### III.6. Color de la pulpa

Se determinó la luminosidad (L\*) de la pulpa y se registraron los valores de cromaticidad a\* y b\* para calcular el ángulo de tono (hue= 180 - tg<sup>-1</sup> b\*/a\*) como se indicó en la **Sección II.5**. Se tomó una rodaja (10 mm de espesor) de la región ecuatorial de los frutos y se midió el color inmediatamente después del corte en ambas zonas (I y E). Se realizaron treinta mediciones para cada variedad, zona y tiempo de almacenamiento.

### III.7. Capacidad antioxidante frente a los radicales DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup>

Los extractos etanólicos de la pulpa de berenjena, preparados como se describió en la **Sección III.4**, se utilizaron para medir la capacidad antioxidante frente a los radicales libres DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup>. El ensayo de DPPH<sup>•</sup> se evaluó según Brand-Williams y col. (1995) como se indicó anteriormente en la **Sección II.8**. Se emplearon alícuotas de extracto de 0, 5, 10, 20, 30, 40 o 50 µL. Las muestras se midieron por triplicado para cada zona, variedad y tiempo de almacenamiento. Los resultados se expresaron como EC<sub>50</sub><sup>-1</sup> (kg<sup>-1</sup>).

El ensayo empleando ABTS<sup>•+</sup> se realizó de acuerdo a lo descrito previamente por Arnao y col. (2001). La solución madre y la solución de trabajo de ABTS<sup>•+</sup> se prepararon como se

indica en la **Sección I.3.12**. En esta oportunidad se añadió una alícuota de 20 µL de extracto etanólico a 1 mL de solución de trabajo de ABTS<sup>•+</sup>. Las muestras se midieron por triplicado para cada zona, variedad y tiempo de almacenamiento. Se utilizó Trolox como estándar y los resultados se expresaron como Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) en mmol Trolox kg<sup>-1</sup>.

### III.8. Compuestos fenólicos

Alícuotas de los extractos etanólicos preparados como se describió en la **Sección III.4** se utilizaron para determinar el contenido de compuestos fenólicos totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999), según se detallara en la **Sección I.3.11**, empleando aquí 350 µL. El contenido de compuestos fenólicos se calculó utilizando ácido clorogénico como estándar. Las muestras se midieron por triplicado para cada zona, variedad y tiempo de almacenamiento. Los resultados se expresaron como mg CGA kg<sup>-1</sup>.

El análisis de CGA por HPLC se realizó en los extractos etanólicos de berenjenas violetas y blancas, para determinar la correlación con los ensayos espectrofotométricos. Los extractos se concentraron en un evaporador rotatorio (modelo R-124, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza) a 40 °C. El residuo obtenido se resuspendió en 5 mL de una mezcla agua:metanol (90:10) y seguidamente, los extractos se filtraron a través de un filtro de nylon de 0.45 µm (Osmonics Inc., Minnesota, USA). Los fenoles se separaron y cuantificaron como se indica en la **Sección I.3.16**.

### III.9. Localización histoquímica de ácido clorogénico

La localización *in situ* del CGA se realizó con el reactivo de Neu, de acuerdo a Mondolot y col. (2006), con ligeras modificaciones. El CGA fue identificado por visualización de la fluorescencia de color verde claro cuando se excitó con luz ultravioleta. Para realizar la tinción

se tomaron rodajas de berenjena (10 mm de espesor) de la sección ecuatorial del fruto y se sumergieron 30 segundos en 10 mL de reactivo de Neu (2-amino-etil-difenilborinato 1% p/v en metanol). Las rodajas fueron luego inmediatamente examinadas en un microscopio de fluorescencia (Estereomicroscopio Leica MZ10 F modular, Leica Microsystems Ltd, Alemania). Las muestras se excitaron a 425 nm y se evaluó la emisión de fluorescencia a 480 nm. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Leica DFC490 (Leica Microsystems Ltd., Alemania, 8 megapíxeles) acoplada al sistema. Los controles negativos se obtuvieron mediante el análisis de las rodajas sumergidas en metanol durante 30 s. La determinación se realizó por triplicado para cada zona, variedad y tiempo de tratamiento.

### III.10. Ensayos enzimáticos

La extracción y medición de la actividad de la enzima polifenoloxidasas (PPO) se realizó de acuerdo a Concellón y col. (2004), con modificaciones menores. Aproximadamente 5 g de pulpa congelada de ambas zonas y tipos de berenjena, se molieron en molinillo y se homogeneizaron con 20 mL de buffer fosfato (50 mM, pH 6,5); polivinilpolipirrolidona (PVPP, 10 g L<sup>-1</sup>) y Triton-X100 (0,1% v/v). La suspensión se centrifugó a 14.000 × g durante 15 min a 4 °C, y el sobrenadante se utilizó para ensayar la actividad PPO. La mezcla de reacción fue preparada a partir de buffer fosfato (100 mM, pH 6,5), 1 mL de pirocatecol (20 mM) y 50 µL de extracto, en un volumen total de 3 mL. A continuación, se incubó a 25 °C y la actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente a 410 nm. Tres extractos se prepararon para cada zona, variedad y tiempo de almacenamiento, mientras que para cada uno de ellos las medidas se realizaron por triplicado. Una unidad de actividad enzimática (UAE) se definió como la cantidad de extracto capaz de producir una variación de absorbancia de 0,1 unidades por min, bajo las condiciones de ensayo. Los resultados se expresaron como UAE kg<sup>-1</sup>.

La extracción y actividad de la enzima peroxidasa (POD) se determinó de acuerdo a Massolo y col. (2011). Aproximadamente 5 g de pulpa congelada se molieron en un molinillo y se añadieron a 20 mL de buffer fosfato (50 mM, pH 6,5); polivinilpolipirrolidona, (PVPP 10 g L<sup>-1</sup>), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 1 mM) y NaCl (1 M). La suspensión se centrifugó a 14.000 ×g durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para el ensayo de actividad de POD. La mezcla de reacción fue preparada a partir de 300 µL de buffer fosfato (50 mM, pH 6.5); 300 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8 mM); 200 µL de pirogalol (45 mM) y 50 µL de extracto enzimático. Seguidamente se incubó a 25 °C y la actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente a 430 nm. Se prepararon tres extractos para cada zona, variedad y tiempo de almacenamiento y las medidas se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como UEA kg<sup>-1</sup>.

#### III.11. Localización histoquímica de PPO y POD

La detección histoquímica de PPO se llevó a cabo de acuerdo con Onsa y col. (2007) mediante la incubación de rodajas (10 mm de espesor), obtenidas de la región ecuatorial de los frutos de ambas variedades, durante 2 h en 15 mL de buffer fosfato (100 mM, pH 6,0) conteniendo 0,5 mL de catecol (50 mM) y 0,25 mL de catalasa (2 mg mL<sup>-1</sup>). Correspondientes controles se realizaron por inmersión de las muestras como se describe anteriormente, pero sin catecol. Luego de la incubación a temperatura ambiente, las rodajas se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Estereomicroscopio Leica MZ10 F modular, Leica Microsystems Ltd, Alemania). Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Leica DFC490 (Leica Microsystems Ltd., Alemania, 8 megapíxeles) acoplada al sistema. La histolocalización se realizó por triplicado en rodajas pertenecientes a cada variedad y tiempo de tratamiento.

POD se localizó *in situ* siguiendo el procedimiento descrito por McInnis y col. (2006). Rodajas de 10 mm de espesor, fueron tomadas de la región ecuatorial de los frutos y se

incubaron con 15 mL de buffer fosfato (100 mM, pH 7,4) conteniendo 0,5 mL de guayacol (0.25% v/v) y 0,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM). Después de 2 h a 20 °C, las muestras fueron observadas y las imágenes adquiridas como se describió anteriormente para PPO. Los controles correspondientes se prepararon mediante la inmersión de las muestras en las mismas condiciones, pero sin la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### III.12. Contenido de peróxido de hidrógeno

La determinación se realizó de acuerdo al método descrito por Gómez y col. (2008), basado en la oxidación del reactivo Amplex Red, a pH 7,4, por parte del peróxido de hidrógeno en presencia de la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). Para el análisis, se tomaron muestras de la zona I y E de rodajas de berenjenas (10 mm de espesor) obtenidas de la región ecuatorial de los frutos. Se obtuvieron con sacabocados discos de tejido (6 mm de diámetro x 2 mm de espesor) pertenecientes a cada zona de la rodaja. A continuación, se tomaron quince unidades con un peso total aproximado de 0.1 g y se incubaron a 20 °C con 993 µL de buffer fosfato (50 mM, pH 7.4), 5 µL de reactivo Amplex Red® (5 mM) y 2 µL de HRP (10 UI mL<sup>-1</sup>). Luego de 180 min de reacción se midió la absorbancia a 560 nm en espectrofotómetro. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada zona, variedad y tiempo de almacenamiento. Se realizó una curva de calibración con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los resultados se expresaron en mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>, liberados luego de 180 min.

### III.13. Análisis estadístico

Se empleó un diseño factorial, siendo los factores la variedad (berenjenas blancas y violetas), y el tiempo de almacenamiento a 10 °C (0, 14 y 30 d) para la tasa respiratoria y la pérdida de peso. El factor zona del pericarpio (interior, I y exterior, E) se sumó para las restantes determinaciones. Los resultados se sometieron a un análisis por ANOVA y las medias se compararon mediante el test LSD de Fisher con un nivel de significancia de P < 0.05.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

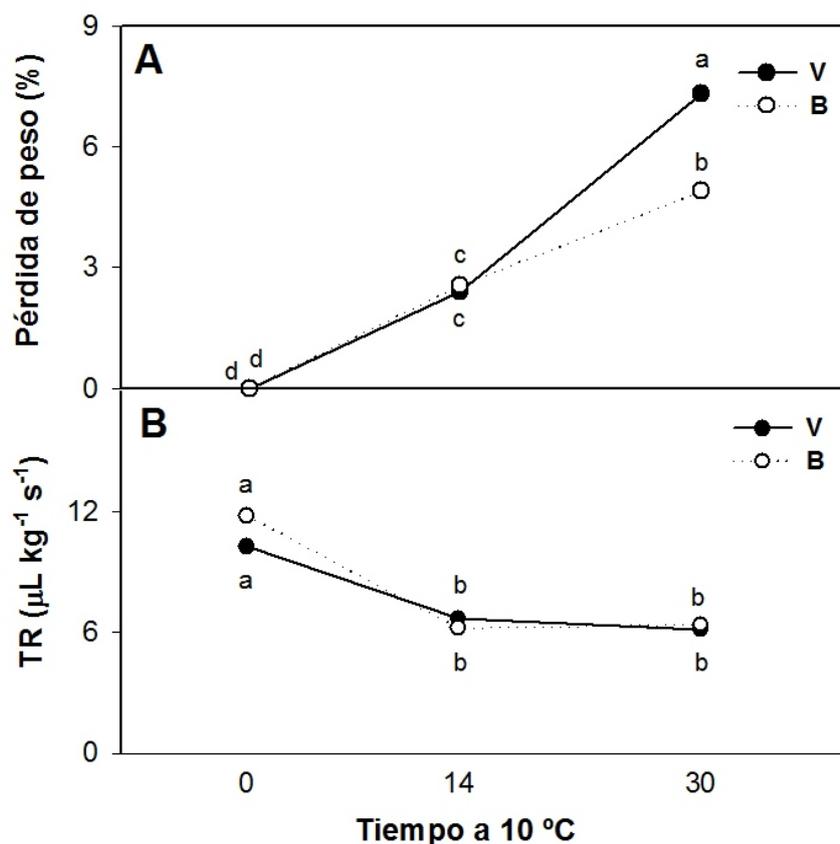
#### III.1. Apariencia de los frutos, pérdida de peso y tasa respiratoria

Las berenjenas blancas sufrieron menor deterioro que los frutos violetas luego de 30 d de almacenamiento (**Figura III.1**). Los principales factores que redujeron la calidad fueron la deshidratación, la presencia de escaldaduras superficiales y el marchitamiento de las puntas del cáliz. Como se mencionó anteriormente, las berenjenas son muy susceptibles al pardeamiento cuando los frutos son almacenados a temperaturas de daño por frío o durante el procesado (Mishra y col., 2012). En el presente trabajo, en el que el almacenamiento de frutos enteros se llevó a cabo a 10 °C, incluso luego de 30 d, no se detectaron marcados síntomas de pardeamiento o cambios en el color de la pulpa, independientemente de la variedad evaluada (**Figura III.1**).



**Figura III.1.** Apariencia de berenjenas violetas y blancas almacenadas a 10 °C por 30 d.

A su vez, las berenjenas violetas resultaron más propensas a la deshidratación que los frutos blancos (**Figura III.2.A**), con valores de pérdida de peso que alcanzaron 7.3 y 4.8%, respectivamente, luego de 30 d a 10 °C. La tasa respiratoria fue moderada (10-12  $\mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) y resultó comparable entre variedades, como se observa en la **Figura III.2.B**. La producción de  $\text{CO}_2$  disminuyó a través del almacenamiento mostrando un patrón no climático.



**Figura III.2.A)** Pérdida de peso y **B)** Tasa respiratoria (TR) de berenjenas violetas (V) y blancas (B) almacenadas a 10 °C por 0, 14 o 30 d. Valores con letras distintas indican diferencias en un test de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

### III.2. Distribución de azúcares y ácidos

Las berenjenas violetas mostraron un mayor nivel de hidratos de carbono solubles que los frutos blancos (**Tabla III. 1**). En ambas variedades, el mayor contenido de azúcares (alrededor de 20%) se encontró en la zona interior del fruto y no manifestó ningún cambio durante el almacenamiento. En ambas zonas del pericarpio, las berenjenas violetas presentaron también mayor acidez que las blancas. En contraposición a lo que ocurrió con los azúcares, los ácidos fueron más abundantes en la zona E de la pulpa. El cambio principal de éstos durante el almacenamiento poscosecha fue una reducción de la acidez en la zona externa (E) de los frutos violetas luego de 30 d (**Tabla III.1**).

**Tabla III. 1.** Azúcares, acidez, color (hue) y luminosidad (L\*) en las zonas interior (I) y exterior (E) de la pulpa de berenjenas violetas y blancas almacenadas a 10 °C por 0, 14 o 30 d. Valores con letras distintas indican diferencias en un test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

Variedad y zona		Tiempo a 10 °C (d)		
		0	14	30
<b>Azúcares</b> (g kg <sup>-1</sup> )	Violeta-I	41,2 a	44,2 a	42,4 a
	Violeta-E	35,6 b	36,9 b	35,0 b
	Blanca-I	34,0 b	36,9 b	34,5 b
	Blanca-E	26,6 c	26,3 c	29,8 c
<b>Acidez</b> ([H <sup>+</sup> ] mmol kg <sup>-1</sup> )	Violeta-I	35,4 b	32,3 c	36,5 b
	Violeta-E	46,9 a	45,5 a	37,0 b
	Blanca-I	32,2 c	30,5 cd	28,3 d
	Blanca-E	37,7 b	31,1 cd	37,5 b
<b>Color (hue)</b>	Violeta-I	105,0 c	102,0 e	101,7 e
	Violeta-E	114,3 a	112,3 b	113,2 b
	Blanca-I	100,6 f	99,3 g	101,3 d
	Blanca-E	103,2 d	104,1 cd	101,0 b
<b>Luminosidad (L*)</b>	Violeta-I	85,02 e	85,17 e	85,41 e
	Violeta-E	78,76 f	78,94 f	76,70 f
	Blanca-I	86,18 d	86,14 d	86,67 cd
	Blanca-E	87,57 ab	88,14 a	87,22 bc

### III.3. Color de la pulpa

Además de la distinción evidente en el color de la piel entre las variedades de berenjena, el color de la pulpa también difirió. La zona E de las berenjenas violetas mostró un anillo verdoso (mayor valor de hue) asociado con la presencia residual de clorofilas mientras que la región central presentó un tono de color amarillo claro (menor valor de hue) (**Figura III.1**). El ángulo hue disminuyó en ambas zonas del pericarpio de los frutos violetas después de 14 d, sin observarse modificaciones posteriores (**Tabla III.1**). Los frutos blancos presentaron una pulpa

más luminosa (**Figura III.1**) y solo ligeras variaciones de color se observaron entre las zonas I y E, y durante el almacenamiento en este tipo de frutos (**Tabla III.1**).

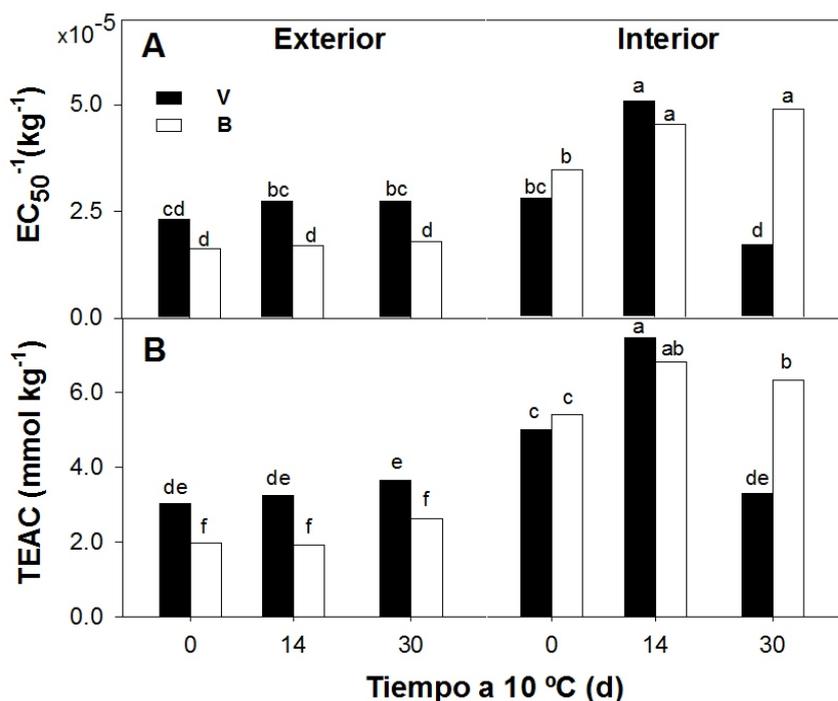
En resumen, las berenjenas blancas tuvieron una mayor capacidad de almacenamiento que los frutos violetas. Los genotipos mostraron diferencias en la acidez y el contenido de azúcares, aunque su distribución relativa fue similar; los azúcares resultaron ser más prominentes en la zona interna del fruto (I), mientras que los ácidos fueron más abundantes en la periferia del fruto (E). Por otra parte, para ambas variedades el pardeamiento interno no fue un factor importante en el deterioro durante el almacenamiento a 10 °C.

#### **III.4. Capacidad antioxidante**

Mientras que los niveles totales de AOX en berenjena han sido bien establecidos, su distribución en la pulpa y la estabilidad en diferentes genotipos, han recibido muy poca atención (Whitaker y Stommel, 2003). En el presente trabajo, la capacidad antioxidante de berenjenas violetas y blancas fue evaluada mediante la determinación de la habilidad de los extractos etanólicos de los frutos para secuestrar los radicales DPPH<sup>•</sup> (**Figura III.3.A**) y ABTS<sup>•+</sup> (**Figura III.3.B**).

Al momento de cosecha, la capacidad antioxidante de las variedades fue similar. Los AOX se acumularon preferentemente en la región central de la pulpa (I), que mostró una actividad antiradical 2 o 3 veces mayor, respecto de la zona externa (E). Luego de 14 d de almacenamiento, no se detectaron cambios en la capacidad AOX de la región periférica, pero un incremento significativo fue observado en la zona interna para ambos genotipos. Al final del período de conservación (30 d) la capacidad AOX decreció de forma notoria en esta zona para las berenjenas violetas, mientras que se mantuvo invariable en los frutos blancos. Trabajos previos han mostrado resultados controversiales en cuanto a los cambios producidos en los AOX de berenjena durante el almacenamiento. Mientras que algunos autores no encontraron

modificaciones en el tiempo (Gajewski y col., 2009), en otros casos una marcada variación fue observada, con incrementos y posterior descenso durante el almacenamiento (Hu y col., 2010). Asimismo, también han sido informados aumentos constantes en el nivel de AOX (Mahmood, 2013). Esto puede estar relacionado a diferencias en las variedades o períodos y condiciones de almacenamiento ensayados.



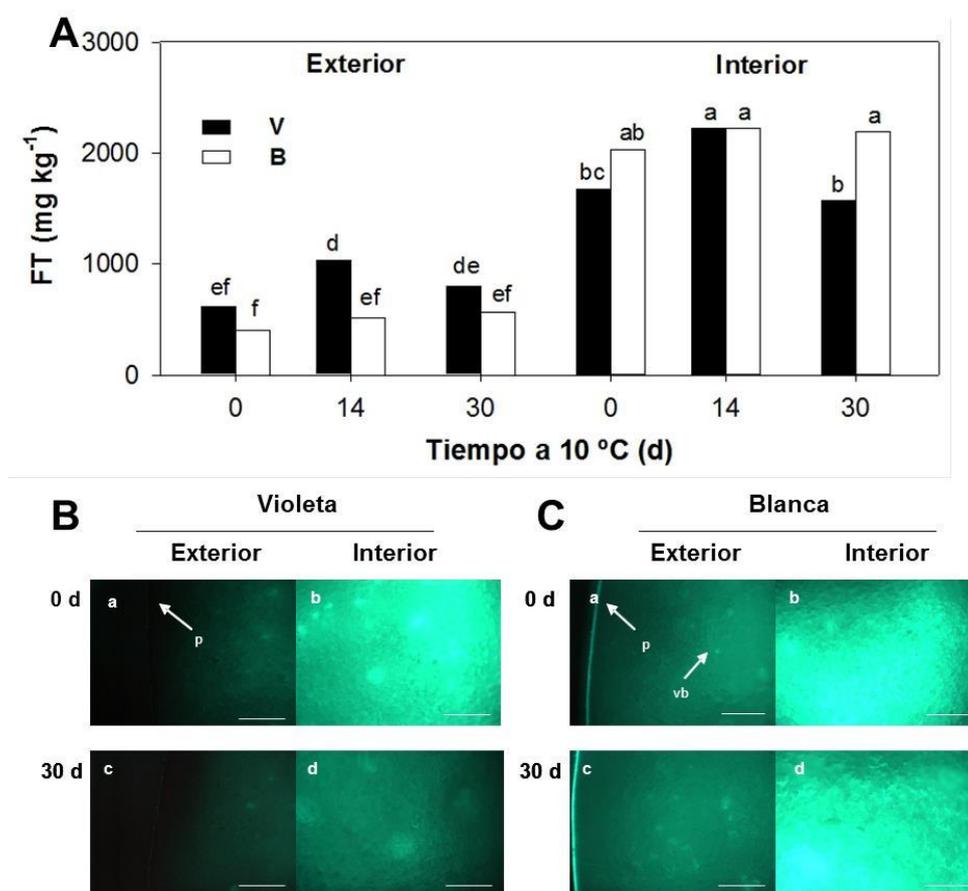
**Figura III.3.** Capacidad antioxidante frente al radical A) DPPH• y B) ABTS•+ en las zonas Exterior e Interior de la pulpa de berenjenas violetas (V) y blancas (B) almacenadas a 10 °C por 0, 14 o 30 d. Valores con letras distintas indican diferencias en un test LSD de Fisher con un nivel de significancia de P < 0,05. EC<sub>50</sub><sup>-1</sup>: Concentración equivalente que disminuye la concentración inicial de DPPH• al 50%; TEAC: Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox.

### III.5. Compuestos fenólicos totales e histolocalización de ácido clorogénico

El análisis del contenido de compuestos fenólicos totales, mostró en general el mismo comportamiento y cambios descriptos para la capacidad antioxidante. Esto confirmaría que son los principales antioxidantes presentes en berenjenas violetas y blancas (Figura III.4.A). Los perfiles de HPLC para ambas variedades mostraron un único pico principal correspondiente a CGA. La determinación espectrofotométrica de fenoles totales mostró, una alta y positiva

correlación ( $r=0,99$ ) con el contenido de CGA analizado por HPLC (datos no mostrados). Así, el ensayo de Folin-Ciocalteu resulta un método de detección rápido para seleccionar variedades de berenjena, en términos de su contenido de AOX fenólicos y CGA en particular.

Para obtener evidencia directa sobre la distribución espacial del CGA en las variedades estudiadas, se llevó a cabo la localización histoquímica del compuesto con el reactivo de Neu (Figura III.4.B).



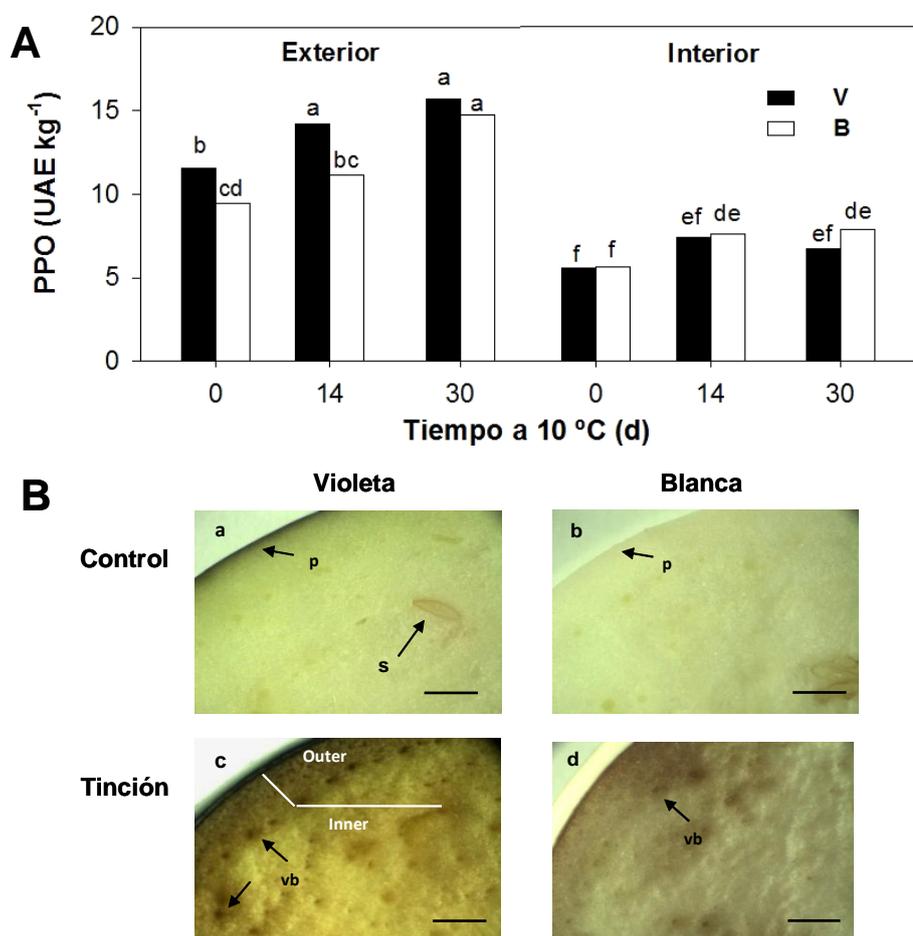
**Figura III.4.A)** Compuestos fenólicos totales (FT) en las zonas Exterior e Interior de la pulpa de berenjenas violetas (V) y blancas (B) almacenadas a 10 °C por 0, 14 o 30 d. Valores con letras distintas indican diferencias en un test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ . **B)** Histolocalización por fluorescencia de ácido clorogénico en las zonas Externa e Interna de berenjenas violetas (a, b, c, d) y **C)** blancas (a, b, c, d) almacenadas a 10 °C por 0 o 30 d. Barra = 2 mm (magnificación 2,5X). p: piel; vb: haz vascular.

Tras excitación con luz UV, el reactivo forma productos fluorescentes de color verde en presencia de ácidos mono y dicafeoil-quínicos, que en este caso indicarían la presencia de CGA. Mientras que la detección de fluorescencia azul sugiere la prevalencia de derivados feruloil-quínicos (Mondolot y col., 2006), que aquí no fueron detectados. La tinción y visualización de rodajas enteras de berenjenas violetas y blancas, confirmaron que al momento de cosecha, el CGA se encontró en menor concentración en la zona E, respecto de la zona I (**Figura III.4B,-a-b y Figura III.4C, a-b**). Así, el análisis de la distribución de CGA a través de la rodaja, permitió observar una mayor intensidad de fluorescencia, con una máxima señal en la región central de la pulpa. La piel mostró también una intensa fluorescencia, lo que la señala como otra región rica en AOX. Por su parte, los haces vasculares (vb) así como las semillas inmaduras (s) fueron sitios específicos de acumulación.

De forma similar a lo hallado en las evaluaciones “*in vitro*”, luego de 30 d de almacenamiento, no se encontraron cambios mayores en la fluorescencia en ambas zonas de la pulpa para berenjenas blancas (**Figura III.4C, c-d**). Mientras que una clara reducción de la intensidad de fluorescencia derivada del contenido de CGA, fue hallada en la zona I de los frutos violetas (**Figura III.4B, c-d**). Tomando en cuenta estos resultados, puede decirse que los compuestos fenólicos y específicamente el CGA, fueron los principales AOX en la pulpa de berenjenas violetas y blancas, y que su biosíntesis resultó muy activa bajo el almacenamiento refrigerado a 10 °C. El aumento de la actividad de la enzima PAL, uno de los sitios de regulación de la vía de fenilpropanoides, informado por Massolo y col. (2011), en berenjenas violetas cv. Lucía almacenadas en refrigeración, está en concordancia con esto. Finalmente, el CGA se distribuye de manera desigual en la pulpa, con una acumulación preferencial en la corteza de semillas y en los tejidos lignificados.

## III.6. Actividad e histolocalización de PPO y POD

A través del análisis *in vitro* se observó que la actividad PPO fue 2 o 3 veces mayor en la zona E de la pulpa para ambas variedades de berenjena (**Figura III.5.A**). La actividad aumentó a través del almacenamiento en berenjenas blancas, mientras que no se apreciaron cambios en la zona I de los frutos violeta. Esto junto con la falta de variación de  $L^*$ , confirmaría que las pérdidas de compuestos fenólicos en la región interna observada anteriormente no habrían sido consecuencia de la actividad PPO y sugiere que el CGA, sustrato de la enzima, en las berenjenas almacenadas se estaría metabolizando por una vía diferente.



**Figura III.5. A)** Actividad polifenoloxidasas (PPO) en zonas Exterior e Interior de berenjenas violetas (V) y blancas (B) almacenadas a 10 °C por 0, 14 o 30 d. Valores con letras distintas indican diferencias en un test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ . **B)** Histolocalización de PPO en berenjenas violetas (a, c) y blancas (b, d) a cosecha, siendo las imágenes superiores aquellas que resultan del control negativo. Barra = 4 mm (magnificación 0,8X.) p: piel; vb: haz vascular; s: semilla.

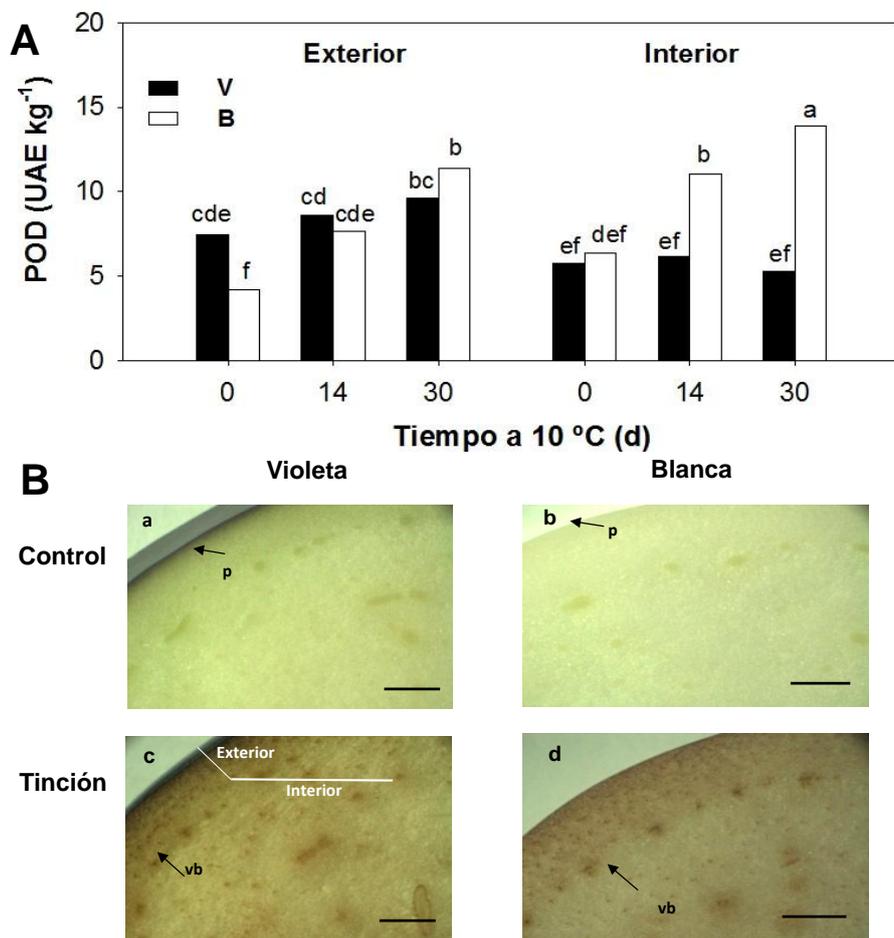
El estudio histoquímico de la enzima, permitió determinar su distribución espacial en las zonas I y E de las rodajas a través del desarrollo de color marrón. Es así que los controles no presentaron coloración, en tanto que en las rodajas sometidas a la tinción se halló un grado intenso de coloración, registrándose mayor actividad en la zona periférica, respecto de la interna (**Figura III.5B, a-b y c-d**, respectivamente). Los principales puntos que mostraron marcada tinción PPO fueron los tejidos vasculares, fibras y cubiertas de semillas.

La enzima POD ha sido asociada con el pardeamiento, pero también está implicada en la polimerización oxidativa de fenoles en presencia de  $H_2O_2$  para la producción de lignina. La actividad de POD (**Figura III.6.A**) y su distribución (**Figura III.6.B**), fue monitoreada a través de la incubación *in vitro* e *in situ* del tejido con guayacol y  $H_2O_2$ , por aparición de productos de color naranja oscuro (**Figura III.6**). La actividad POD se incrementó en ambas zonas, durante el almacenamiento en los frutos blancos, pero permaneció invariable en las berenjenas violetas (**Figura 6.A**). La actividad "*in vitro*" de POD no mostró diferencias entre zonas I y E ( $P > 0,05$ ). Los controles negativos de las evaluaciones histoquímicas no mostraron tinción sin la adición de sustrato específico (**Figura II.6B, a-b**). Sin embargo la aparición de productos de color naranja oscuro luego de la tinción correspondiente, denotó la presencia de POD (**Figura III.6B, c-d**) y al igual que en PPO, se asoció con los tejidos lignificados.

### III.7. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno se produce en las plantas durante el metabolismo normal (Karpinski y col., 1999). Su participación en las células vegetales como molécula señal en las respuestas de defensa y como un co-sustrato en numerosas reacciones metabólicas, incluyendo la polimerización de monolignoles está bien establecida (Neill y col., 2002a, 2002b). Se ha reportado que los niveles de  $H_2O_2$  pueden aumentar durante la senescencia, bajo la infección por patógenos, así como en respuesta a condiciones de estrés poscosecha comunes

como el déficit de agua, la privación de nutrientes o la refrigeración (Rogiers y col., 1998; Desikan y col., 2001).



**Figura III.6. A)** Actividad peroxidasa (POD) en zonas Exterior e Interior de berenjenas violetas (V) y blancas (B) almacenadas a 10 °C por 0, 14 o 30 d. Valores con letras distintas indican diferencias en un test de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ . **B)** Histolocalización de POD en berenjenas violetas (a, c,) y blancas (b, d) a cosecha, siendo las imágenes superiores aquellas que resultan del control negativo. Barra = 4 mm (magnificación 0,8X.) p: piel; vb: haz vascular.

Especies reactivas al  $O_2$ , como el peróxido de hidrógeno, los radicales superóxido e hidroxilo, son también sintetizados durante la lignificación (Moise y col., 2005). En el presente trabajo, los dos tipos de berenjena mostraron altos contenidos de  $H_2O_2$  en la zona I. Como pudo observarse en la **Tabla III.2**, en las berenjenas violetas, su contenido se incrementó durante los primeros 14 d de almacenamiento, mientras que en las blancas se acumuló en la zona E pero se mantuvo sin cambios en la parte central. Luego de un período de

almacenamiento extenso (30 d) la zona interna de los frutos violetas presentó una importante reducción del contenido de fenoles totales y mostro a su vez la más alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabla III.2).

**Tabla III.2.** Peróxido de hidrógeno en las zonas Interna (I) y Externa (E) de la pulpa de berenjenas violetas y blancas almacenadas a 10 °C por 0, 14 o 30 d. Valores con letras distintas indican diferencias en un test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

Variedad y zona		Tiempo a 10 °C (d)		
		0	14	30
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mmol kg <sup>-1</sup> )	Violeta-I	3,33 ef	4,62 b	5,39 a
	Violeta-E	2,90 fg	4,23 bcd	4,15 bcd
	Blanca-I	4,9 bc	4,59 b	3,64 de
	Blanca-E	2,31 g	3,91 cde	4,37 bc

Sobre la base de las mediciones de color de pulpa, PPO, POD y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la disminución en el contenido de CGA en berenjenas violetas almacenadas por largos períodos, no parece estar asociada al pardeamiento enzimático. La marcada pérdida de compuestos fenólicos en este tipo de frutos podría estar entonces asociada con la lignificación de semillas, fibras y haces vasculares. Esto se produciría si restos cafeoil- provenientes del CGA fueran reciclados (vía cafeoil-CoA) y reducidos a monolignoles. En este sentido, trabajos previos han sugerido que el ácido clorogénico puede contribuir a la arquitectura de la pared celular (Schoch y col., 2001; Mondolot y col., 2006). La aplicación exógena de ácido caféico podría canalizarse hacia la ruta de los fenilpropanoides, resultando en un incremento de la formación de monómeros de lignina (Bubna y col., 2011). Apoyando esta hipótesis, se ha observado en plantas de café que marcados aumentos del contenido de CGA coincidieron con un incremento en el nivel de compuestos fenólicos unidos a las paredes celulares (Aerts y Baumann, 1994).

### III. CONCLUSIONES

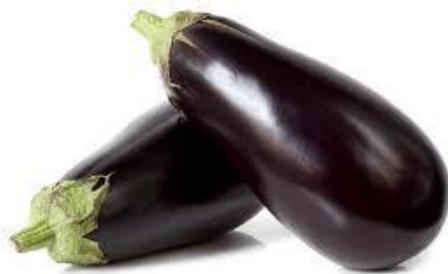
Las berenjenas acumulan ácidos orgánicos preferentemente en la zona más externa de la pulpa, en oposición a los azúcares y particularmente a los AOX que fueron dos a tres veces más abundantes en la zona interna. Las fibras, haces vasculares y adyacencias de semillas fueron especialmente ricas en CGA, el principal tipo de antioxidante en ambas variedades.

Similar capacidad AOX se encontró en los frutos violetas y blancos a la cosecha, y las dos variedades acumularon CGA durante las dos primeras semanas a 10 °C. Sin embargo, las berenjenas de color violeta fueron más susceptibles al deterioro de la calidad y pérdida de peso, mostrando a su vez una drástica reducción de los compuestos fenólicos al final del período de almacenamiento. Por el contrario, las berenjenas blancas se almacenan mejor sobre la base de su calidad visual y estabilidad de AOX.

La disminución de CGA en la pulpa interna de los frutos violetas no se correlacionó con el pardeamiento ( $L^*$ ) o con las actividades *in vitro* de PPO y POD. En cambio, las zonas que evidencian las pérdidas más altas de CGA mostraron mayor acumulación de  $H_2O_2$ . De esta forma, las sustanciales pérdidas de antioxidantes fenólicos en berenjenas enteras en las condiciones de almacenamiento recomendadas (10 °C), se deberían al desarrollo de la cubierta de las semillas y del sistema vascular de los frutos inmaduros y no estarían relacionadas con el pardeamiento de la pulpa.

## **CAPÍTULO IV.**

***“Cambios en los antioxidantes fenólicos de berenjenas violetas y blancas por aplicación de métodos de pre-tratamiento, procesamiento y cocción”.***



#### IV. INTRODUCCIÓN

Las tecnologías de procesamiento han sido utilizadas desde la antigüedad para transformar alimentos en productos estables y seguros. Permiten además el transporte a grandes distancias y con ello la llegada a consumidores en diferentes áreas geográficas y momentos del año (Fellows, 2000). De acuerdo al tipo de procesamiento y a las condiciones en las que este se realiza, pueden ocurrir diversos cambios en la calidad sensorial y nutricional (Nicoli y col., 1999). Para el caso de productos vegetales, el tratamiento genera modificaciones en la textura, color, apariencia, sabor, valor nutricional y contenido de compuestos antioxidantes (de Ancos y col., 2000). Sin embargo, resultaría deseable que los mismos conserven las propiedades respecto a los productos *in natura*. En general se considera que el valor nutricional disminuye durante los procesos de transformación (Chang y col., 2006).

Los vegetales suelen someterse a diferentes métodos de procesamiento y comúnmente se recurre en etapas iniciales a pre-tratamientos como el lavado, pelado y escaldado. Durante estas operaciones cierta pérdida de nutrientes, especialmente los hidrosolubles, podría ocurrir. Tratamientos térmicos de conservación, como el secado, pueden también afectar la calidad de los productos disminuyendo el nivel de compuestos termolábiles por reacciones de oxidación y condensación (Kalt, 2005). El secado por aire caliente es el método de procesamiento más antiguo y ampliamente utilizado, ofreciendo productos que tienen una vida prolongada pero desafortunadamente con una calidad nutricional reducida en general drásticamente en comparación con el producto original (Alonzo-Macías y col., 2013). Operaciones adicionales de cocción pueden ocasionar cambios tanto en la textura como en el valor nutricional (Lin y Chang, 2005; Turkmen y col., 2005). A pesar de esto, algunos estudios sugieren que los cambios podrían ser moderados e incluso en ciertos casos, un incremento del valor nutricional podría ocurrir como consecuencia del procesamiento (Ravichandran y col., 2012, Li y col., 2012).

Las berenjenas son frutos populares y comúnmente utilizados para la preparación de numerosos platos alrededor de todo el mundo (Nisha y col., 2009). A partir de los estudios realizados en los capítulos anteriores se observa que el contenido de los compuestos AOX presentes en los frutos se ve influenciado por numerosos factores, entre ellos la variedad, el estado de madurez y el almacenamiento poscosecha. Asimismo, el procesamiento, y las condiciones en las que éste se lleve a cabo, también afectarían la estabilidad de los ácidos fenólicos (Dewanto y col., 2002; Korus y col., 2002; Ravichandran y col., 2012; Li y col., 2012).

Dado que las berenjenas, en su estado fresco presentan una vida útil limitada, el empleo de métodos de procesamiento permitiría evitar el deterioro y obtener productos factibles de ser utilizados como ingredientes en diferentes tipos de comidas (Doymaz y Göl, 2011). A su vez, las berenjenas son generalmente consumidas cocidas. Ciertos estudios han demostrado que la preparación a nivel doméstico puede resultar en pérdidas significativas en el contenido y la bio-disponibilidad de compuestos antioxidantes (Zhang y Hamazu, 2004; Faller y Fialho, 2009). Sin embargo, algunos trabajos permiten inferir que no siempre la cocción genera el detrimento de las características antioxidantes de los vegetales, sino más bien lo contrario (Pellegrini y col., 2009; Dewanto y col., 2002; Ferracane y col., 2008).

Si bien se han realizado estudios en numerosos productos analizando los cambios que ocurren en el valor nutricional y calidad de los productos fruti-hortícolas en respuesta a diferentes condiciones de procesamiento, es claro que las respuestas provocadas son dependientes del tipo de producto y no es posible generalizar. En relación puede decirse que, la información hallada en cuanto a la aplicación de diferentes métodos de procesamiento o cocción en berenjena, es dispersa y en general se encuentra evaluada formando parte de un estudio que abarca diversos vegetales o teniendo en cuenta una sola variedad.

Cabe destacar que la variación en las pérdidas de nutrientes entre variedades puede superar las diferencias causadas por los métodos alternativos de procesamiento (Fellows, 2000). De todos, prácticamente no existen estudios en los que se analice como la variedad afecta la retención de antioxidantes en respuesta a diferentes métodos de procesamiento o cocción en berenjena. En ese sentido en el presente Capítulo se decidió estudiar los cambios y el grado de retención de antioxidantes en berenjenas violetas y blancas luego de la aplicación de pretratamientos (trozado, escaldado, salado), en respuesta a diferentes estrategias de procesamiento (congelación, deshidratación, liofilización) y métodos de cocción (hervido, grillado, cocción en microondas, horneado).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.1. Material vegetal y obtención de las muestras

Berenjenas violetas y blancas (*Solanum melongena* L.) cv. Lucía y Cloud Nine, respectivamente, producidas en invernadero de la ciudad de La Plata (Argentina), fueron cosechadas en madurez comercial (estado IV). Seguidamente se trasladaron al laboratorio, se eliminaron los frutos defectuosos o dañados y se seleccionaron teniendo en cuenta la homogeneidad de tamaño. A continuación, los frutos se lavaron por inmersión durante 3 min en agua con hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$  100 mg L<sup>-1</sup>, pH 6,5) y se dejaron secar al aire. Las muestras se dividieron en grupos de 20-25 frutos para cada variedad. Cada fruto se cortó en forma de rodajas de 0,8 cm de espesor, distribuidas al azar para formar grupos homogéneos de 12 unidades en cada tratamiento. Berenjenas frescas se emplearon como control (C) en cada experimento. Inmediatamente después de aplicados los tratamientos, el material se congeló en N<sub>2</sub> líquido y se conservó a -80 °C hasta su análisis. Los tratamientos se realizaron por triplicado en tres días consecutivos. Al inicio y luego de cada tratamiento, se determinó el porcentaje de materia seca y se prepararon los extractos etanólicos para el estudio de la capacidad antioxidante (TEAC) y el contenido de ácido clorogénico (CGA).

### IV.2. Condiciones de los pre-tratamientos

#### IV.2.1. Trozado a temperatura ambiente (Ta)

A fin de evaluar el efecto de un retraso durante el procesamiento de los frutos de berenjena sobre la retención de los antioxidantes, las muestras trozadas en forma de rodajas se mantuvieron expuestas al aire a temperatura ambiente durante 60 min (**Tabla IV.1**).

#### **IV.2.2. Escaldado en agua (Ea)**

Las rodajas se ubicaron en una olla de 28,5 cm de diámetro y se sumergieron completamente en 2,5 L de agua destilada hirviendo (relación fruto-agua 1:10) por 1,5 min (**Tabla IV.1**). Inmediatamente después se escurrieron y se enfriaron con hielo colocando las rodajas sobre una lámina de papel aluminio, a fin de evitar el contacto directo con el hielo. Este paso permite bajar rápidamente la temperatura del tejido y evitar que el efecto del calor se prolongue más allá del tiempo efectivo de aplicación del tratamiento térmico. El punto final de escaldado y tiempo de tratamiento se determinaron previamente a través de la prueba de catecol. Para ello una porción de fruto tratado se puso en contacto con una solución de 4-metilcatecol (4-MC) durante 15 min. Un resultado negativo de esta prueba, es decir que no se observe desarrollo del color pardo, denota que la enzima PPO se halla inactiva (Flurkey, 1986). El correspondiente control positivo se realizó con fruto no tratado.

#### **IV.2.3. Salado y lavado (Sa)**

Las rodajas de berenjena se dispusieron en bandejas y se ubicaron en una cama de sal (300 g de NaCl) durante 90 min (**Tabla IV.1**), atendiendo a que la superficie en ambas caras se encuentre totalmente cubierta. Cumplido este tiempo se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de sal, se escurrieron y secaron con papel absorbente.

### **IV.3. Métodos de cocción**

#### **IV.3.1. Microondas (Mi)**

Se utilizó un horno de microondas doméstico (Whirpool Jet Stream. Crisp. JT 359). Las rodajas de berenjena se dispusieron en forma circular sobre el plato giratorio para lograr una cocción pareja y se taparon con film PVC a fin de mantener su forma y evitar la pérdida de humedad. El tratamiento se realizó a una potencia de 350 W y 175 °C durante 10 min (**Tabla**

**IV.1).**Inmediatamente después las rodajas se enfriaron con hielo según se detallara en la **Sección IV.2.2.**

#### **IV.3.2. Horneado (H)**

Las rodajas de berenjena se ubicaron en una placa de metal y se cocinaron en un horno eléctrico a una temperatura de 140 °C durante 40 min (**Tabla IV.1**).Para lograr una cocción total y pareja las rodajas se giraron cada 10 min. Finalizada la cocción se enfriaron con hielo según se detallara en la **Sección IV.2.2.**

#### **IV.3.3. Grillado (G)**

La cocción se realizó en una plancha de hierro de uso doméstico, sometida a llama directa hasta alcanzar y mantener una temperatura de 175 °C sobre la superficie. En ella se dispusieron las rodajas de berenjena y previamente para evitar la adhesión de las muestras se adicionó una capa de rocío vegetal. El tratamiento de cocción se extendió por 14 min (**Tabla IV.1**), girando las muestras a la mitad del tiempo para lograr una cocción pareja en ambas caras. Inmediatamente después se enfriaron con hielo según se detallara en la **Sección IV.2.2.**

#### **IV.3.4. Cocción al vapor (V)**

Se empleó una vaporiera eléctrica de uso doméstico. Previo al tratamiento se dejó equilibrar la producción de vapor por 5 min. Las rodajas de berenjena se ubicaron en forma de monocapa dentro de la bandeja contenedora para lograr un contacto homogéneo de todas con el vapor. El tiempo de tratamiento seleccionado fue de 10 min (**Tabla IV.1**), enfriando posteriormente con hielo según se detallara en la **Sección IV.2.2.**

#### **IV.3.5. Cocción a presión (P)**

Se empleó una olla a presión de 20 cm de diámetro conteniendo 2,5 L de agua hirviendo (relación fruto agua 1:10). Se sumergieron las rodajas de berenjena contenidas en una canasta de plástico y se cocinaron por 2 min (**Tabla IV.1**). Finalizado el tratamiento se escurrieron para

eliminar el exceso de agua e inmediatamente después se enfriaron con hielo según se detallara en la **Sección IV.2.2**.

#### **IV.3.6. Hervido (B = Boiled)**

Las rodajas de berenjena se ubicaron en una olla de 28,5 cm de diámetro conteniendo 2,5 L de agua hirviendo (relación fruto-agua 1:10) y se cocinaron por 8 min, prestando especial atención a que se encuentren totalmente sumergidas durante todo el tratamiento (**Tabla IV.1**). Finalmente se escurrieron y enfriaron con hielo según se detallara en la **Sección IV.2.2**.

### **IV.4. Métodos de procesamiento**

#### **IV.4.1. Secado en túnel de aire (T)**

El sistema de secado empleado consistió en un túnel de aire por convección, con control de temperatura y velocidad de aire. El equipo está provisto de bandejas de 20 x 20 cm, en las que se colocan las muestras, y de un sistema de pesada *in situ* que evita perturbar el secado, puesto que permite registrar el peso del producto sin retirarlo del equipo. Los experimentos se llevaron a cabo a una velocidad de aire de  $2,5 \text{ m s}^{-1}$  y a dos temperaturas diferentes: 50 o 70 °C (tratamientos denominados T50 y T70, respectivamente). El secado de las rodajas se siguió por medición de la pérdida de peso de las muestras cada 60 min. El proceso se dio por finalizado cuando el contenido de humedad disminuyó a un 10% respecto del valor inicial de acuerdo a Doymaz y col (2011). El proceso demoró 6 y 4,5 h para los tratamientos T 50 y T 70, respectivamente (**Tabla IV.1**).

#### **IV.4.2. Secado en estufa de vacío (Va)**

Se utilizó una estufa de vacío (Marca Arcano, China) con control digital de temperatura, conectada a una bomba de vacío de diafragma PC 511NT (Vacuubrand, Wertheim, Alemania). El secado se realizó a 70 °C y presión de 5 kPa. La evolución del secado de las muestras de

berenjena se siguió a través de la pérdida de peso, registrada cada 60 min. Las condiciones fueron aplicadas hasta que el contenido de humedad disminuyó al 10% respecto del valor inicial, alcanzando este valor luego de 7 h de tratamiento (**Tabla IV.1**).

#### **IV.4.3. Secado solar (So)**

Para la deshidratación solar se empleó un equipo tipo cajón, el cual funciona como caja negra y consiste en una caja de 60 cm de largo x 40 cm de ancho y 15 cm de espesor, de chapa galvanizada y pintada con pintura en aerosol de color negro. Posee una puerta frontal por donde se introduce el producto a deshidratar y se coloca sobre una rejilla metálica, que permite circular el aire entre las caras del producto. La caja negra esta revestida con vidrio para lograr la retención de la radiación infrarroja (efecto invernadero) debido a que es un material transparente a la radiación solar de alta energía y onda corta pero casi opaco a las radiaciones infrarrojas de onda larga emitidas por la superficie del absorbedor. El equipo fue diseñado, construido y colocado en la ciudad de La Plata cuyas coordenadas geográficas son: latitud 34° 50' y 35° 30' S y longitud 57° 45' y 58° 20' O a 9.87 m sobre el nivel del mar, se orientó hacia el norte y se lo expuso a la luz solar. De esta forma el aire caliente que rodea al producto proporciona la energía necesaria para realizar el secado. Las rodajas de berenjena se dispusieron dentro del equipo y se mantuvieron por un lapso de 16 h efectivas de sol, distribuidas en dos días (**Tabla IV.1**). En los intervalos de oscuridad, las muestras se retiraron y almacenaron en desecador hasta la siguiente jornada. El punto final de secado se determinó por seguimiento de la pérdida de peso cada 60 min, hasta que el contenido de humedad alcanzó un 10% del valor inicial. A fin de registrar la variación de la temperatura se conectaron durante el tratamiento termocuplas (tipo T) en las muestras y en el interior de la cámara de secado acopladas a un adquisidor (Datalogger Testo 175/T3, Alemania).

#### **IV.4.4. Liofilizado (L)**

Las rodajas de berenjena se congelaron y se mantuvieron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para luego ser liofilizadas en un equipo HETO DF4 (Bélgica) acoplado a una bomba de vacío tipo rotativa a paletas (RZ 6;  $5,7\text{ m}^3\text{ h}^{-1}$  y  $2\cdot 10^{-3}\text{ mbar}$ ). El material fue liofilizado durante 48 h (**Tabla IV.1**), considerando el final del proceso cuando el contenido de humedad alcanzó un 10% del valor inicial.

#### **IV.4.5. Congelado lento (Cl)**

Para el congelado de las muestras se empleó un freezer comercial de uso doméstico. Las rodajas de berenjena se dispusieron en bandejas de plástico y se registró la evolución de la temperatura a través del tiempo con termocuplas (tipo T) ubicadas en el interior de la rodaja y conectadas a un adquisidor (Testo 175/T3, Alemania). El tratamiento se realizó hasta que el producto alcanzó una temperatura interna de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , lo que demoró un período de 3 h (**Tabla IV.1**).

#### **IV.4.6. Congelado rápido (Cr)**

Se empleó un equipo de congelación por placas. El tratamiento se extendió hasta que se alcanzó en el interior de la rodaja una temperatura final de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , por contacto directo del fruto con el medio refrigerante durante un lapso de 1,5 h (**Tabla IV.1**). La evolución de la temperatura a través del tiempo se monitoreó con termocuplas (tipo T) dispuestas en el interior de la rodaja y conectadas a un adquisidor (Testo 175/T3, Alemania).

### **IV.5. Determinaciones analíticas**

#### **IV.5.1. Materia seca**

Una porción de rodaja de berenjena de aproximadamente 3 g se ubicó en un molde de papel y se secó en estufa de vacío a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 2,5 kPa hasta peso constante (48 h). El contenido

de materia seca (MS) fue determinado por diferencia de peso según se detalla en la **Sección I.3.2**. Los resultados se expresaron en porcentaje de peso fresco y las determinaciones se realizaron por sextuplicado para cada variedad y tipo de tratamiento, en tres ensayos independientes.

#### **IV.5.2. Extracción de antioxidantes**

Aproximadamente 1 g del material pelado y congelado en N<sub>2</sub>, se pulverizó en molinillo (Peabody PE-MC9103, Bs. As., Argentina), se pesó y agregó a un tubo conteniendo 5 mL de etanol. A continuación se agitó durante 30 min y posteriormente se centrifugó a 14.000 × g por 10 min a 4 °C. Se separó el sobrenadante y el pellet se re-extrajo con 5 mL de etanol, finalmente se centrifugó en las condiciones mencionadas durante 5 min. Los sobrenadantes fueron homogeneizados. Los extractos así obtenidos se concentraron a 40 °C en un evaporador rotatorio (Büchi R-124, Labortechnik AG, Flawil, Suiza) y finalmente el residuo obtenido fue resuspendido en 2 mL de una mezcla agua-metanol (90:10), la muestra se repartió en tubos Eppendorf y se conservó a -80 °C hasta el análisis de antioxidantes. Se prepararon tres extractos para cada variedad y tipo de tratamiento.

#### **IV.5.3. Capacidad antioxidante**

Los extractos etanólicos de berenjenas crudas y tratadas, preparados como se describe en la **Sección IV.5.2**, se emplearon para medir la capacidad antioxidante de las muestras con el radical estable ABTS<sup>•+</sup>, según la metodología descrita por Arnao y col. (2001) y que se detallara en la **Sección I.3.12**. Se utilizó Trolox<sup>®</sup> como patrón y los resultados se expresaron como Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) respecto del tejido en base seca (mg kg<sup>-1</sup> MS). Las medidas se realizaron por triplicado.

#### **IV.5.4. Contenido de ácido clorogénico**

Antes del análisis por HPLC-DAD los extractos preparados como se describe en la **Sección IV.5.2**, fueron filtrados a través de un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  (Osmonics Inc., Minnesota, USA). El análisis cromatográfico del contenido de CGA se realizó según se detalla en la **Sección I.3.14**. El CGA presente en los extractos de berenjenas se cuantificó mediante el método de estándar externo con patrón estándar. Los resultados se expresaron  $\text{mg kg}^{-1}$  MS y las muestras se analizaron por triplicado.

#### **IV.6. Análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron de acuerdo a un diseño factorial, siendo los factores la variedad (berenjenas blancas y violetas) y el tipo de tratamiento aplicado. Los resultados se sometieron a un análisis por ANOVA y las medias se compararon mediante el test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ .

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1. Resumen de las diferentes condiciones de procesamiento

En la **Tabla IV.1** se indican a modo de resumen, las condiciones de tiempo y temperatura seleccionadas para cada método de pre-tratamiento, cocción o procesamiento.

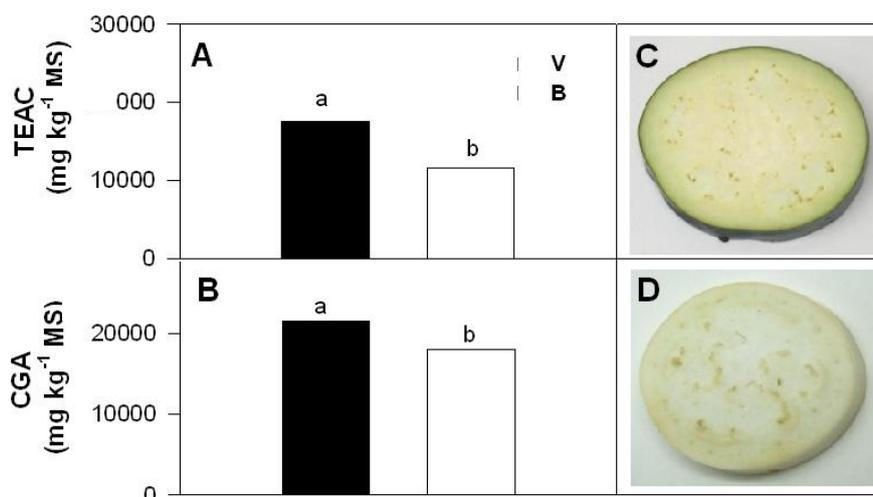
Estas fueron optimizadas a partir de experimentos preliminares.

**Tabla IV.1.** Combinaciones de tiempo (*t*) y temperatura (*T*) seleccionadas para los diferentes tratamientos aplicados en rodajas de berenjenas violetas y blancas.

	TIPO DE PROCESAMIENTO							
	PRE-TRATAMIENTO		COCCIÓN		PROCESAMIENTO			
	t (min)	T (°C)		t (min)	T (°C)	t (h)	T (°C)	
Trozado (Ta)	60	20	Microondas (Mi)	10	175	Secado (T70)	4,5	70
Escaldado (Ea)	1,5	100	Horneado (H)	40	140	Secado (T50)	6	50
Salado (Sa)	90	20	Grillado (G)	14	175	Secado vacío (Va)	4	70
-	-	-	Vapor (V)	10	100	Secado solar (So)	16-20	40
-	-	-	Presión (P)	2	121	Liofilizado (L)	48	- 80
-	-	-	Hervido (B)	8	100	Cong. Lento (Cr)	3	- 20
-	-	-	-	-	-	Cong. Rápido (Cl)	1,5	- 20

### IV.2. Contenido de antioxidantes y apariencia de muestras control

En la **Figura IV.1** se presenta el nivel de antioxidantes inicial en la pulpa de los dos tipos de berenjenas estudiadas. Las muestras crudas, empleadas como control presentaron diferencias entre sí, con una mayor capacidad antioxidante y contenido de ácido clorogénico en el tipo violeta (**Figura IV.1. A y B**). La apariencia característica de ambos frutos se observa en la **Figura IV.1.C y D**. A continuación, se analizó la respuesta de las variedades, en términos de grado de retención de AOX como consecuencia de la aplicación de diferentes métodos de pre-tratamiento, procesamiento y cocción.

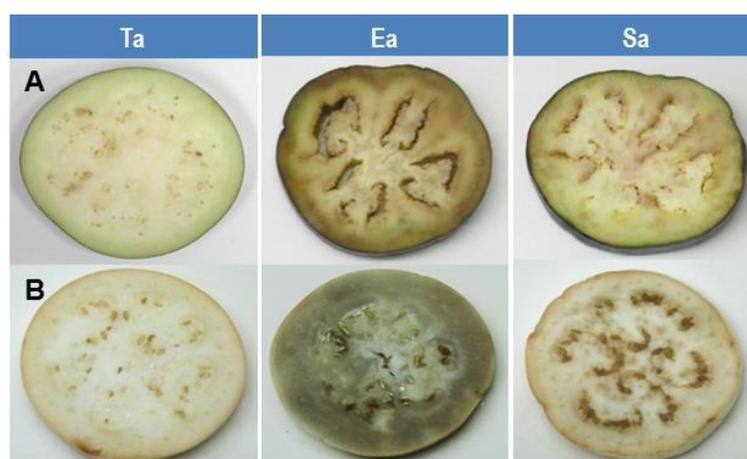


**Figura IV.1.** **A)** Capacidad antioxidante (TEAC), **B)** contenido de ácido clorogénico (CGA), apariencia inicial de **C)** berenjenas violetas y **D)** blancas. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo a un test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

### IV.3. PRE-TRATAMIENTOS

#### IV.3.1. Apariencia de rodajas de berenjenas sometidas a pre-tratamientos

En la **Figura IV.2** se observa la apariencia de las rodajas de berenjena de ambas variedades luego de la aplicación de los pre-tratamientos.



**Figura IV.2.** Apariencia de rodajas de berenjenas **A)** violetas y **B)** blancas, sometidas a diferentes pre-tratamientos. Ta= Trozado y expuesto al aire por 60 min, Ea= Escaldado en agua.; Sa=Salado.

Puede notarse para ambas variedades, cierto grado de pardeamiento en las muestras trozadas (Ta) luego de un período de exposición al aire, un cambio importante en la textura y el color de las que fueron escaldadas (Ea) y avanzada deshidratación en las rodajas sometidas a salado (Sa).

#### **IV.3.2. Retención de antioxidantes**

El pardeamiento enzimático es uno de los principales problemas en el procesamiento de berenjena (Oms-Oliu y col., 2010). En general el contenido de compuestos fenólicos de estos frutos se correlaciona con el grado de pardeamiento (Prohens y col., 2007) y se ha observado que la extensión del fenómeno es función de la variedad (Mishra y col., 2013). Cuando las berenjenas se cortan se genera una disrupción celular, con pérdida de compartimentación que permite el contacto entre las enzimas responsables del pardeamiento, como la polifenoloxidasas (PPO) y los sustratos fenólicos (Concellón y col., 2007; Mishra y col., 2013). En este sentido, las diferencias en la integridad de tejido parecen ser determinantes del nivel de pardeamiento, incluso en mayor medida que la actividad particular de las enzimas involucradas y el contenido de CGA, como se observó en el Capítulo II. El fenómeno comienza inmediatamente después del corte y aumenta con el tiempo de exposición al aire (Mishra y col., 2013). De esta forma, los retrasos en el procesamiento del producto durante su preparación industrial o doméstica podrían generar el desarrollo de pardeamiento y afectar el contenido y capacidad AOX en berenjenas.

De acuerdo a esto se evaluó el grado de retención de AOX, en las muestras trozadas en forma de rodajas, luego de mantenerlas expuestas al aire a temperatura ambiente por 60 min. El corte o trozado junto a un retraso en el procesamiento provocó una pérdida cercana al 25% de AOX (**Tabla IV.2**). De aquí la importancia de minimizar esperas durante la manipulación de los frutos cortados. En el caso de las berenjenas blancas, esta disminución se detectó para

TEAC, mientras que no se produjeron modificaciones en el contenido de CGA (**Tabla IV.2**). Esto sugeriría que, en estas condiciones y para esta variedad, se degradan en forma inicial preferencialmente otros AOX.

**Tabla IV.2.** Retención porcentual (%) de la capacidad antioxidante (TEAC) y el contenido de ácido clorogénico (CGA) en berenjenas violetas (V) y blancas (B), sometidas a diferentes tipos de pre-tratamientos. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

TRATAMIENTO	RETENCIÓN TEAC (%)		RETENCIÓN CGA (%)	
	V	B	V	B
<b>Control (C)</b>	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
<b>Trozado (Ta)</b>	79,8 b	74,9 b	74,2 c	97,4 ab
<b>Escaldado (Ea)</b>	80,3 b	100,4 a	49,7 d	81,9 bc
<b>Salado (Sa)</b>	51,3 c	97,3 a	49,8 d	87,3 abc
<b>LSD</b>	<b>13,02</b>		<b>17,65</b>	

El escaldado es uno de los métodos de pretratamiento más comunes y tradicionalmente empleados para controlar el pardeamiento en productos vegetales por inactivación térmica de las enzimas responsables (Fernández-Fraguas, 2008). En relación a ello se decidió evaluar su efecto sobre la estabilidad de los AOX de berenjena. En contraposición con lo que se esperaría, el pre-tratamiento resultó en pérdidas significativas de CGA. En las berenjenas violetas, las pérdidas fueron mayores, llegando al 50%, mientras que se ubicaron en 20% para berenjenas blancas (**Tabla IV.2**). Llamativamente, en ambos genotipos la disminución del CGA fue menor que la pérdida de capacidad AOX. La leve variación en TEAC podría explicarse por la liberación de otros metabolitos con actividad que pudieran estar previamente insolubles en frutos sin tratamiento térmico (Pellegrini y col., 2009). A su vez, la hidrólisis del CGA durante el escaldado, liberaría ácido cafeico que aún posee capacidad antioxidante (Miglio y col., 2008; Niggeweg y col., 2004).

Un pre-tratamiento que se realiza normalmente como paso previo a la cocción doméstica de las berenjenas es el salado. Su finalidad es eliminar compuestos como la solasonina y solamargina, los glicoalcaloides mayoritarios presentes en berenjena y que se consideran los responsables del sabor amargo (Blankemeyer y col., 1998; Tiwari y col, 2011). Sin embargo, la influencia de este procedimiento sobre el contenido de los compuestos AOX aún no había sido estudiada. De acuerdo a los resultados obtenidos, el salado provocó una marcada reducción de TEAC y del contenido de CGA en berenjenas violetas, ascendiendo al 50% (**Tabla IV.2**). La variación fue similar para ambas determinaciones realizadas lo que indica que el principal AOX que difunde durante los procesos de exudación y lavado sería el CGA. Para el tipo blanca, en concordancia con los anteriores pre-tratamientos, tampoco ocurrieron pérdidas significativas (**Tabla IV.2**).

En síntesis pudo observarse que los pre-tratamientos provocaron pérdidas importantes de capacidad y contenido de AOX, que en ciertos genotipos pueden ser significativas, como para el caso de las berenjenas violetas. De esta forma las diferencias fueron más importantes entre variedades que entre tratamientos, observándose una mayor estabilidad en las berenjenas blancas. Si bien muchos estudios se han realizado focalizando la atención en los efectos de diferentes procesos, estos se limitan a un solo genotipo. En este sentido cabe resaltar, el rol central y marcado efecto de la matriz vegetal en el grado de retención de AOX y respuesta a los pre-tratamientos.

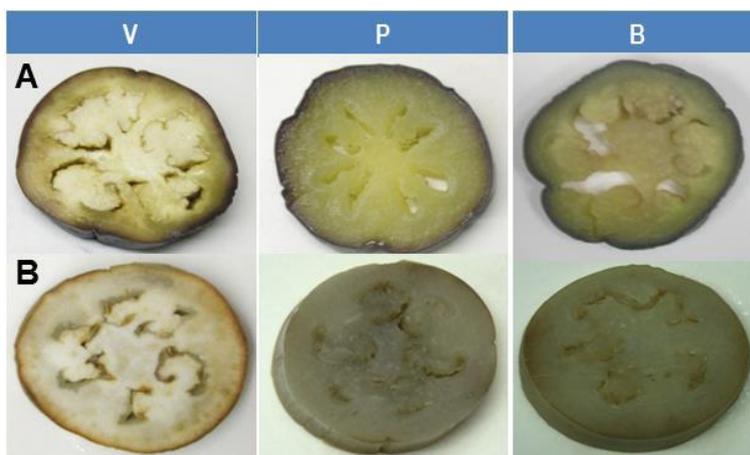
#### **IV.4. MÉTODOS DE COCCIÓN**

##### **IV.4.1. Apariencia de rodajas de berenjenas sometidas a cocción**

En general, los vegetales son preparados de diferentes maneras antes de su consumo. A pesar de que la mayoría de los estudios se realizan sobre el material crudo, analizar su composición luego de la cocción es relevante por propósitos nutricionales y sensoriales, ya que

estos procesos provocan una serie de cambios en las características físicas y químicas del producto (Ferracane y col., 2008). De acuerdo a esto, se estudió la respuesta de las rodajas de berenjenas, en términos de estabilidad de los compuestos antioxidantes, a seis métodos de cocción en medios húmedos o secos.

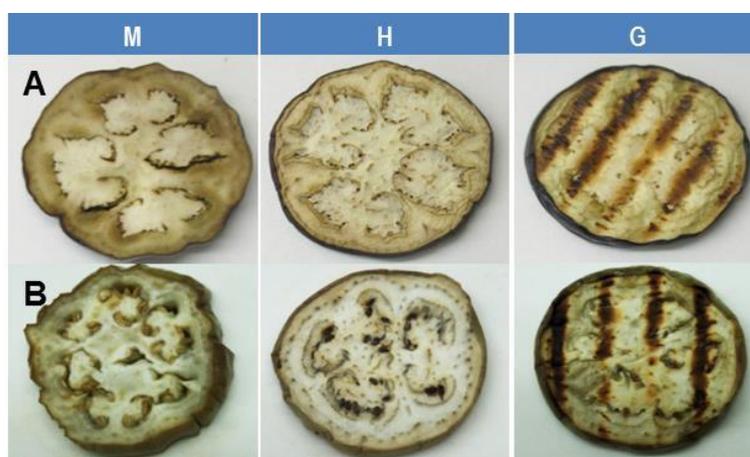
Se evidenció que las diferencias más marcadas debido a la cocción se dieron en la textura de los frutos. Los métodos que implicaron cocción húmeda generaron un colapso más marcado de los tejidos (**Figura IV.3**), respecto de los tratamientos secos como el grillado y horneado. Una posición intermedia fue ocupada por las rodajas cocidas en microondas (**Figura IV.4**).



**Figura IV.3.** Apariencia de rodajas de berenjenas **A)** violetas y **B)** blancas, sometidas a métodos de cocción húmedos. V= Vapor, P=Presión; B=Boiled (Hervido).

Estas diferencias conducirían a cambios en la bio-disponibilidad de los compuestos AOX de las berenjenas, así un mayor deterioro de la matriz del vegetal ante la cocción en agua, podría resultar en una extracción más eficiente de los compuestos activos libres y a la liberación de aquellos unidos a estructuras celulares. Por el contrario, el grillado u horneado determinan una alta temperatura en la superficie de las rodajas, que podría inducir la degradación de compuestos fenólicos por reacciones de condensación o la formación de

nuevos compuestos, con diferentes propiedades antioxidantes como es el caso de ciertos productos de la reacción de Maillard (Lo Scalzo y col., 2010).



**Figura IV.4.** Apariencia de rodajas de berenjenas **A)** violetas y **B)** blancas, sometidas a métodos de cocción secos. Mi= Microondas, H=Horneado; G= Grillado.

#### IV.4.2. Retención de antioxidantes

Como se mencionó anteriormente, la cocción induce cambios significativos en la composición química de las hortalizas, influyendo en la concentración y bio-disponibilidad de los compuestos bioactivos. Como se observa en la **Tabla IV.3**, si bien los niveles de TEAC y CGA presentes en berenjena en algunos tratamientos se mantuvieron sin cambios o disminuyeron, en la mayoría de los casos se incrementaron. La respuesta a su vez, difirió según la variedad de que se trate, en general las berenjenas blancas mostraron mejores niveles de retención y acumulación de antioxidantes que los frutos violetas luego de la cocción.

Para el tipo violeta, un importante incremento de TEAC y CGA se observó cuando los frutos fueron cocidos mediante vapor. Por su parte los tratamientos de hervido, grillado y cocción a presión en general aumentaron los niveles de AOX. En la cocción en microondas, los cambios fueron menores, mientras que el horneado redujo la capacidad antioxidante y el contenido de CGA de los extractos (**Tabla IV.3**). En berenjenas blancas la cocción a presión fue el método que produjo la mayor acumulación de AOX, seguido por la cocción a vapor y los

tratamientos hervido, grillado y microondas que no mostraron diferencias significativas entre sí. Por su parte el horneado fue el único tratamiento que provocó cierta reducción de la capacidad AOX y del contenido de CGA (**Tabla IV.3**). El detrimento de la calidad en ambos genotipos provocado por el horneado de las rodajas podría deberse a las drásticas condiciones empleadas, que incluyeron una alta temperatura de tratamiento y un extenso tiempo de exposición, necesarios para lograr la completa cocción del producto.

**Tabla IV.3.** Retención porcentual (%) de la capacidad antioxidante (TEAC) y el contenido de ácido clorogénico (CGA) en berenjenas violetas (V) y blancas (B), sometidas a diferentes tipos de cocción. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

TRATAMIENTO	RETENCIÓN TEAC (%)		RETENCIÓN CGA (%)	
	V	B	V	B
<b>Control (C)</b>	100,0 e	100,0 e	100,0 fg	100,0 fg
<b>Microondas (M)</b>	93,8 e	129,0 bc	86,0 h	113,9 de
<b>Horneado (H)</b>	73,0 f	70,5 f	57,8 j	68,2 j
<b>Grillado (G)</b>	122,4 cd	136,6 bc	97,8 g	109,1 ef
<b>Vapor (V)</b>	180,3 a	143,5 b	130,8 b	126,3 bc
<b>Presión (P)</b>	108,9 de	174,3 a	120,0 cd	145,0 a
<b>Hervido (B)</b>	127,0 bcd	139,0 bc	83,2 h	111,6 de
<b>LSD</b>	<b>20,86</b>		<b>11,13</b>	

Estudios realizados en diversos vegetales después de la cocción mostraron que el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante podrían ser mayores o menores en comparación con los alimentos frescos (Zhang y Hamauzu, 2004; Sahlin y col., 2004; Lin y Chang 2005; Turkmen y col., 2006; Ferraccane y col., 2008; Faller y Fialho., 2009; Ismail y col., 2004). La distinta respuesta podría deberse a las diferencias en las condiciones de los procesos, como a las características de cada especie en particular (Miglio y col., 2008).

En concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo, Ferracane y col. (2008) hallaron un incremento de la capacidad AOX y de CGA luego de la cocción de alcauciles,

producto en el cual el CGA también es el principal compuesto fenólico. En el mismo sentido, se ha reportado que los frutos de berenjenas sometidos a tratamientos térmicos por medio de diversas técnicas, conservan o aumentan su capacidad antioxidante y los hacen en mayor medida que una amplia gama de otros productos vegetales (Jiménez-Monreal y col., 2009). Kalogeropoulos y col., (2007) hallaron un incremento de CGA en el tejido de berenjenas luego del fritado. A su vez, Lo Scalzo y col. (2010), observaron un considerable incremento en el contenido de CGA y la capacidad AOX de muestras de berenjenas grilladas y hervidas, sugiriendo que la extractabilidad de este compuesto se incrementa con los tratamientos de cocción. Asimismo, Das y col. (2011) mostraron que la berenjena grillada seguía manteniendo efectos cardioprotectores al ensayarlo en ratas, gracias a que conserva y hasta incrementa el contenido los principales compuestos fenólicos luego de este tipo de cocción.

Según Lo Scalzo y col. (2010), la estructura del tejido de estos frutos es especialmente protectora del CGA. En nuestro estudio, pudo observarse además que el grado de estabilidad de los AOX, es dependiente de la variedad que se analice. Si bien las berenjenas blancas mostraron un menor contenido inicial de AOX en el material fresco, los significativos cambios producidos durante la cocción permitirían considerarlas una interesante opción para los consumidores, ante un mayor nivel de AOX del producto que finalmente será consumido.

Los incrementos en el contenido de CGA y TEAC generados durante la cocción de las berenjenas podrían deberse a la liberación de compuestos fenólicos unidos a las paredes celulares o bien la síntesis de otros compuestos con propiedades antioxidantes (ej. productos de la reacción de Maillard). Aunque un mayor contacto con enzimas oxidativas como PPO, por disrupción celular también podría ocurrir, la alta temperatura empleada provocaría en cierto grado su desactivación. Esto evitaría la pérdida de ácidos fenólicos, definiendo en la suma de efectos un aumento de la capacidad AOX (Chang y col., 2006; Lo Scalzo y col., 2010). Asimismo, la acción de la cocción sobre la textura de los vegetales y un aumento en la extracción de

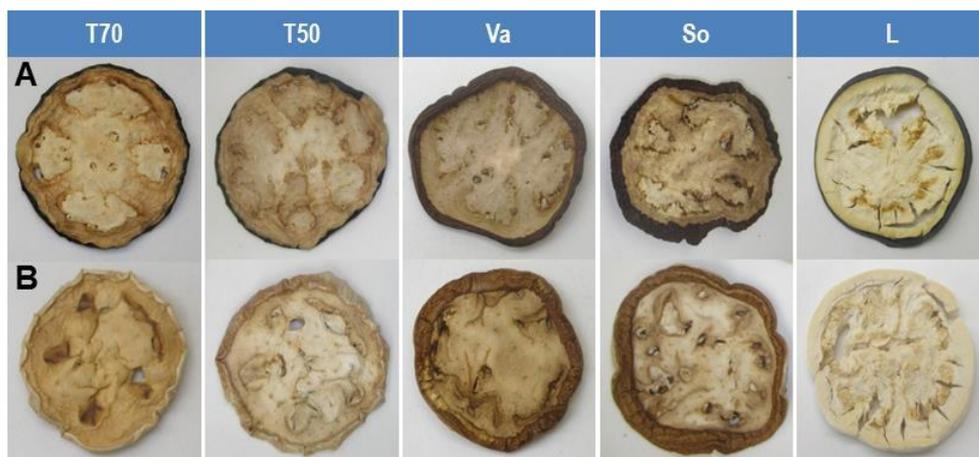
antioxidantes del grupo de los carotenoides ha sido informada por otros autores (Rodríguez-Amaya., 1997).

Finalmente, la acumulación de antioxidantes observada difiere del concepto de que los vegetales cocidos poseen menor calidad nutricional que los crudos. En este sentido, cabe señalar que las determinaciones *in vitro* de AOX presentan limitaciones en cuanto a la información que brindan respecto de la bio-disponibilidad y el aprovechamiento de los efectos beneficiosos para la salud aportados por este tipo de compuestos a través de la dieta, por lo tanto resultaría necesario avanzar en el estudio de su metabolismo luego de la ingesta (Das y col., 2011).

#### IV.5. MÉTODOS DE PROCESAMIENTO

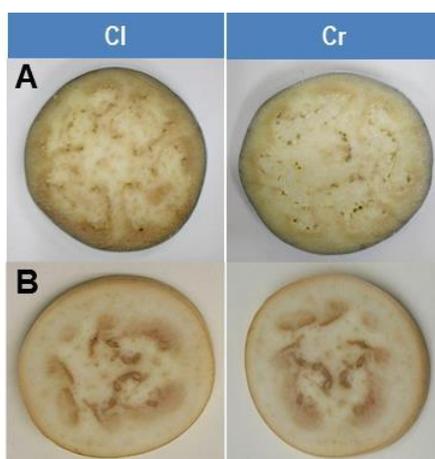
##### IV.5.1. Apariencia de rodajas de berenjenas sometidas a procesamientos

En una última etapa de estudio se evaluó la apariencia y el grado de retención de antioxidantes en rodajas de berenjenas violetas y blancas, luego de aplicarles diferentes estrategias de procesamiento o preservación. Las rodajas fueron sometidas a cuatro tipos de secado (por aire a dos temperaturas diferentes, bajo vacío, solar o liofilización) y a dos métodos de congelación (lenta o rápida). En la **Figura IV.5** puede observarse la apariencia de rodajas de berenjenas violetas y blancas luego de la aplicación de los tipos de secado mencionados. Todos los tratamientos rindieron productos estables, con valores de actividad de agua menores a 0,6 (datos no mostrados). Las muestras secas sufrieron, como era de esperar, cambios de color relacionados a cierto grado de pardeamiento, provocado por las temperaturas relativamente altas empleadas. Además, aunque redujeron su volumen en gran medida, conservaron su forma, especialmente en los casos de secado por túnel de aire.



**Figura IV.5.** Apariencia de rodajas de berenjenas **A)** violetas y **B)** blancas, sometidas a diferentes métodos de secado. T70=Secado en túnel de aire a 70°C; T50= Secado en túnel de aire a 50 °C; Va=Secado en estufa de vacío; So=Secado solar; L=Liofilización.

La liofilización generó productos que conservaron el color característico de ambas variedades, con una alta retención de la estructura y textura esponjosa. Por su parte, como se muestra en la **Figura IV.6**, las muestras congeladas mantuvieron sus dimensiones, sin embargo resultaron poco estables debido a la rápida descongelación durante su manipulación y la aparición de cierto nivel de pardeamiento superficial.



**Figura IV.6.** Apariencia de rodajas de berenjenas **A)** violetas y **B)** blancas, sometidas a congelación. Cl= Congelado lento; Cr= Congelado rápido.

#### **IV.5.2. Retención de antioxidantes**

El secado es una de las formas más eficaces y ampliamente utilizadas para preservar alimentos (Durance y Wang, 2002). Sin embargo, cierta pérdida de compuestos AOX termolábiles y una consecuente disminución de la capacidad antioxidante del producto, puede ocurrir (Hung y Duy, 2012). La liofilización suele emplearse para eludir estos daños por calor, rindiendo productos secos con buenas características nutricionales y una excelente retención estructural, a pesar de ello su aplicación es reducida dado que se trata de una tecnología costosa (Lin y col., 1998). Keinanen y Titto (1996) informaron además, que la liofilización podría incrementar la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos.

En el caso de la congelación, esta causaría mínima destrucción de AOX, con niveles de retención que dependen esencialmente de la variedad y especie vegetal de que se trate (Rickman y col., 2007). De todos modos, es conocido que existe una importante dependencia de la calidad de los productos congelados con la velocidad y el tipo de proceso de congelación. En berenjena esto ha sido estudiado brevemente por Wu y col., (2008) y Otero y col. (1998), aunque los autores no han analizado su efecto sobre la capacidad y el contenido de AOX. Es así que aquí se decidió aplicar un método de congelación lento y uno rápido para un estudio posterior relacionado a los AOX.

En la **Tabla IV.4** se indican los porcentajes de retención de los parámetros estudiados. En general pudo advertirse una importante pérdida de la capacidad antioxidante y del contenido de CGA luego de todos los métodos de procesamiento aplicados. El secado particularmente provocó elevadas pérdidas de la capacidad AOX (entre 80 y 98%). En este caso el efecto de los tratamientos fue mayor al observado entre tipos de fruto. A pesar de esto, pudo distinguirse que las berenjenas blancas sufrieron en algunos tratamientos una mayor disminución de AOX, como por ejemplo en So y L, respecto de las violetas.

**Tabla IV.4.** Retención porcentual (%) de la capacidad antioxidante (TEAC) y el contenido de ácido clorogénico (CGA) en berenjenas violetas (V) y blancas (B), sometidas a diferentes métodos de procesamiento. Valores con letras distintas indican diferencias de acuerdo al test LSD de Fisher con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

TRATAMIENTO	RETENCIÓN TEAC (%)		RETENCIÓN CGA (%)	
	V	B	V	B
Control (C)	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
Secado (T70)	25,1 de	22,4 e	19,5 e	14,6 f
Secado (T50)	9,2 f	11,3 f	2,1 g	3,3 g
Secado vacío (Va)	12,9 f	10,6 f	4,0 g	2,9 g
Secado solar (So)	21,9 e	12,3 f	13,3 f	1,7 g
Liofilizado (L)	50,7 c	29,4 d	50,5 d	20,5 e
Congelado lento (Cl)	44,8 c	57,2 b	51,6 d	61,0 c
Congelado rápido (Cr)	62,4 b	95,5 a	60,1 c	72,3 b
LSD	7,40		3,79	

El secado a 50 °C en túnel de aire (T50) provocó mayores pérdidas de capacidad AOX que el correspondiente a 70 °C (T70). Si bien en muchos casos no existieron diferencias significativas, el hecho de que las reducciones fueron altas a temperaturas de secado solar (So=40 °C), pasando por un máximo en frutos secados a 50 °C y reduciéndose a 70°C, sugiere que la disminución podría estar relacionada a la actividad de enzimas termolábiles responsables del pardeamiento, como PPO o POD (Tomás-Barberán y Espín, 2001; Mishra y col., 2013). Si la degradación ha sido en parte mediada por estas enzimas, que el secado en estufa de vacío (Va) donde el O<sub>2</sub> fue removido no haya reducido la pérdida de CGA, indicaría que el rol de enzimas independientes de este sustrato como POD, resulta importante en las condiciones evaluadas (Richard-Forget y Gaillard, 1997). A mayor temperatura de secado se reduce el tiempo de exposición del tejido (Doymaz, 2011), por lo que el tratamiento a 70 °C pudo influir en una mayor conservación de los AOX, ante el menor tiempo de exposición al calor de los frutos. Es de resaltar que a esta temperatura el proceso de secado de berenjena presenta además un mayor coeficiente de difusión (Brasiello y col., 2013). Dado que se

deseaba determinar específicamente el proceso bajo estudio, no se adicionaron antioxidantes como pueden ser sulfitos ( $\text{HSO}_3$ ) que suelen emplearse en secado comercial (Queiroz y col., 2008). Otras alternativas ensayadas por diferentes autores sobre tejido de berenjena previo al secado, tendientes a reducir el tiempo de exposición, fueron: escaldado (Doymaz y GÖL, 2011), ultrasonido (Puig y col., 2012), secado en vacío a distintas temperaturas (Wu y col., 2007); o bien el agregado de enzimas y calcio para proteger y mejorar la microestructura del tejido (Banjongsinsiri y col., 2004). Por el mismo motivo, los frutos tampoco se escaldaron. Estas podrían ser estrategias para reducir las pérdidas durante el secado de berenjena en caso de que ocurran, al menos en parte, por vía enzimática. A fin de determinarlo con claridad, sería necesario entonces, un estudio más exhaustivo de estas variables.

Si bien la liofilización redujo las pérdidas respecto del secado convencional a temperaturas elevadas, llamativamente la disminución fue significativa y ascendió a 50 y 70% en berenjenas violetas y blancas, respectivamente (**Tabla IV.4**). En el presente tratamiento, CGA pareció ser el compuesto principalmente degradado. Es posible que cierto grado de agregación con proteínas haya ocurrido como consecuencia de los cambios producidos en la matriz del tejido vegetal en respuesta al tratamiento. Similares resultados fueron encontrados para frutos tropicales como mango, papaya, carambola y sandía, en los que el contenido de compuestos fenólicos fue mayor en los frutos frescos, que en aquellos liofilizados (Shofian y col., 2011).

Finalmente, los resultados indican que las rodajas de berenjena sufrieron pérdidas importantes en el contenido y capacidad AOX luego del congelado, especialmente en el tipo violeta (**Tabla IV.5**). A pesar de que normalmente se asume que los cambios en la calidad nutricional son mínimos durante la congelación, el CGA mostró una retención de solo 50-70% para ambas variedades y métodos analizados. Independientemente de esto, en general pudo observarse que la congelación rápida (Cr), como ocurre con otros alimentos, permite obtener

mejores resultados en términos de una mayor retención de AOX. Con el fin de mejorar esta retención se podrían implementar alternativas tales como la asistencia de altas presiones al proceso de congelado, ya que el daño celular causado en berenjena es menor (Otero y col., 1998).

#### **IV. CONCLUSIONES**

Las variedades de berenjenas estudiadas en el presente capítulo mostraron diferente respuesta en la retención de antioxidantes frente a las alternativas de procesamiento aplicadas. Al emplear pre-tratamientos, fueron observadas reducciones del 25-50% en el nivel de AOX, sin embargo en todos los casos las berenjenas blancas mostraron mayor capacidad de protección de estos compuestos y en especial del CGA, respecto de los frutos violetas. A su vez, el ensayo de condiciones adversas de manipulación (demora en el procesamiento de frutos cortados y el salado) permitió determinar que los mismos deben tratar de evitarse o minimizarse, y que ciertas variedades resultarían más adecuadas que otras en caso de requerirse, por ejemplo, productos mínimamente procesados. Por su parte, el escaldado no resultó efectivo en una adecuada conservación de las propiedades antioxidantes, al menos en las variedades y condiciones ensayadas.

Se hallaron cambios significativos en los antioxidantes de berenjenas violetas y blancas, luego de la cocción de los frutos. Pudo observarse que, salvo algunas excepciones, el contenido de TEAC y CGA se incrementó, y que esta respuesta positiva dependió esencialmente de la variedad evaluada. En forma similar a lo que ocurrió en los pretratamientos, las berenjenas blancas mostraron mejores propiedades de retención y acumulación de AOX, especialmente en los métodos húmedos de cocción. Los cambios en la estructura del tejido, podrían ser los responsables de la liberación o modificación de los AOX presentes en los frutos, de aquí la importancia de la influencia de la matriz del vegetal y de la elección de los productos a ser consumidos.

Finalmente, los métodos de procesamiento provocaron importantes pérdidas de AOX, siendo especialmente notables los detrimentos por efecto del secado, observándose reducciones de hasta 80-100%. Ciertas pérdidas de AOX también fueron observadas luego del

congelado, sin embargo, la congelación rápida mostró ciertos beneficios. A pesar de que el efecto varietal resultó menos importante en cuanto al grado de retención de antioxidantes, pudo determinarse cierta tendencia en la que las berenjenas blancas se comportaron algo mejor frente al congelado y las violetas tuvieron mejor respuesta en el secado.

Por todo lo expuesto, sería factible seleccionar variedades o tipos de berenjenas con las características de estabilidad más apropiadas para cada tipo particular de tratamiento, conservando y realzando en algunos casos, las propiedades antioxidantes de los frutos.

## **CONCLUSIONES FINALES**

En el presente trabajo se estudió la influencia del genotipo, estado de desarrollo, condiciones de almacenamiento y métodos de procesamiento y cocción, sobre los niveles y estabilidad de los antioxidantes en berenjena. Durante el desarrollo ontogénico estudiado en dos variedades de berenjena violeta, los compuestos fenólicos fueron los AOX más abundantes en la pulpa, y dentro de éstos el ácido clorogénico (CGA) fue el compuesto mayoritario. La capacidad antioxidante se redujo progresivamente con el crecimiento en ambas variedades. Los frutos en estadios iniciales, comúnmente conocidos como “baby” y que han comenzado a comercializarse en los últimos años, mostraron una capacidad antioxidante dos veces mayor que las berenjenas completamente desarrolladas. Contrariamente a lo que ocurre en otras especies sensibles al frío las berenjenas “baby” tuvieron un mejor almacenamiento a baja temperatura (0 °C) que los frutos en estados más avanzados para los que se recomienda un almacenamiento a 10 °C. En una segunda parte del trabajo, se evaluaron los cambios en los AOX de berenjenas violetas completamente desarrolladas durante el almacenamiento a temperatura recomendada (10 °C) y de daño por frío (0 °C). A diferencia de lo que ocurre en muchos otros productos en los que luego de la cosecha prevalecen los procesos degradativos, la capacidad antioxidante de los frutos conservados a 10 °C se incrementó de manera continua. El ácido clorogénico, se acumuló hasta los 14 d de almacenamiento. Contrariamente, cuando los frutos se almacenaron a 0 °C, y luego de un aumento inicial (3 d), se observó una marcada degradación de AOX. En las condiciones de almacenamiento en las que primó la síntesis, no se encontró ácido caféico libre lo que sugiere que la esterificación necesaria para la formación de CGA ocurre conjuntamente con la síntesis de este precursor. Por otra parte, durante el almacenamiento a 0 °C y a medida que la luminosidad de la pulpa disminuyó, tampoco se detectó ácido cafeico libre y el ácido quínico mostró cambios menores. Esto

sugiere que el CGA sería sustrato directo en las reacciones de pardeamiento observadas conforme progresa el daño por frío.

A continuación se evaluó la distribución y estabilidad de los AOX fenólicos en la pulpa de dos tipos de berenjenas comercialmente importantes: violetas y blancas, durante el almacenamiento a 10 °C por períodos prolongados. La capacidad antioxidante, junto con la localización *in situ*, mostraron que el CGA se acumuló en forma preferencial en la zona interna de la pulpa tanto en frutos blancos como violetas. Como se describió anteriormente, en las etapas iniciales de almacenamiento (14 d) se produjo una acumulación de AOX en ambas variedades. Hacia el final del período de conservación (30 d) las berenjenas violetas presentaron una reducción significativa de los compuestos fenólicos, en contraposición a las berenjenas blancas en las que estos compuestos se mantuvieron constantes. La pérdida de AOX en frutos violetas ocurrió especialmente en las zonas adyacentes a las semillas y fibras, y sin apreciable pardeamiento como ocurre en los frutos almacenados a 0 °C. La localización y las actividades de las enzimas polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD) no correlacionaron con la pérdida de antioxidantes fenólicos, que sin embargo se asoció con la sobre-producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Los resultados sugieren que la reducción en AOX fenólicos en frutos enteros almacenados en condiciones recomendadas, no ocurriría por la vía del pardeamiento enzimático, sino alguna otra como por ejemplo la lignificación de las cubiertas seminales, fibras y haces vasculares en los frutos en desarrollo.

Si bien algunos estudios han caracterizado la estabilidad de los AOX ante diferentes condiciones, no se ha determinado hasta la fecha si la matriz del vegetal (genotipo) puede ejercer un efecto significativo en la retención de AOX. En ese sentido en un último grupo de ensayos se estudió la influencia de diferentes condiciones de procesamiento (escaldado, salado, trozado, congelación, deshidratación y liofilización) y cocción (métodos húmedos a presión atmosférica y sobre-presión, microondas y secos: grillado y horneado) en la retención

de AOX en berenjenas violetas y blancas. Los resultados de este trabajo mostraron que, con excepción de los métodos de deshidratación, en los que las pérdidas fueron muy elevadas y similares para los dos tipos de frutos analizados, las berenjenas blancas mostraron una mayor retención de AOX que las violetas en respuesta al procesamiento. Es importante mencionar que en algunos métodos de cocción se observó un aumento en la capacidad antioxidante de los frutos (expresada sobre materia seca) sugiriendo o bien la liberación de compuestos previamente insolubles o bien la síntesis *de novo* de algunos compuestos con propiedades anti-radicales (ej. productos de la reacción de Maillard). Independientemente de esto, el estudio mostró que la matriz del vegetal posee una elevada importancia en la retención de AOX ante diferentes condiciones de procesamiento y preparación.

Finalmente los resultados hallados en la presente Tesis podrían resultar de interés para la búsqueda de berenjenas con mayores niveles de AOX por parte de productores, distribuidores y consumidores interesados en conocer como las condiciones de manipulación y la elección del genotipo, tiene implicancia en frutos con altos niveles de compuestos bioactivos.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Aerts, R.J., Baumann, T.W., 1994. Distribution and utilization of chlorogenic acid in *Coffea* seedlings. *J. Exp. Bot.* 45, 497–503.
- Aguiar, J., Molinar, R. 1998. Eggplant production in California. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Vegetable production series. Publication 7235. 3p.
- Ahmed, J. 2011. Drying of Vegetables: Principles and Dryer Design. En: Handbook of vegetables and vegetable processing. Chapter 12. Sinha, N (ed.). John Wiley & Sons. pp. 279-298.
- Aizawa, K., Inakuma, T. 2007. Quantitation of carotenoids in commonly consumed vegetables in Japan. *Food Sci. Technol. Res.* 13, 247-252.
- Akanitapichat, P., Phraibung, K., Nuchklang, K., Prompitakkul, S. 2010. Antioxidant and hepatoprotective activities of five eggplant varieties. *Food Chem. Toxicol.* 48(10), 3017-3021.
- Ali, H., Ramadan, M., Ragab, G., Kamil, M., Eissa, H. 2011. Optimizing browning capacity of eggplant rings during storage before frying. *J. Amer. Sci.* 7(6), 579-592.
- Alonzo-Macías, M.; Cardador-Martínez, A.; Mounir, S.; Montejano-Gaitán, G.; Allaf, K. 2013. Comparative study of the effects of drying methods on antioxidant activity of dried strawberry (*Fragaria Var. Camarosa*). *J. Food Res.* 2 (2): 92-107.
- Alvarez G., Trystram, G. 1995. Design of a new strategy for the control of the refrigeration process: fruit and vegetables conditioned in a pallet. *Food Control* 6(6):347-355
- Ames, B., Shigenaga, M., Hagen, T. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90(17), 7915-7922.
- Anónimo. 2004a. Boulanger (Eggplant). Postharvest Care and Market Preparation. Technical Bulletin No. 17. National Agricultural Research Institute. East Coast Demerara. Guyana.
- Anónimo. 2004b. El cultivo de la berenjena. <http://www.infoagro.com/hortalizas/berenjena.htm>
- Anónimo. 2011. Eggplant (*Solanum melongena* L.). Department of Agriculture, Forestry and Fisheries. Republic of South Africa. 6 p.
- Anttonen, M., Hoppula, K., Nestby, R., Verheul, M., Karjalainen, R. 2006. Influence of fertilization, mulch color, early forcing, fruit order, planting date, shading, growing environment, and

- genotype on the contents of selected phenolics in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruits. *J. Agric. Food Chem.* 54(7), 2614-2620.
- AOAC, 1980. Official Methods of Analysis, 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. 359 pp.
- Arivalagan, M., Gangopadhyay, K., Kumar, G., Bhardwaj, R., Prasad, T., Sarkar, S., Roy, A. 2012. Variability in mineral composition of Indian eggplant (*Solanum melongena* L.) genotypes. *J. Food Comp. Anal.* 26(1), 173-176.
- Arnao, M. B., Cano, A., Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* 73, 239–244.
- Artés, F. 2006. El envasado en atmósfera modificada mejora la calidad de consumo de los productos hortofrutícolas intactos y mínimamente procesados en fresco. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha.* 7 (2): 61-85.
- Arvanitoyannis, I., Khah, E., Christakou, E., Bletsos, F. 2005. Effect of grafting and modified atmosphere packaging on eggplant quality parameters during storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* 40(3), 311-322.
- Ayala-Zavala, J. F., Wang, S. Y., Wang, C. Y., Gonzalez-Aguilar, G. A. 2004. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Lebensm. Wiss. Technol.* 37, 687-695.
- Azuma, K., Ohyama, A., Ippoushi, K., Ichiyanagi, T., Takeuchi, A., Saito, T., Fukuoka, H. 2008. Structures and antioxidant activity of anthocyanins in many accessions of eggplant and its related species. *J. Agric. Food Chem.* 56(21), 10154-10159.
- Bahçeci, K., Serpen, A., Gökmen, V., Acar, J. 2005. Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *J. Food Eng.* 66(2), 187-192.
- Bailey, L. 1947. The standard cyclopedia of horticulture. Macmillan, New York, NY, USA.
- Banjongsinsiri, P., Shields, J., Wicker, L., 2004. Vacuum infusion of plant or fungal pectinmethylesterase y calcium affects the texture and structure of eggplant. *J. Agric. Food Chem.* 52, 8214–8223.
- Barbagallo, R., Chisarib, M., Patanè, C. 2012. Use in vivo of natural anti-browning agents against polyphenol oxidase activity in minimally processed eggplant. *Chem. Eng.* 27.

- Barros, A., Nunes, F., Gonçalves, B., Bennett, R., Silva, A. 2011. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chem.* 128, 165-172.
- Beckman, K., Ames, B. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78(2), 547-581.
- Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., 2003. Transpiration y water stress. En: *Postharvest physiology y pathology of vegetables*. Bartz, J., Brecht, J. (eds.). Marcel Dekker, New York, pp. 111-159.
- Blankemeyer, J. T., McWilliams, M. L., Rayburn, J. R., Weissenberg, M., Friedman, M. 1998. Developmental toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 383-389.
- Blasco-Villarroya, M. 2009. Caracterización morfológica y genotipado de una población interespecífica de *Solanum incanum* x *Solanum melongena* L. Desarrollo de marcadores CAPS a partir de COSII y realización de mapa genético. Univ. Politécnica Valencia. 116p.
- Brandt, K., Molgaard, J. 2001. Organic agriculture: does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods? *J. Sci. Food Agric.* 81, 924-931.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* 28, 25–30.
- Brsiello, A., Adiletta, G., Russo, P., Crescitelli, S., Albanese, D., Di Matteo, M. 2013. Mathematical modeling of eggplant drying: Shrinkage effect. *J. Food Eng.* 114(1), 99-105.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander H. 1995. Carotenoids today and challenges for the future. En: *Carotenoids. Volume 1A: isolation and analysis. Chapter 2*. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander H. (eds). Basel: BirkhauserVerlag. pp. 13-26.
- Brummell, D., Harpster, M., Civello, P., Palys, J., Bennett, A., Dunsmuir, P. 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* 11:2203–2216.
- Bubna, G.A., Lima, R.B., Zanardo, D.Y., Dos Santos, W.D., Ferrarese, M de L, Ferrarese-Filho, O., 2011. Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*). *J. Plant Physiol.* 168, 1627-1633.
- Buettner, G., Jurkiewicz, B. 1996. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res.* 145(5), 532-541.

- Campañone, L., Giner, S., Mascheroni, R. 2002. Generalized model for the simulation of food refrigeration. Development and validation of the predictive numerical method. *Int. J. Refrig.* 25(7), 975-984.
- Cantwell, M., Kasmire, R. 2007. Sistemas de manejo postcosecha: Hortalizas de frutos. En: Kader, A. (ed.) En: *Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas*. Tercera Edición.
- Cantwell, M., Suslow, T. 2000. Indicadores básicos del manejo poscosecha de berenjena. Departamento de Productos Vegetales. Universidad de California, Davis, USA. <http://postharvest.ucdavis.edu/produce/producefacts/veg/eggplant.shtml>
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 44(11), 3426-3431.
- Carocho, M., Ferreira, I. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15-25.
- Castenmiller, J. 2000. Spinach as a source of carotenoids, folate and antioxidant activity. Thesis Wageningen University. ISBN 90-5808-160-5. <http://edepot.wur.nl/196581>
- Catalano, A., Schiliro, A., Todaro, A., Palmeri, R., Spagna, G. 2007. Enzymatic fresh cut eggplants differently packaged. *Acta Hort.* 746, 469-474.
- Chang, C. H., Lin, H. Y., Chang, C. Y., Liu, Y. C. 2006. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *J. Food Eng.* 77, 478-485.
- Chassy, A., Bui, L., Renaud, E., van Horn, M., Mitchell, A. 2006. A three-year comparison of the content of antioxidant micronutrients and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8244-8252.
- Chatterjee, I. 1973. Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science.* 182(4118), 1271-1272.
- Chen, N, Li, H. 1996. Cultivation and breeding of eggplant. En *Training Workshop on Vegetable Cultivation and Seed Production*. [http://203.64.245.61/fulltext\\_pdf/eam0137.pdf](http://203.64.245.61/fulltext_pdf/eam0137.pdf)
- Clé, C., Hill, L. M., Niggeweg, R., Martin, C. R., Guisez, Y., Prinsen, E., Jansen, M. A. K. 2008. Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation y UV-tolerance. *Phytochem.* 69, 2149–2156.

- Clifford, M. 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* 80(7), 1033-1043.
- Concellón, A. 2003. Daño por frío en frutos no climatéricos. Tesis de doctorado. Doctor en Ciencias Exactas, área Química. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. 202p. <http://sedici.unlp.edu.ar>.
- Concellón, A., Añón M. C., Chaves, A. R. 2007. Effect of low temperature storage on physical and physiological characteristics of eggplant fruit (*Solanum melongena* L.). *LWT-Food Sc. Technol* 40, 389–396.
- Concellón, A., Añón M.C., Chaves, A. R. 2004. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. *Food Chem.* 88, 17–24.
- Concellón, A., Añón, M., Chaves, A. 2005. Effect of chilling on ethylene production in eggplant fruit. *Food Chem.* 92(1), 63-69.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 26(8), 1001-1043.
- Dai, J., Mumper, R. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Das, S., Raychaudhuri, U., Falchi, M., Bertelli, A., Braga, P. Das, D. 2011. Cardioprotective properties of raw and cooked eggplant (*Solanum melongena* L). *Food Funct*, 2 (7), 395-399.
- Daunay, M. 1996, Aubergine? Aubergines! *PHM Revue Horticole.* 374: 48-49.
- Daunay, M. 2008. Eggplant. En: *Handbook of plant breeding: Vegetables II*. Prohens, J., Nuez, F. (eds.). Springer, New York, USA. pp. 163-220.
- Daunay, M. C., Aubert, S., Frary, A., Doganlar, S., Lester, R. N., Barendse, G., Voorrips, R. E. 2004. Eggplant (*Solanum melongena*) fruit colour: pigments, measurements and genetics. En: *Proceedings of the XIIth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Capsicum y eggplant*, Noordwijkerhout, Netherlands, pp. 108-116.
- Daunay, M., Chadha, M. 2004. *Solanum melongena* L. En: *Vegetables. Plant resources of Tropical Africa 2*. Grubben G., Denton O. (eds.). PROTA Foundations/Backhuys Publishers/CTA, Wageningen. pp. 488-493.

- Daunay, M., Janick, J. 2007. History and iconography of eggplant. *Chron Horticult.* 47(3), 16-22.
- Daunay, M., Lester, R., Ano, G. 2001a. Cultivated eggplants. En: *Tropical plant breeding*. Charrier A, Jacquot M, Hamon S, Nicholas D (eds.). Oxford University Press, Oxford, UX, pp. 200-225.
- Daunay, M., Lester, R., Gebhardt, C., Hennart, J., Jahn M. 2001b. Genetic Resources of eggplant (*Solanum melongena* L.) and allied species: a new challenge for molecular geneticists and eggplant breeders. En: Van Den Berg, R., Barendse, G., Mariani, C. (eds.) *Solanaceae V*. Nijmegen University Press, Nijmegen, The Netherlands, pp 251-274.
- de Ancos, B., Gonzalez, E. M., Cano, M. P. 2000. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4565-4570.
- De Souza, P., Aroucha, E., De Souza, A., da Costa, A., Ferreira, G., Bezerra Neto, F. 2009. Postharvest conservation of eggplant fruits by the application of cassava edible coating or PVC film. *Hortic. bras.* 27(2), 235-239.
- Demir, I.; Mavi, K.; Sermenli, T.; Ozcoban, M. 2002. Seed development and maturation in Aubergine (*Solanum melongena* L.). *Gartenbauwissenschaft*, 67, 148-154.
- Desikan, R., Mackerness, S., Hancock, J., Neill, S.J. 2001. Regulation of the Arabidopsis transcriptosome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127, 159–172.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., Liu, R. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric. Food Chem.* 50:3010-3014.
- Dias, J. 2012. Nutritional quality and health benefits of vegetables: A Review. *Food Sci. Nutr.* 3 (10), 1354-1374.
- Díaz-Pérez, J. 1998. Transpiration rates in eggplant fruit as affected by fruit and calyx size. *Postharvest Biol Technol.* 13(1), 45-49.
- Dixon, R., Paiva, N. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* 7, 1085-1097.
- Doganlar, S., Frary, A., Daunay, M., Lester, R., Tanksley, S. 2002. Conservation of gene function in the solanaceae as revealed by comparative mapping of domestication traits in eggplant. *Genetics.* 161:1713-1726.
- Doymaz, I. 2011. Drying of eggplant slices in thin layers at different air temperatures. *J. Food Proc. Pres.* 35, 280-289.

- Doymaz, I., Göl, E. 2011. Convective drying characteristics of eggplant slices. *J. Food Proc. Eng.* 34, 1234-1252.
- Durance, T., Wang, J. 2002. Energy consumption, density and rehydration rate of vacuum microwave- and hot-air convection dehydrated tomatoes. *J. Food Sci.*, 67, 2212e221
- Duthie, G., Gardner, P., Kyle, J. 2003. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc. Nutr. Soc.* 62(03), 599-603.
- El-Qudah, J. M. 2008. Dietary Intake of selected common vegetable foods and their total carotenoids determination. *Amer. J. Agric. Biol. Sci.* 3, 729.
- EL-Qudah, J. M. 2009. Identification and quantification of major carotenoids in some vegetables. *Amer. J. Appl. Sci.* 6, 492.
- El-Seedi, H.R., El-Said, A.M.A., Khalifa, S.A.M., Göransson, U., Bohlin, L., Borg-Karlson, A.K., Verpoorte, R., 2012. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *J. Agric. Food Chem.* 60, 10877-10895.
- Esteban, R. M., Molla, E. M., Robredo, L. M., Lopez-Andreu, F. J. 1992. Changes in the chemical composition of eggplant fruits during development and ripening. *J. Agric. Food Chem.* 40, 998-1000.
- Esteban, R., Lopez-Andreu, F., Martin-Cabrejas, M., Molla, E. 1993. Pectin changes during the development and ripening of eggplant fruits. *Food Chem.* 46(3), 289-292.
- Esteban, R., Molla, E., Villarroja, M., Lopez-Andreu, F. 1989. Changes in the chemical composition of eggplant fruits during storage. *Sci. Hort.* 41, 19-25.
- Ezura, H., Hiwasa-Tanase, K. 2010. Fruit development. En: Pua and Davey (eds.): *Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 301-318.
- Faller, A., Fialho, E. 2009. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic y conventional retail vegetables after domestic cooking. *Food Res. Int.* 42, 210-215.
- Fallik, E., Temkin-Gorodeiski, N., Grinberg, S., Davidson, H. 1995. Prolonged low-temperature storage of eggplants in polyethylene bags. *Postharvest Biol. Technol.* 5, 83-89
- FAOSTAT. 2014. <http://www.faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>

- Fawole, O., Opara, U. 2013. Changes in physical properties, chemical and elemental composition and antioxidant capacity of pomegranate (cv. Ruby) fruit at five maturity stages. *Sci. Hort.* 150, 37-46.
- Fellows, P. J. 2000. *Food processing technology: principles and practice*. CRC Press.
- Fennema, O. 1977. Loss of vitamins in fresh and frozen foods. *Food Technol.* 12, 32-38.
- Fennema, O. 2000. *Química de alimentos*. 2da. Edición. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Fernández-Fraguas, C. 2008. *Caracterización reológica y optimización de la textura de purés de patatas frescos y congelados. Efectos del proceso de adición de crioprotectores*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de veterinaria. <http://eprints.ucm.es/9160/1/T30942.pdf>
- Ferracane, R., Pellegrini, N., Visconti, A., Graziani, G., Chiavaro, E., Miglio, C., Fogliano, V. 2008. Effects of different cooking methods on antioxidant profile, antioxidant capacity and physical characteristics of artichoke. *J Agric. Food Chem.* 56, 8601-8608.
- Flick, GJ Jr., Ory, RL., Angelo, AJ., 1977. Comparison of nutrient composition and of enzyme activity in purple, green, and white eggplants. *J. Agric. Food Chem.* 25, 117-120.
- Fonseca, S., Oliveira, F., Brecht, J. 2002. Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review. *J. Food Eng.* 52:99-119.
- Frary, A.; Doganlar, S; Daunay, M. 2007. Eggplant. En: *Genome mapping and molecular breeding in plants, Volume V: Vegetables*. Kole, C. (ed). Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. pp. 287-313.
- Gacche, R., Zore, G., Ghole, V. 2003. Kinetics of inhibition of polyphenol oxidase mediated browning in apple juice  $\beta$ -Cyclodextrin and L-ascorbate -2-triphosphate. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* 18: 1-5.
- Gajewski, M., Kowalczyk, K., Bajer, M., 2009. The influence of postharvest storage on quality characteristics of fruit of eggplant cultivars. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. Nap.* 37, 200-205.
- Gajewski, M.; Arasimowicz, D. 2004. Sensory quality of eggplant fruits (*Solanum melongena* L.) as affected by cultivar and maturity stage. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 13/54 (3), 249-254
- Gharras, H. 2009. Polyphenols: food sources, properties and applications-a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44(12), 2512-2518.
- Ghidelli, C., Mateos, M., Rojas-Argudo, C., Pérez-Gago, M. 2013. Effect of antioxidants on enzymatic browning of eggplant extract and fresh-cut tissue. *J. Food Process. Pres.* 1745-4549

- Gil-Izquierdo, A., Gil, M. I., Conesa, M., Ferreres, F. 2001. The effect of storage temperatures on vitamin C and phenolics content of artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2(3), 199-202.
- Gomez, F., Fernández, L., Gergoff, G., Guiamet, J., Chaves, AR., Bartoli, CG., 2008. Heat shock increases mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and extends postharvest life of spinach leaves. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 229–234
- Halliwell, B. 1996. Commentary oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free radical res.* 25(1), 57-74.
- Halliwell, B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free radical res.* 31(4), 261-272.
- Hanson, P. M., Yang, R. Y., Samson., Tsou, C. S., Ledesma, D., Engle, L., Lee, T. C. 2006. Diversity in eggplant (*Solanum melongena*) for superoxide scavenging activity, total phenolics and ascorbic acid. *J. Food Comp. Anal.* 19, 594-600.
- Heim, K., Tagliaferro, A., Bobilya, D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr. Biochem.* 13(10), 572-584.
- Hermes, D., Mattson, W. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q. ReV. Biol.* 67, 283-335.
- <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/TESISMASTERMANUELBLASCOVILLARROYA.pdf>
- Hu, W., Jiang, A., Tian, M., Liu, C., Wang, Y. 2010. Effect of ethanol treatment on physiological and quality attributes of fresh? cut eggplant. *Int. J. Food Sci. Technol.* 90(8), 1323-1326.
- Huang, H., Chang, C., Tso, T., Huang, J., Chang, W., Tsai, Y. 2004. Antioxidant activities of various fruits and vegetables produced in Taiwan. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 55, 423-429.
- Hung, D., Tong, S., Tanaka, F., Yasunaga, E., Hamanaka, D., Hiruma, N., Uchino, T. 2011. Controlling the weight loss of fresh produce during postharvest storage under a nano-size mist environment. *J. Food Eng.* 106(4), 325-330.
- Hung, P. V., Duy, T. L. 2012. Effects of drying methods on bioactive compounds of vegetables and correlation between bioactive compounds and their antioxidants. *Int. Food Res. J.* 19, 327-332.
- Hurtado, M., Vilanova, S., Plazas, M., Gramazio, P., Fonseca, H., Fonseca, R., Prohens, J. 2012. Diversity and relationships of eggplants from three geographically distant secondary centers of diversity. *PLoS ONE.* 7(7): e41748.

- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. 2011. Critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 126, 1821-1835
- Ismail, A., Marjan, Z., Foong, C. W. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem.* 87(4), 581-586.
- Jeremy, J., Shukla, N., Muzaffar, S., Handley, A., Angelini, G. 2004. Reactive oxygen species, vascular disease and cardiovascular surgery. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2, 229-236.
- Jha, S., Matsuoka, T. 2002. Surface stiffness and density of eggplant during storage. *J. Food Eng.* 54(1), 23-26.
- Jha, S., Matsuoka, T., Miyauchi, K. 2002. Surface gloss and weight of eggplant during storage. *Biosyst. Eng.* 81(4), 407-412.
- Jiménez-Monreal, A. M., García-Diz, L., Martínez-Tomé, M., Mariscal, M., Murcia, M. A. 2009. Influence of cooking methods on antioxidant activity of vegetables. *J. Food Sci.* 74, H97-H103.
- Joët, T., Salmona, J., Laffargue, A., Descroix, F., Dussert, S. 2010. Use of the growing environment as a source of variation to identify the quantitative trait transcripts and modules of co-expressed genes that determine chlorogenic acid accumulation. *Plant Cell Env.* 33, 1220-1233.
- Kader, A. 2002. *Biología y tecnología poscosecha: Un panorama*. En: *Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas 3ra Edición*. Kader, A., Pelayo-Saldivar, C. (eds.). Capítulo 4. Universidad de California. Davis. pp. 43-54.
- Kader, A., Salveit, M. 2003. Atmosphere modification. En: *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*. Bartz, J. A., J. K. Brecht (Eds.). Marcel Dekker. New York. pp: 229-246.
- Kähkönen, M., Heinonen, M. 2003. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J. Agric. Food Chem.* 51(3), 628-633.
- Kalogeropoulos, N.; Mylona, A.; Chiou, A.; Ioannou, M. S.; Andrikopoulos, N. K. 2007. Retention y distribution of natural antioxidants (R-tocopherol, polyphenols y terpenic acids) after shallow frying of vegetables in virgin olive oil. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 40, 1008–1017.
- Kalt, W. 2005. Effects of production y processing factors on major fruit y vegetable antioxidants. *J. Food Sci.* 70(1), R11-R19.

- Kalt, W., Lawand, C., Ryan, D., McDonald, J., Donner, H., Forney, C. 2003. Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128(6), 917-923.
- Karpinski S., Reynolds H., Karpinska B., Wingsle G., Creissen G., Mullineaux P. 1999. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*. 284, 654-657.
- Kaynas, K., Özelkök, S., Sümeli, N., Abak, K. 1995. Controlled and modified atmosphere storage of eggplant (*Solanum melongena* L.) fruits. *International Symposium on Solanacea for Fresh Market* 412. pp. 143-151.
- Keinanen M., Julkunen-Tiitto, R. 1996. Effect of sample preparation method on birch (*Betula pendula* Roth) leaf phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2724-2727.
- Knapp, S., Vorontsova, M., Prohens, J. 2013. Wild Relatives of the Eggplant (*Solanum melongena* L.: *Solanaceae*): New Understanding of Species Names in a Complex Group. *PLoS ONE* 8(2): e57039
- Kopsell, D., Kopsell, D. 2006. Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. *Trends Plant Sci.* 11, 499 - 507.
- Korus A., Lisiewska Z., Kmiecik W. 2002. Effect of freezing and canning on the content of selected vitamins and pigments in seeds of two grass pea (*Lathyrus sativus* L.) cultivars at the not fully mature stage. *Nahrung/Food* 46, 233–237.
- Kozukue, N., Kozukue, E., Kishiguchi, M. 1979. Changes in the contents of phenolic substances, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine ammonia-lyase (TAL) accompanying chilling-injury of eggplant fruit. *Sci. Hort.* 11, 51-59.
- Kozukue, N., Kozukue, E., Kishiguchi, M., Lee, S. W. 1978. Studies on keeping-quality of vegetables y fruits. III. Changes in sugar and organic acid contents accompanying the chilling-injury of eggplant fruits. *Sci. Hort.* 8, 19-26.
- Kris-Etherton, P., Hecker, K., Bonanome, A., Coval, S., Binkoski, A., Hilpert, K., Etherton, T. 2000. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* 113(9), 71-88.
- Lako, J., Trenerry, V., Wahlqvist, M., Wattanapenpaiboon, N., Sotheeswaran, S., Premier, R. 2007. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chem.* 101, 1727-1741.

- Lampi, A. 2011. Analysis of tocopherols and tocotrienols by hplc. Department of Food and Environmental Sciences, University of Helsinki, Finland. <http://lipidlibrary.aocs.org/topics/tocopherols/index.htm>
- Lattanzio, V. 2003. Bioactive polyphenols: their role in quality and storability of fruit and vegetables. *J. Appl. Bot. Food Qua.* 77(5/6), 128-146.
- Lattanzio, V., Di Venere, D., Linsalata, V., Bertolini, P., Ippolito, A., Salerno, M. 2001. Low temperature metabolism of apple phenolics and quiescence of *Phlyctaena vagabunda*. *J. Agric. Food Chem.* 49(12), 5817-5821.
- Lederman, I. E., Zauberman, G., Weksler, A., Rot, I., Fuchs, Y. 1997. Ethylene-forming capacity during cold storage a chilling injury development in Keitt mango fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 10, 107–112.
- Lee, J., Koo, N., Min, D. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compre. Rev. Food Sci. F.* 3(1), 21-33.
- Lee, S., Kader, A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Technol.* 20(3), 207-220.
- Lemoine, M., Chaves, A., Martínez, G.. 2010. Influence of combined hot air and UV-C treatment on the antioxidant system of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica). *LWT-Food Sci. Technol.* 43, 1313-1319.
- Leng, P., Qi, J. 2003. Effect of anthocyanin on David peach (*Prunus davidiana* Franch) under low temperature stress. *Sci. Hort.* 97(1), 27-39.
- Lester, R., Hasan, S. 1991. Origin and domestication of the brinjal eggplant, *Solanum melongena*, from *S. incanum*, in Africa y Asia. En: *Solanaceae* III: Taxonomy, chemistry, evolution. Hawkes, J., Lester; M., Nee, N. (eds.). The Linnean Society of London, London. pp. 369-387.
- Li, H., Tsao, R., Deng, Z. 2012. Factors affecting the antioxidant potential and health benefits of plant foods. *Can. J. Plant Sci.* 92(6), 1101-1111.
- Liao, Y., Sun, B., Sun, G., Liu, H., Li, Z., Li, Zh., Wang, G., Chen, R. 2009. AFLP and SCAR markers associated with peel color in Eggplant (*Solanum melongena*). *Agric. Sci. China.* 8(12): 1466-1474.
- Lin, C., Chang, C. 2005. Textural change y antioxidant properties of broccoli under different cooking treatments. *Food Chem.* 90, 9-15.

- Lin, T., D Durance, T., Scaman, C. 1998. Characterization of vacuum microwave, air y freeze dried carrot slices. *Food Research International*,31(2), 111-117.
- Liu, Z. Y., Jiang, W. B. 2006. Lignin deposition and effect of postharvest treatment on lignification of green asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Growth Reg.* 48, 187-193.
- Lo Scalzo, R. L. O., Fibiani, M., Mennella, G., Rotino, G. L., Dal Sasso, M., Culici, M., Spallino, A., Braga, P.C. 2010. Thermal treatment of eggplant (*Solanum melongena* L.) increases the antioxidant content and the inhibitory effect on human neutrophil burst. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3371-3379.
- Luthria, D., Singh, A.P., Wilson, T., Vorsa, N., Banuelos, G. S., Vinyard, B. T. 2010. Influence of conventional and organic agricultural practices on the phenolic content in eggplant pulp: Plant-to-plant variation. *Food Chem.* 121, 406-411.
- Luthria, D., Sudarsan, M. 2006. Influence of sample preparation on assay of phenolic acids from eggplant. *J. Agric. Food Chem.* 54, 41-47.
- Lyons, J.M. 1973. Chilling Injury in Plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 24: 445-466.
- Ma, C., Whitaker, B.D., Kennelly, E.J., 2010. New 5-O-caffeoylquinic acid derivatives in fruit of the wild eggplant relative *Solanum viarum*. *J. Agric. Food Chem.* 58, 11036-11042.
- Maccarrone, M., D'Andrea, G., Salucci, M., Avigliano, L., Finazzi-Agrò, A. 1993. Temperature, pH and UV irradiation effects on ascorbate oxidase. *Phytochem.* 32(4), 795-798.
- Maestrelli, A., Lo Scalzo, R., Rotino, G., Acciarri, N., Spena, A., Vitelli, G., Bertolo, G. 2003. Freezing effect on some quality parameters of transgenic parthenocarpic eggplants. *J. Food Eng.* 56(2), 285-287.
- Mahmood, S. 2013. The effect of fruit-setting hormones applied at the stage of flowering on the morphological and physiological characteristics of eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit during growth, maturation and storage. Agricultural University of Athens, Laboratory of Vegetable Production, Athens, Greece. <http://hdl.handle.net/10329/5690>.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79,727-747.
- Mangione, J.; Sánchez, M. 1999. Cultivo y manejo poscosecha de berenjena. Área de Inspección de frutas y hortalizas. Laboratorio de Fitopatología. Mercado Central de Buenos Aires. <http://www.mercadocentral.com.ar/site2001/tecnicas/berenjena.zip>

- Martin, C., Zhang, Y., Tonelli, C., Petroni, K. 2013. Plants, diet, and health. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 19-46.
- Massolo, J., Concellón, A., Chaves, A., Vicente, A. 2011. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) delays senescence, maintains quality and reduces browning of non-climacteric eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit. *Postharvest Biol Technol.* 59(1), 10-15.
- Matsubara, K., Kaneyuki, T., Miyake, T., Mori, M. 2005. Antiangiogenic activity of nasunin, an antioxidant anthocyanin, in eggplant peels. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6272-6275.
- Maul, F. Brecht, J. Nunes, MC. 2012. Combinaciones de temperatura-tiempo que inducen los daños por frío en mangos. Reporte final. University of Florida, EEUU. [http://www.mango.org/sites/default/files/download/Reporte\\_Danos\\_por\\_Frio\\_Final.pdf](http://www.mango.org/sites/default/files/download/Reporte_Danos_por_Frio_Final.pdf)
- Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry.* 67(21), 2318-2331.
- Mazza, G., Cacace, J., Kay, C. 2004. Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *J. AOAC Int.* 87, 129-145.
- McInnis, S. M., Emery, D. C., Porter, R., Desikan, R., Hancock, J. T., Hiscock, S. J., 2006. The role of stigma peroxidases in flowering plants: insights from further characterization of a stigma-specific peroxidase (SSP) from *Senecio squalidus* (*Asteraceae*). *J. Exp. Bot.* 57, 1835-1846.
- Mennella, G., Lo Scalzo, R., Fibiani, M., D'Alessandro, A., Francese, G., Toppino, L., Rotino, G. 2012. Chemical and bioactive quality traits during fruit ripening in eggplant (*S. melongena* L.) and allied species. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11821-11831.
- Mennella, G., Rotino, G., Fibiani, M., D'alessandro, A., Francese, G., Toppino, L., Cavallanti, F., Acciarri, N., Lo Scalzo, R. 2010. Characterization of health-related compounds in eggplant (*Solanum melongena* L.) lines derived from introgression of allied species. *J. Agric. Food Chem.* 58(13), 7597-7603.
- Meyer, R. 2011. Antioxidant Activity Measured by Fluorescence: Investigation of Antioxidant and Probe Structure as well as their Mobility and Position. PhD Thesis. School of Engineering and Science, Jacobs University Bremen, Germany.
- Meyer, R., Karol, K., Little, D., Nee, M., Litt, A. 2012. Phylogeographic relationships among Asian eggplants and new perspectives on eggplant domestication. *Mol. Phylogenet. Evol.* 63(3), 685-701.

- Michalak, A. 2006. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish J. Env. Stud.* 15(4).
- Miglio, C., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., Pellegrini, N. 2008. Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 56(1), 139-147.
- Mishra, B., Gautam, S., Sharma, A. 2012. Browning of fresh-cut eggplant: Impact of cutting and storage. *Postharvest Biol Technol* 67, 44–51.
- Mishra, B., Gautam, S., Sharma, A. 2012. Purification and characterization of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (*Solanum melongena*). *Food Chem.* 134, 1855-1861.
- Mishra, B., Gautam, S., Sharma, A. 2013. Free phenolics and polyphenol oxidase (PPO): The factors affecting post-cut browning in eggplant (*Solanum melongena*). *Food Chem.* 139(1), 105-114.
- Mitchell, A., Hong, Y., Koh, E., Barrett, D., Bryant, D., Denison, R., Kaffka, S. 2007. Ten-year comparison of the influence of organic and conventional management practices on the content of flavonoids in tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6154-6159.
- Mohammed, M, Brecht, J. 2003. Immature fruit vegetables. En: *Postharvest physiology and pathology of vegetables*. 2nd edition. Bartz, J., Brecht, J. (eds.). Marcel Dekker, New York. pp. 671-690.
- Moïse, JA., Han, S., Gudynaite-Savitch, L., Johnson, D.A., Miki, BLA. 2005. Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cell. Dev-Pl.* 41, 620-644
- Molinar, R., Trejo, E., Cantwell, M., 1996. The development of chilling injury in three types of eggplants., <http://postharvest.ucdavis.edu/datastorefiles/234-236.pdf>.
- Mondolot, L., La Fisca, P., Buatoris, B., Talansier, E., De Kochko, A., Campa, C., 2006. Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. *Ann. Bot.* 98, 33–40.
- Muñoz-Falcón, J., Prohens, J., Vilanova, S., Nuez, F. 2009. Diversity in commercial varieties and landraces of black eggplants and implications for broadening the breeders' gene pool. *Ann. Appl. Biol.* 154(3), 453-465.
- Muñoz-Falcón, J., Prohens, P., Rodríguez-Burruezo, A., Nuez, F. 2005. Variabilidad en berenjena. *Industria hortícola. Producción de hortaliza. Berenjena.* <http://www.horticom.com/pd/article.php?sid=62338>

- Muñoz-Falcón, J., Prohens, P., Vilanova, S., Nuez, F. 2008. Characterization, diversity, and relationships of the Spanish striped (Listada) eggplants: a model for the enhancement and protection of local heirlooms. *Euphytica* 64:405-419
- Murata, T. 1989. Relation of chilling stress to membrane permeability. In C. Y. Wang (Ed.), *Chilling injury of horticultural crops* (pp. 201–209). Boca Raton, Fla: CRC Press.
- Muthukumarappan, K., Tiwari, B. 2011 Refrigeration and Freezing Preservation of Vegetables. En: *Handbook of vegetables and vegetable processing*. Chapter 12.. Sinha, N; Hui, Y.; Evranuz, E.; Siddiq, M., Ahmed, J. (eds.). John Wiley & Sons. USA. pp. 259-277
- Nakatani, N., Kayano, S., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K., Mitani, T. 2000. Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (*Prunus domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.* 48(11), 5512-5516.
- Neill S., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J.T., 2002b. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1237-1247.
- Neill S., Desikan R., Hancock J., 2002a. Hydrogen peroxide signalling. *Curr. Op. Plant Biol.* 5, 388-395.
- Nicoli, M. C., Anese, M., Parpinel, M. 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 94-100.
- Nicoli, M., Anese, M., Parpinel, M., Franceschi, S., Lericci, C. 1997. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer Letters*, 114(1), 71-74.
- Niggeweg, R., Michael, A. Martin, C. 2004. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat. Biotechnol.* 22(6), 746-754.
- Nisha, P., Abdul Nazar, P., Jayamurthy, P. 2009. A comparative study on antioxidant activities of different varieties of *Solanum melongena*. *Food Chem. Toxicol.*, 47, 2640-2644.
- Noda, Y., Kneyuki, T., Igarashi, K., Mori, A., & Packer, L. 2000. Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels. *Toxicol.* 148(2), 119-123.
- Nothmann, J. 1986. Eggplant. En: *Handbook of fruit set and development*. Monselise, S. (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. pp 145-152.
- Nothmann, J., Rylski, I., Spigelman, M. 1976. Color and variations in color intensity of fruit of eggplant cultivars. *Sci. Hort.* 4, 191-197.

- Obied, H., Allen, M., Bedgood, D., Prenzler, P., Robards, K., Stockmann, R. 2005. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.* 53, 823-837.
- Okmen, B., Sigva, H., Mutlu, S., Doganlar, S., Yemenicioglu, A., Frary, A. 2009. Total antioxidant activity and total phenolic contents in different Turkish eggplant (*Solanum melongena* L.) cultivars. *Int. J. Food Prop.* 12(3), 616-624.
- Oms-Oliu, G., Rojas-Graü, M. A., González, L. A., Varela, P., Soliva-Fortuny, R., Hernando, M., Martín-Belloso, O. 2010. Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. *Postharvest Biol. Technol.* 57, 139-148.
- Onsa, G., Saari, N., Selamat, J., Bakar, J., Sabo Mohammed, A., Bahri, S., 2007. Histochemical localization of polyphenol oxidase and peroxidase from Metroxylon sagu. *Asia Pacific J. Molec. Biol. Biotech.* 15, 91-98.
- Otero, L., Solas, M., Sanz, P., de Elvira, C., Carrasco, J. A. 1998. Contrasting effects of high-pressure-assisted freezing and conventional air-freezing on eggplant tissue microstructure. *Z. Für Leb. – Forsch. A*, 206(5), 338-342.
- Pandey, K., Rizvi, S. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2(5), 270-278.
- Passam, H., Karapanos, I., Alexopoulos, A. 2011. The biological basis of fruit quality. In: Jenks, M.; Bebeli, P. (eds.). In: *Breeding for fruit quality*. First Edition. John Wiley & Sons, Inc. USA. 38p.
- Pellegrini, N., Miglio, C., Del Rio, D., Salvatore, S., Serafini, M., Brighenti, F. 2009. Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *Int. J. Food Sci. Nut.* 60(S2), 12-22.
- Perez-Gilabert, M., García Carmona, F. 2000. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 48(3), 695-700.
- Plazas, M., Andujar, I., Vilanova, S., Hurtado, M., Gramazio, P., Herraiz, F., Prohens, J. 2013b. Breeding for chlorogenic acid content in eggplant: interest and prospects. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 41(1).
- Plazas, M., López-Gresa, M., Vilanova, S., Torres, C., Hurtado, M., Gramazio, P., Andújar, I., Herraiz, F., Belles, J., Prohens, J. 2013a. Diversity and relationships in key traits for functional and apparent quality in a collection of eggplant: fruit phenolics content, antioxidant activity, polyphenol oxidase activity, and browning. *J. Agric. Food Chem.* 61, 8871-8879

- Potters, G., De Gara, L., Asard, H., Horemans, N. 2002. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol. Biochem.* 40(6), 537-548.
- Prohens, J., Blanca, J., Nuez, F. 2005. Morphological and molecular variation in a collection of eggplant from a secondary center of diversity: implications for conservation and breeding. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 130, 54-63.
- Prohens, J., Rodríguez-Burruezo, A., Raigón, M. D., Nuez, F. 2007. Total phenolic concentration and browning susceptibility in a collection of different varietal types and hybrids of eggplant: implications for breeding for higher nutritional quality and reduced browning. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 132(5), 638-646.
- Puig, A., Perez-Munuera, I., Carcel, J., Hernando, I., Garcia-Perez, J. 2012. Moisture loss kinetics and microstructural changes in eggplant (*Solanum melongena* L.) during conventional and ultrasonically assisted convective drying. *Food Bio. Proc.* 90(4), 624-632.
- Purvis, A. 2002. Diphenylamine reduces chilling injury of green bell pepper fruit. *Postharvest Biol Technol.* 25(1), 41-48.
- Qian, C., Mi, H., Zhao, Y., He, Z., Mao, L. 2013. Effect of Maturity Stage on the Gene Expression of Antioxidative Enzymes in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Fruits Under Chilling Stress. *J. Integrat. Agric.* 12 (8), 1495-1500.
- Queiroz, C., Mendes Lopes, M., Fialho, E., Valente-Mesquita, V. 2008. Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. *Food Rev. Int.* 24(4), 361-375.
- Raigón, M. D., Prohens, J., Muñoz-Falcón, J., Nuez, F. 2008. Comparison of eggplant landraces and commercial varieties for fruit content of phenolics, minerals, dry matter and protein. *J Food Comp. Anal.* 21(5), 370-376.
- Raigón, M. D., Rodríguez-Burruezo, A., Prohens, J. 2010. Effects of organic and conventional cultivation methods on composition of eggplant fruits. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6833–6840.
- Raju, P., Chauhan, O., Bawa, A. 2011. Postharvest Handling Systems and Storage of Vegetables. En: *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*, Sinha, N. (ed.), Wiley-Blackwell, pag: 185-197.
- Ravichandran, K., Ahmed, A. R., Knorr, D., Smetanska, I. 2012. The effect of different processing methods on phenolic acid content and antioxidant activity of red beet. *Food Res. Int.* 48, 16-20.

- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2(4), 152-159.
- Richard-Forget, F., Gaillard, F. 1997. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.* 45(7), 2472-2476.
- Rickman, J. C., Barrett, D. M., Bruhn, C. M. 2007. Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C, B and phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 87, 930-944.
- Robbins, R. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2886–2887.
- Rodriguez, S., López, B., Chaves, A. 1999. Changes in polyamines and ethylene during the development and ripening of eggplant fruits (*Solanum melongena*). *J. Agric. Food Chem.* 47, 1431-1434.
- Rodriguez, S., López, B., Chaves, A. 2001. Effect of different treatments on the evolution of polyamines during refrigerated storage of eggplants. *J. Agric. Food Chem.* 49(10), 4700-4705.
- Rodriguez-Amaya, DB. 1997. Carotenoids and food preparation: The retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, y stored foods. U.A. Agency for International Development, John Snow, Inc/OMNI Project.
- Rogiers, S., Kumar, G., Knowles, N., 1998. Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are accompanied by increasing oxidative stress. *Ann. Bot.* 81, 203-211.
- Russo, P., Adiletta, G., Di Matteo, M. 2013. The influence of drying air temperature on the physical properties of dried and rehydrated eggplant. *Food Bioprod. Process.* 91(3), 249-256.
- Sablani, S. 2006. Drying of fruits and vegetables: retention of nutritional/functional quality. *Dry. Technol.* 24:123-135
- Sahlin, E., Savage, G. P., Lister, C. E. 2004. Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *J. Food Compos. Anal.* 17, 635–647.
- Sakamura, S., Watanabe, S., Obata, Y. 1965. Anthocyanase and Anthocyanin Occurring in Eggplant (*Solanum Melangena* L.) Part III. Oxidative Decolorization of the Anthocyanin by Polyphenol Oxidase. *Agric. Biol. Chem.* 29(3), 181-190.

- Salisbury, F., Ross, C. 1994. Fisiología vegetal. Grupo editorial Iberoamericana, México. pp. 356-358.
- Saltveit, M. 2003. Is it possible to find an optimal controlled atmosphere? *Postharvest Biol Technol.* 27, 3-13.
- Salveit, M. 2004. Respiratory metabolism. The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks. *Agriculture Handbook Number 66.* <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/019respiration.pdf>
- San José, R., Sánchez, M., Cámara, M., Prohens, J. 2013. Composition of eggplant cultivars of the Occidental type and implications for the improvement of nutritional and functional quality. *Int. J. Food Sci. Technol.* 48(12), 2490-2499.
- Sánchez-Mata, M., Yokoyama, W., Hong, Y., Prohens, J. 2010. Solasonine and solamargine contents of gboma (*Solanum macrocarpon* L.) and scarlet (*Solanum aethiopicum* L.) eggplants. *J. Agric. Food Chem.* 58(9), 5502-5508.
- Sánchez-Mata, M., Cámara-Hurtado, M., Díez-Marqués, C., Torija-Isasa, M. 2000. Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Eur. Food Res. Technol.* 210(3), 220-225.
- Santacatalina, J., Ozuna, C., Carcel, J., Garcia-Perez, J., Mulet, A. 2011. Quality assessment of dried eggplant using different drying methods: hot air drying, vacuum freeze drying and atmospheric freeze drying. En: *Proceeding of 11th International Congress on Engineering and Food.* <http://www.icef11.org/content/papers/aft/aft870.pdf>
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, Iseki, K. 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm.* 403(1), 136-138.
- Sawa, T., Nakao, M., Akaike, T., Ono, K., Maeda, H. 1999. Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 47(2), 397-402.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005; 45:287-306.
- Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D. 2001. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 36566-36574.

- Schreiner, M., Huyskens-Keil, S. 2006. Phytochemicals in fruit and vegetables: health promotion and postharvest elicitors. *Crit Rev Plant Sci.* 25(3), 267-278.
- Sekara, A.; Cebula, S.; Kunicki, E. 2007. Cultivated eggplants - origin, breeding objectives y genetic resources, a review. *Folia Hort.* 19, 97-114.
- Serrano, M., Martínez-Madrid, M., Pretel, M., Riquelme, F., Romojaro, F. 1997. Modified atmosphere packaging minimizes increases in putrescine and abscisic acid levels caused by chilling injury in pepper fruit. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1668-1672.
- Sharma, M., Buettner, G. 1993. Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: an ESR study. *Free Radical Biol Med.* 14(6), 649-653.
- Shin, Y., Ryu, J., Liu, R., Nock, J., Watkins, C. 2008. Harvest maturity, storage temperature and relative humidity affect fruit quality, antioxidant contents and activity, and inhibition of cell proliferation of strawberry fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 49(2), 201-209.
- Shingh, A., Luthria, D., Wilson, T., Vorsa, N., Singh, V., Banuelos, G., Pasakdee, S. 2009. Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp. *Food Chem.* 114, 955-961.
- Shofian, N., Hamid, A., Osman, A., Saari, N., Anwar, F., Pak Dek, M., Hairuddin, M. 2011. Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. *Int. J. Mol. Sci.* 12(7), 4678-4692.
- Siller-Cepeda, J. 2004. Postharvest eggplant. *Postharvest physiology and technology laboratory, CIAD. México. USDA Agriculture Handbook.*  
<http://www.agrifoodgateway.com/es/articles/postharvest-eggplant>
- Singh, A., Luthria, D., Wilson, T., Vorsa, N., Singh, V., Banuelos, G., Pasakdee S. 2009. Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp. *Food Chem.*, 114: 955-961.
- Singh, J., Upadhyay, A., Prasad, K., Bahadur, A., Rai, M. 2007. Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *J. Food Comp. Anal.* 20, 106-112.
- Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 299, 152-178.
- Sivakumar, D., Van Deventer, F., Terry, L.A., Polenta, G.A., Korsten, .L. 2012. Combination of 1-methylcyclopropene treatment and controlled atmosphere storage retains overall fruit quality and bioactive compounds in mango. *J. Sci. Food Agric.* 92, 821-830.

- Sonnante, G., D'Amore, R., Blanco, E., Pierri, C., De Palma, M., Luo, J., Martin, C. 2010. Novel hydroxycinnamoyl-coenzyme A quinate transferase genes from artichoke are involved in the synthesis of chlorogenic acid. *Plant Physiol.*, 153(3), 1224-1238.
- Speek, A., Speek-Saichua, S., Schreurs, W. 1988. Total carotenoid and  $\beta$ -carotene contents of Thai vegetables y the effect of processing. *Food Chem.* 27, 245-257.
- Stahl, W., Sies, H. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Asp. Med.* 24, 345-351.
- Stanner, S., Hughes, J., Kelly, C., Buttriss, J. 2004. A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. *Public Health Nutr.* 7(3):407-22.
- Stommel, J., Whitaker, B. 2003. Phenolic acid content and composition of eggplant fruit in a germplasm core subset. *J Am. Soc. Hortic. Sci.* 128: 704-710.
- Sudheesh, S., Presannakumar, G., Vijayakumar, S., Vijayalakshmi, N. 1997. Hypolipidemic effect of flavonoids from *Solanum melongena*. *Plant Foods Hum. Nutr.* 51, 321-330.
- Suslow, T., Cantwell, M. 2012. Tomate: (Jitomate): Recomendaciones para mantener la calidad postcosecha. Indicadores básicos en español. Department of Vegetable Crops, University of California, Davis. [http://postharvest.ucdavis.edu/Hortalizas/Tomate\\_\\_Jitomate/](http://postharvest.ucdavis.edu/Hortalizas/Tomate__Jitomate/)
- Taiz, L., Zeiger, E. 2006. Secondary Metabolites and Plant Defense. *Plant Physiology*, Fourth Edition En: Taiz, L. and Zeiger, E (eds). Sinauer Associates, Inc.
- Thimann, K. 1980. Senescence in Plants. 288 p. CRC Series in Aging . C R C Press LLC.
- Thompson, JL; Manore, M.; Vaughan, L. 2010. The Science of Nutrition, 2nd edition, Chapter 10. pp. 49-95. Benjamin Cummings.
- Tiwari, A., Jadon, R. S., Tiwari, P., Nayak, S. 2011. Phytochemical Investigations of Crown of *Solanum melongena* fruit. *International Journal of Phytomed.* 1.
- Todaro, A., Cimino, F., Rapisarda, P., Catalano, A., Barbagallo, R., Spagna, G. 2009. Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chem.* 114, 434-439.
- Toivonen, P. 2011. Postharvest Physiology of Vegetables. En: *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*, Sinha, N. (ed.), Wiley-Blackwell. pp. 199-215.
- Tomás-Barberán, F., Espin, J. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agr.* 1(9), 853-876.

- Tomás-Barberán, F., Ferreres, F., Gil, M. 2000. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 23, 739-795.
- Turkmen, N., Poyrazoglu, E. S., Sari, F., Velioglu, Y. S. 2005. Effects of cooking methods on chlorophylls, pheophytins and colour of selected green vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41, 281-288.
- Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y. 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chem.* 93(4), 713-718.
- Uzun, S. 2008. Effect of light and temperature on the phenology and maturation of the fruit of eggplant (*Solanum melongena*) grown in greenhouses. *New Zeal. J. Crop. Hort.* 35:1, 51-59.
- Vermerris, W., Nicholson, R. 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer. 276p.
- Vicente, A., Manganaris, G., Sozzi, G., Crisosto, C. 2009. Nutritional quality of fruits and vegetables. En: *Postharvest handling: a system approach*. Florkowski, W., Prussia, S., Shewfelt, R., Brueckner, B. (Eds.). Academic Press. pp 58-105.
- Vicente, A., Ortugno, C., Powell, A., Greve, L., Labavitch J. 2007. Temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits. 1. Analysis of raspberry (*Rubus idaeus*). *J. Agric. Food Chem.* 55, 4119, 4124.
- Vilanova, S., Manzur, J., Prohens, J. 2012. Development and characterization of genomic simple sequence repeat markers in eggplant and their application to the study of diversity and relationships in a collection of different cultivar types and origins. *Mol. Breed.* 30(2), 647-660.
- Wang, C. 1994. Chilling injury of tropical horticultural commodities. *Hort. Sci.* 29(9), 986-987.
- Wang, S., Lin, H. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 48(2), 140-146.
- Whitaker, B., Stommel, J. 2003. Distribution of hydroxycinnamic acid conjugates in fruit of commercial eggplant (*Solanum melongena* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 51(11), 3448-3454.
- White, P. 2002. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *Journal of Experimental Botany* 53, no. 377.
- Wills, R., McGlasson, B., Graham, D., Joyce, D. 1998. *Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales*. 2th edn. Acribia, Zaragoza.

- Witzell, J.; Shevtsova, A. 2004. Nitrogen-induced changes in phenolics of *Vaccinium myrtillus* implications for interaction with a parasitic fungus. *J. Chem. Ecol.* 2004, 30, 1937-1956.
- Wu Z, Wang, H., Li, S. 2004. Advices and considerations to actuality of vegetables exports in China. *Chin. Agric. Sci. Bul.* 20(3):277-280.
- Wu, L., Ogawa, Y., Tagawa, A. 2008. Electrical impedance spectroscopy analysis of eggplant pulp and effects of drying and freezing-thawing treatments on its impedance characteristics. *J. Food Eng.* 87(2), 274-280.
- Wu, S., Meyer, R., Whitaker, B., Litt, A., Kennelly, E. 2013. A new liquid chromatography-mass spectrometry-based strategy to integrate chemistry, morphology, and evolution of eggplant (*Solanum*) species. *J. Chrom.* 1314, 154-172.
- Wu, X., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior R. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4026–4037.
- Wu, X., Prior, R. 2005. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, y grains. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3101-3113.
- Yang, S., Pratt, H. 1978. The physiology of ethylene in wounded plant tissue. En: *Biochemistry of wounded plant tissues*. Kahl, G. (ed). Berlin, Walter de Gruyter. pp.595-622.
- Yemm, E.W., Willis, A.J., 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* 57, 508–514.
- Zhang, D., Hamauzu, Y. 2004. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids y antioxidant activity of broccoli y their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chem.* 88, 503-509.
- Zhang, M., Chen, D. 2006. Effects of low temperature soaking on color and texture of green eggplants. *J. Food Eng.* 74(1), 54-59.