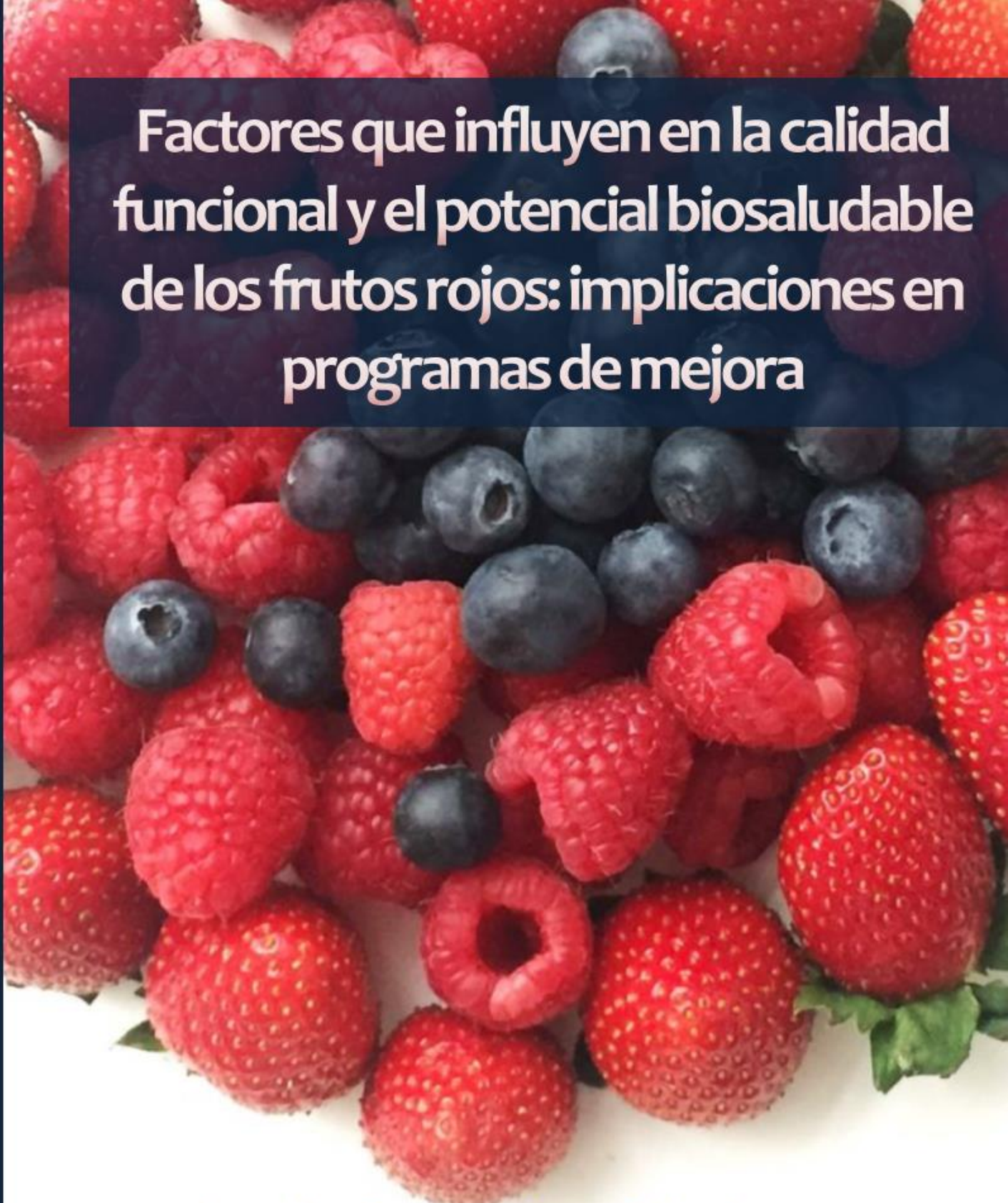


Factores que influyen en la calidad funcional y el potencial biosaludable de los frutos rojos: implicaciones en programas de mejora



Lucía Cervantes Cárdenas

Málaga, 2021

Directoras:

María Teresa Ariza Fernández · Elsa Martínez Ferri

**Programa de Doctorado de Biotecnología Avanzada
Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga**



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
**CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA,
PESCA Y DESARROLLO SOSTENIBLE**

FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

Factores que influyen en la calidad funcional y el potencial biosaludable de los frutos rojos: implicaciones en programas de mejora

Memoria de tesis Doctoral presentada por la licenciada en Biología

Lucía Cervantes Cárdenas

Para optar al grado de

Doctora en Biología por la Universidad de Málaga

Directoras:

Dra. María Teresa Ariza Fernández

Dra. Elsa Martínez Ferri

IFAPA Centro de Málaga


Málaga, diciembre de 2020





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Lucía Cervantes Cárdenas

 <https://orcid.org/0000-0002-2720-7138>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña LUCIA CERVANTES CARDENAS

Estudiante del programa de doctorado BIOTECNOLOGIA AVANZADA de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD FUNCIONAL Y EL POTENCIAL BIOSALUDABLE DE LOS FRUTOS ROJOS: IMPLICACIONES EN PROGRAMAS DE MEJORA

Realizada bajo la tutorización de ELSA MARTINEZ FERRI y dirección de MARIA TERESA ARIZA FERNANDEZ Y ELSA MARTINEZ FERRI (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 23 de JULIO de 2020

Fdo.: LUCIA CERVANTES CARDENAS



EFQM AENOR



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.
29071
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10
E-mail: doctorado@uma.es



María Teresa Ariza Fernández, doctora en CC Biológicas e investigadora contratada del IFAPA Centro de Málaga, y **Elsa Martínez Ferri**, doctora en CC Biológicas e investigadora titular del mismo instituto.

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada “**Factores que influyen en la calidad funcional y el potencial biosaludable de frutos rojos: implicaciones en programas de mejora**” que presenta la licenciada en Biología, Lucía Cervantes Cárdenas, para optar al grado de doctora en Biología, ha sido realizada bajo su dirección.

Y para que así conste y tenga los efectos que correspondan en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente escrito en Málaga a diciembre de 2020.

Fdo.: María Teresa Ariza Fernández

Fdo.: Elsa Martínez Ferri

Elsa Martínez Ferri, investigador titular del IFAPA Centro de Málaga, como profesora adscrita al Programa de Doctorado de Biotecnología Avanzada de la Universidad de Málaga,

RATIFICA:

Que la tesis doctoral titulada “**Factores que influyen en la calidad funcional y el potencial biosaludable de los frutos rojos: implicaciones en programas de mejora**” ha sido realizada por Lucía Cervantes Cárdenas, licenciada en Biología, para optar al título de Doctora en Biología, bajo la dirección de las doctoras María Teresa Ariza Fernández y Elsa Martínez Ferri, investigadoras del IFAPA Centro de Málaga.

Dicha tesis se presenta por el programa de doctorado de Biotecnología Avanzada de la Universidad de Málaga y cumple los requisitos para optar a la Mención de Doctor Internacional.

Y para que así conste y tenga los efectos que correspondan en cumplimiento de la legislación vigente, firmo el presente escrito en Málaga a diciembre de 2020.

Fdo.: Elsa Martínez Ferri

Tutora de la Tesis

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el centro IFAPA Málaga, y dirigida por las Dras. María Teresa Ariza Fernández y Elsa Martínez Ferri pertenecientes a las Áreas Temáticas de Genómica y Biotecnología, y Agricultura y Medioambiente, respectivamente.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida del MINECO bajo el título “Ayudas para la promoción de empleo Joven e Implantación del Sistema de Garantía Juvenil en I +D+ I”, desde junio de 2016 hasta mayo de 2018, así como al proyecto AVA201601.10 que financió un contrato desde agosto de 2018 hasta diciembre de 2018. Asimismo, este trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos sectoriales TRA201600.5 y AVA2019.034.

Por otra parte, durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se concedió una ayuda para una estancia predoctoral encaminada a la obtención de la mención internacional de doctorado en el marco del I Plan Propio de Investigación y Docencia de la Universidad de Málaga, en la convocatoria de 2018. Dicha estancia se realizó en la Universidad Politécnica de La Marche (Ancona, Italia), bajo la supervisión del Dr. Bruno Mezzetti, en los meses de enero a mayo de 2019.

Todo el trabajo desarrollado en este periodo ha derivado en las siguientes publicaciones científicas:

Artículos ISI:

Cervantes, L., Ariza, M.T., Miranda, L., Medina, J.J., Soria, C., & Martínez-Ferri, E. (2020).

Stability of fruit quality traits of different strawberry varieties under variable environmental conditions. *Agronomy*, 10, 1242. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091242>

Cervantes, L., Martínez-Ferri, E., Soria, C., Ariza, M.T. (2020). Bioavailability of phenolic

compounds in strawberry, raspberry and blueberry: Insights for breeding programs. *Food Bioscience*, 37, 100680. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100680>

Cervantes, L., Martínez-Ferri, E., Carrera, M., Soria, C., Ariza, M.T. (2019). Effectiveness of different depuration procedures in removing reagents interference on *in vitro* digested

strawberry extracts for reliable antioxidant determinations. *Journal of Berry Research*, 9 (2019) 473–481. <https://doi.org/10.3233/JBR-190385>

Cervantes, L., Ariza, M.T., Gómez-Mora, J.A., Miranda, L., Medina, J.J., Soria, C., Martínez-Ferri, E. (2019). Light exposure affects fruit quality in different strawberry cultivars under field conditions. *Scientia Horticulturae*, 252, 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.058>

Ariza, M.T., Forbes-Hernández, T.Y., Reboredo-Rodríguez, P., Afrin, S., Gasparrini, M., **Cervantes, L.**, Soria, C., Martínez-Ferri, E., Battino, M., Giampieri, F. (2018). Strawberry and achenes hydroalcoholic extracts and their digested fractions efficiently counteract the AAPH-Induced oxidative damage in HepG2 cells. *International Journal of Molecular Science*, 19(8), 2180. <https://doi.org/10.3390/ijms19082180>

Ariza, M.T., Reboredo-Rodríguez, P., **Cervantes, L.**, Soria, C., Martínez-Ferri, E., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Battino, M., Simal-Gándara, J. (2018). Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. *Food Chemistry*, 248, 155-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.105>

Publicaciones Divulgativas:

Cervantes, L., Martínez-Ferri, E., Soria, C., Carrera, M., Ariza, M.T. (2018). Estudio del efecto de la digestión sobre la capacidad antioxidante de 5 variedades de fresa cultivadas en Huelva. *Agrícola Vergel*, 414, 359-361.

Cervantes, L., Soria, C., Martínez-Ferri, E., Medina, J.J., Miranda, L., Gómez-Mora, J.A., Villalba, R., Carrera, M., Ariza, M.T. (2018). Análisis de la calidad funcional de doce variedades de fresa: Diferencias entre variedades en la cantidad y tipo de antioxidantes en la campaña 2018. *Vida Rural*, 455, 38-44.

Cervantes, L., Martínez-Ferri, E., Soria, C., Medina, J.J., Reboredo-Rodríguez, P., Ariza, M.T. (2017). Determinación de compuestos antioxidantes en fresa potencialmente bioactivos para su uso en programas de mejora. Actas de Horticultura n.º 77 SECH: Producción sostenible de hortalizas y fresón para una alimentación saludable, 25-32.

Cervantes, L., Soria, C., Martínez-Ferri, E., Reboredo-Rodríguez, P., Miranda, L., Medina-Mínguez, J.J., Gómez-Mora, J.A., Villalba, R., Ariza, M.T. (2017). Estudio de la Calidad Funcional en Doce Variedades de Fresa. Vida Rural, 438, 30-35.

Ariza, M.T., **Cervantes, L.,** Martínez-Ferri, E., Soria, C., Medina, J.J., Reboredo-Rodríguez, P. (2017). Caracterización de la Biodisponibilidad de Compuestos Antioxidantes en dos Variedades de Fresa. Campaña 2017. SERVIFAPA. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, 2017. 1-14 p. Formato digital. (Genómica y Biotecnología).

Ariza, M.T., **Cervantes, L.,** Martínez-Ferri, E., Soria, C., Villalba, R., Medina, J.J., Miranda, L. (2017). Caracterización de Compuestos Funcionales en Distintas Variedades de Fresa. SERVIFAPA. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, 2017. 1-19 p. Formato digital. (Genómica y Biotecnología).

Ariza, M.T., **Cervantes, L.,** Martínez-Ferri, E., Soria, C., Reboredo-Rodríguez, P., Medina, J.J. (2017). Los Aquenios de la Fresa como Fuente de Antioxidantes y su Uso Potencial en Programas de Mejora. SERVIFAPA. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, 2017. 1-10 p. Formato digital. (Genómica y Biotecnología).

Ariza, M.T., **Cervantes, L.,** Martínez-Ferri, E., Soria, C., Medina, J.J. (2017). Determinación De La Biodisponibilidad De Los Compuestos Antioxidantes De La Fresa Para Su Uso En Programas De Mejora. SERVIFAPA. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, 2017. 10 pp. Formato digital (e-book) – (Genómica y Biotecnología).

Participación y comunicaciones a Congresos:

Cervantes, L., Martínez-Ferri, E., Soria, C., Carrera, M., Medina-Mínguez, J.J., Miranda, L., Ariza, M.T. (2019). El potencial biosaludable como diana de selección de variedades de fresa en programas de mejora. Actas de Horticultura nº 83 SECH: XV Jornadas del grupo de Horticultura, IV Jornadas del grupo de Fresón y otros Frutos Rojos, III Jornadas del grupo de Alimentación y Salud, 44-48. Valladolid, España, 21-22/5/2019

Cervantes, L., Martínez-Ferri, E., Soria, C., Carrera, M., Ariza, M.T. (2018). Potencial biosaludable de distintas variedades de fresa para su uso en programas de mejora. I Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias. Almería, España, 20/12/2018

Cervantes, L., Martínez-Ferri, E., Soria, C., Carrera, M., Ariza, M.T. (2018). Nuevos indicadores de fruto saludable de fresa para la selección de parentales en programas de mejora. Actas de Horticultura nº 80 SECH: IX Congreso de Mejora genética de plantas, 175-178. Murcia, España, 09/2018

Ariza, M.T., Reboredo-Rodríguez, P., Forbes-Hernández, T.Y., Giampieri, F., Afrin, S., Gasparri, M., Cianciosi, D., Verela-López, A., **Cervantes, L.,** Soria, C., Martínez-Ferri, E., Battino, M. (2017). Strawberry fruits and achenes protect HepG2 cells against AAPH-induced oxidative stress. 15th Euro Fed Lipid Congress: oil, fats and lipids. Book of abstracts, 376. Uppsala, Sweden, 27 – 30/08/2017.

Cervantes, L., Martínez-Ferri, E., Soria, C., Medina-Mínguez, J.J., Reboredo-Rodríguez, P., Ariza, M.T. (2017). Determinación de compuestos antioxidantes en fresa potencialmente bioactivos para su uso en programas de mejora. XIV Jornadas del Grupo de Horticultura, II Jornadas del Grupo de Alimentación y Salud y III Jornadas de Fresón. SECH. Libro de Resúmenes, 9. SECH-Cajamar. Almería, Spain, 21-23/02/2017.

*A mi abuela Ofe,
la persona con más amor
a las plantas que he conocido.*

...Sentaros ante los hechos como un niño pequeño, estad preparados para abandonar cualquier idea preconcebida, id humildemente a dondequiera y cualesquiera abismos a los que os guíe la naturaleza o no aprenderéis nada.

Thomas Henry Huxley

(1825 – 1895)

Agradecimientos

En primer lugar, no me creo que haya llegado este momento. Si bien es cierto que esta tesis ha sido relativamente rápida, el sentimiento de tesista venía de mucho antes, por lo que para mí es un logro personal haber llegado hasta aquí.

A mis directoras de tesis Mayte y Elsa les debo en primer lugar la oportunidad que me dieron de poder realizar este proyecto y plasmarlo en una tesis. Les debo mucho más de lo que se expresar, y siempre recordaré con mucho cariño las tardes escribiendo o discutiendo artículos las tres en el despacho, porque han sido los momentos en los que más he aprendido. En todo este tiempo se han volcado conmigo, facilitándome recursos, dedicándome gran parte de su tiempo, y guiándome en todas las fases del proceso. Además de la implicación profesional, quiero resaltar la implicación personal que han tenido conmigo, y las facilidades que me han dado siempre, incluso cuando dudo que las mereciera.

A todo el personal del IFAPA de Churriana, tanto el personal de campo, como el de laboratorio y administración. Gracias por la ayuda y las palabras de ánimo. Cada uno de vosotros me ha enseñado algo y eso hace que mi tiempo en Málaga haya sido tan enriquecedor. En especial a las compañeras de laboratorio Adela, Amalia, Ana y Marta; y a mi Pepillo que vale su peso en oro. A Carmen Soria quiero agradecerle la positividad y la implicación que siempre ha mostrado conmigo. Al personal de la estación experimental del IFAPA 'El Cebollar' también quiero agradecer toda su labor con la parte agronómica de los ensayos y la recolección de los frutos, sin la cual esta tesis no sería posible.

A mi eterno compañero de fatigas, Guillermo, un placer repetir contigo. El ying y el yang nunca ha funcionado tan bien como nosotros trabajando juntos.

Me gustaría dar las gracias a mi familia, que ha estado siempre presente para apoyarme, escucharme y comprenderme. Muchas gracias, Mamá, Papá y Peri por haber sido mi refugio todos estos años. Se que os vais a alegrar tanto como yo de haber conseguido este logro.

De esta tesis, una buena parte se la debo a Vero. Ella es la que ha compartido conmigo las alegrías y las penas día a día, y sin ella probablemente no habría conseguido acabarla. Gracias por ponerme las cosas tan fáciles siempre. Estas líneas no hacen justicia por todo lo que has hecho por mí.

A mis amigas de toda la vida Cris, Milo y Julia, que sois como mis hermanas, a pesar de vernos tan poco, disfruto cada café o cerveza que nos tomamos como si fueran un tesoro.

No puedo dejar de nombrar a mis amigos de la carrera, que han creído en mí mucho más que yo. Ire, Inela, Lauri, Alvarito, ¡Sois los mejores!. Vaya quinteto de doctores estamos hechos, nunca lo hubiera imaginado cuando estábamos en el césped de la facultad esperando para entrar en las prácticas y discutiendo sobre todo lo discutible. Por supuesto tampoco quiero olvidarme del otro grupo de biólogos que me han ayudado a crecer como persona y a apoyarme en los malos momentos: muchas gracias JD, Patri, Sandra, María, Marta, Lucía, Cire y Marina. También quiero dar las gracias a mis amigos del Máster por los buenos ratos y el apoyo en los comienzos, y también la paciencia y el cariño en todos estos años, en especial a Paloma, Davidde, África, David, Pamper, los Rafas y Fran; Aunque estemos dispersos por España y el extranjero os tengo siempre presentes.

También tengo que agradecer mucho a otras personas que me ayudaron en un momento anterior, las profesoras del Depto. de Fisiología Animal de la Universidad de Sevilla, porque fueron lo mejor de mi etapa allí. Gracias a Bea, Sara y Espe. Aún me acuerdo de los almuerzos en el comedor. No me olvido de Camilo, que me cuidó como un gran compañero y un amigo.

Para finalizar, quiero agradecer especialmente a todo el laboratorio del Profesor Bruno Mezzetti por acogerme de tan buen grado y tratarme en todo momento como a una más del grupo. Todo ello hizo que disfrutara enormemente mi tiempo en Ancona. En especial agradecer a Luca por tratarme como a alguien de su familia, y junto con Silvia y Andrea por compartir tanto su conocimiento científico como su tiempo de ocio conmigo. A Francesca y a Angela quiero agradecerles también por todo lo que me enseñaron en el laboratorio y en especial por las charlas diarias de sobremesa.

Índice general

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	6
1. Introducción y Objetivos.....	9
1.1. Importancia socioeconómica del cultivo de los frutos rojos.....	11
1.2. Características de los sistemas convencionales de cultivo de los frutos rojos en Huelva.....	13
1.3. Efectos beneficiosos de los frutos rojos para la salud.....	20
1.3.1. Principales compuestos bioactivos.....	22
1.3.2. Acción detoxificadora de los compuestos bioactivos.....	25
1.4. Factores que afectan a la calidad de los frutos rojos.....	27
1.4.1. Variabilidad genotípica.....	28
1.4.2. Efecto ambiental sobre la variabilidad de los compuestos funcionales.....	31
1.5. Calidad funcional y potencial biosaludable.....	33
1.6. Objetivos.....	35
2. Análisis de la estabilidad de la calidad organoléptica y funcional de los frutos de distintas variedades de fresa ante la variación de las condiciones ambientales: <i>Stability of fruit quality traits of different strawberry varieties under variable environmental conditions in the field.....</i>	37
Abstract.....	39
2.1. Introduction.....	40
2.2. Materials and Methods.....	42
2.2.1. Plant material and experimental design.....	42
2.2.2. Fruit quality analysis.....	43
2.2.3. Statistical analysis.....	46
2.3. Results and Discussion.....	47
2.4. Conclusions.....	59
3. Efecto del nivel de exposición a la luz de los frutos sobre su calidad funcional en distintas variedades de fresa: <i>Light exposure affects fruit quality in different strawberry cultivars under field conditions.....</i>	61
Abstract.....	63
3.1. Introduction.....	64
3.2. Materials and Methods.....	66
3.2.1. Plant material and experimental conditions.....	66
3.2.2. Plant development and fruit light conditions.....	67

3.2.3. Fruit quality determinations.....	68
3.2.4. Statistical análisis.....	69
3.3. Results and Discussion.....	70
3.3.1. Factors influencing light exposure of strawberry fruits.....	70
3.3.2. Effects of light exposure on fruit quality of different cultivars	73
Conclusions.....	79
4. Evaluación de la interferencia de los reactivos de la digestión <i>in vitro</i> en la cuantificación de los compuestos antioxidantes: consideraciones metodológicas para su uso como método de aproximación al estudio <i>in vivo</i> :	
<i>Effetiveness of different depuration procedures in removing reagents interference on in vitro digested strawberry extracts for reliable antioxidaqnt determinations.....</i>	81
Abstract.....	83
4.1. Introduction.....	84
4.2. Materials and Methods.....	85
4.2.1. Experimental design and plant material.....	85
4.2.2. <i>In vitro</i> digestion process.....	85
4.2.3. Depuration assay.....	86
4.2.4. Spectrophotometric determination of total phenols, flavonoids, anthocyanins and antioxidant capacity.....	87
4.2.5. Calculations and statistical analysis.....	88
4.3. Results and Discussion.....	88
4.3.1. Interference of reagents on spectrophotometric antioxidant determination after <i>in vitro</i> digestion.....	89
4.3.2. Effectiveness of depuration procedures in removing reagent signal after <i>in vitro</i> digestion.....	91
4.3.3. Effectiveness of depuration procedures for recovering fruit antioxidants after <i>in vitro</i> digestion.....	93
4.4. Conclusions.....	94
5. Análisis interespecífico de la biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes en distintos frutos rojos:	
<i>Bioavailability of phenolic compounds in strawberry, raspberry and blueberry: Insights for breeding programs</i>	95
Abstract.....	97
5.1. Introduction.....	98
5.2. Materials and Methods.....	100
5.2.1. Plant material and experimental design.....	100
5.2.2. Preparation of antioxidant extracts from berry fruits	101

5.2.3. Determination of phenolic compounds.....	104
5.2.4. Statistical analysis.....	108
5.3. Results and Discussion.....	108
5.3.1. Phenolic composition of raw fruits from different berries.....	108
5.3.2. Phenolic composition of digested berries.....	114
5.3.3. Relationship between total bioavailability and antioxidant capacity of digested berry fruits.	119
5.4. Conclusions.....	120
6. Análisis intraespecífico de la biodisponibilidad y bioactividad de los compuestos antioxidantes en distintas variedades de fresa:	
<i>Bioavailability and bioactivity of strawberry antioxidant compounds: intraspecific analysis</i>	123
6.1. Introduction.....	125
6.2. Materials and Methods.....	127
6.2.1. Plant material and experimental design.....	127
6.2.2. Preparation of antioxidant extracts from berry fruits	128
6.2.3. Determination of phenolic compounds.....	130
6.2.4. Bioactivity assay of the strawberry digested extracts	133
6.2.5. Statistical analysis.....	135
6.3. Results and Discussion.....	135
6.3.1. Polyphenol composition and antioxidant capacity of strawberry raw fruits.....	135
6.3.2. Polyphenol composition and antioxidant capacity after in vitro digestion.....	138
6.3.3. Comparative quantification of individual compounds and its bioavailability	141
6.3.4. Bioactivity assessment of strawberry on HepG2 cells.....	144
6.4. Conclusions.....	150
7. Contribución de los aquenios a la biodisponibilidad de los antioxidantes del fruto de fresa:	
<i>Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs</i>	153
Abstract.....	155
7.1. Introduction.....	156
7.2. Materials and Methods.....	158
7.2.1. Strawberry material.....	158
7.2.2. Extraction of phenolic compounds from strawberry	158

material.....	
7.2.3. <i>In vitro</i> digestion.....	159
7.2.4. Determination of phenolic compounds.....	160
7.2.5. Statistical analysis.....	164
7.3. Results and Discussion.....	164
7.3.1. Phenolic composition of strawberry whole fruits and achenes.....	166
7.3.2. Phenolic composition of strawberry and achenes after <i>in vitro</i> digestion.....	172
7.3.3. Relationship between phenolic compounds and antioxidant capacity.....	179
7.4. Conclusions.....	180
8. Contribución de los aquenios a la bioactividad de los antioxidantes del fruto de fresa: <i>Strawberry and achenes hydroalcoholic extracts and their digested fractions efficiently counteract the AAPH-Induced oxidative damage in HepG2 cells</i>	183
Abstract	185
8.1. Introduction.....	186
8.2. Materials and Methods.....	187
8.2.1. Preparation of the strawberry and achenes extracts.....	187
8.2.2. Culture of HepG2 cells.....	188
8.2.3. Determination of cell viability.....	188
8.2.4. Evaluation of intracellular ROS production.....	189
8.2.5. Apoptosis quantification.....	190
8.2.6. Statistical analysis.....	191
8.3. Results	191
8.3.1. Effects of strawberry fractions on cell viability.....	192
8.3.2. Effects of strawberry and achenes fractions on intracellular ROS production.....	194
8.3.3. Effects of strawberry and achenes fractions on apoptosis.....	196
8.4. Discussion.....	199
9. Resumen de los resultados.....	201
10. Conclusiones.....	205
11. Bibliografía.....	209
12. Anexos.....	231

Índice de tablas y figuras

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1.1. Variedades de frambuesa más utilizadas en la zona productora de Huelva.	18
Tabla 1.2. Composición nutricional de la fresa, arándano y frambuesa.....	21
Tabla 1.3. Ensayos <i>in vitro</i> más utilizados para cuantificar la capacidad antioxidante de una muestra y su mecanismo de acción.	27
Tabla 1.4. Principales factores que afectan a la biodisponibilidad de los polifenoles en humanos	34
Tabla 2.1. Averaged values of the environmental variables (minimum, maximum and mean daily temperature, relative humidity and incident radiation) measured under the macro-tunnel on the 10 days before fruit sampling on four consecutive years (2012-2015) and at three harvest times (February, March and April).....	48
Tabla 2.2. Inter-annual variation of the organoleptic and functional fruit quality parameters in the 5 strawberry varieties.....	49
Tabla 2.3. Intra-annual variation of the organoleptic and functional fruit quality parameters in the 5 strawberry varieties.....	54
Tabla 2.4. Coefficients of the fitted linear regression models ($Y = aX + \beta$) after stepwise multiple regression between fruit quality parameters (organoleptic and functional) and environmental variables in the 5 varieties studied.....	57
Tabla 3.1. Means (\pm SE) of organoleptic variables (Acidity, SSC and SSC/Acidity; n=9), antioxidant related variables (Total phenolic, flavonoids, anthocyanins, TEAC, FRAP and DPPH; n=6) and plasticity index (n=3) in exposed and non-exposed fruits of the four strawberry cultivars studied.....	76
Tabla 4.1. Total phenolic, flavonoid and anthocyanin content, as well as, antioxidant capacity of digested fractions without strawberry (as a control), employing four different depuration methods.....	90
Tabla 4.2. Total phenolic, flavonoid and anthocyanin content, as well as, antioxidant capacity of digested fractions of ‘Charlene’ strawberry, employing four different depuration methods.....	92
Tabla 5.1. Total phenolic, flavonoid and anthocyanin content and antioxidant capacity of raw fruits and digested fractions from strawberry, raspberry and blueberry.....	109
Tabla 5.2. Composition on phenolic acids and hydrolysable tannins, flavanols, flavonols and anthocyanins of strawberry, raspberry and blueberry raw fruits and digested fractions.....	112
Tabla 6.1. Strawberry varieties in the study and their breeder company.....	128
Tabla 6.2. Total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), total anthocyanin content (TAC) and antioxidant capacity (AC) of raw fruits from twelve	137

commercial strawberry varieties following conventional cropping practices.....	
Tabla 6.3. Simplification of the polyphenol profile (total phenolic content: TPC; total flavonoid content: TFC; total anthocyanin content: TAC; and antioxidant capacity: AC) in raw fruit of 5 selected strawberry varieties.....	138
Tabla 6.4. Comparison of the antioxidant composition of raw fruit extract and of bioavailable fractions (after <i>in vitro</i> digestion process) in five strawberry varieties.....	138
Tabla 6.5. Composition on phenolic acids and hydrolysable tannins, flavanols, flavonols and anthocyanins of two strawberry varieties ('Marquis' and 'Primoris') raw fruits and digested fractions.....	143
Tabla 7.1. Total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), total anthocyanin content (TAC), total tannic acid content (TTAC) and antioxidant capacity (AC) of whole fruits and achenes of 'Camarosa' strawberries before (hydromethanolic extract) and after gastric (GF-In and GF-Out) and intestinal digestion (IF and WF). The contribution of achenes to the figures for whole fruits is also shown.....	165
Tabla 7.2. Comparison the contents in phenolic acids, flavanols, flavonols and anthocyanins of 'Camarosa' whole fruits and achenes before (hydromethanolic extract) and after gastric (GF-In and GF-Out) and intestinal digestion (IF and WF) as determined by HPLC–DAD. The contribution of achenes to the figures for whole fruits is also shown.....	168

Figuras

Figura 1.1. Evolución de la superficie (A) y de la producción (B) mundial de fresa, frambuesa y arándano.	11
Figura 1.2. Evolución de la producción (Tm) y de la superficie de cultivo (ha) en España de fresa (A), frambuesa (B) y arándano (C).	13
Figura 1.3. Cultivo convencional de la fresa en Huelva.....	14
Figura 1.4. Distribución varietal en el cultivo de la fresa en Huelva en la campaña 1998 (A) y 2019 (B) y evolución del número de variedades de fresa con incidencia mayor del 1% en cada campaña desde 1991 a 2019 (C).	16
Figura 1.5. Cultivo convencional de la frambuesa en Huelva.....	17
Figura 1.6. Cultivo convencional del arándano en Huelva.....	19
Figura 1.7. Esquema de clasificación de los compuestos fenólicos.....	23
Figura 1.8. Estructura general del fruto de fresa.....	30
Figura 1.9. Esquema del proceso de digestión.....	33
Figura 2.1. Percentage of organoleptic (Org) and functional (Func) fruit quality parameters showing significant inter- (A) and intra- (B) annual variation ($p<0.05$) in the	59

5 strawberry varieties studied.....	
Figura 3.1. Schematic plot of a raised bed of strawberry plants showing fruits with different light exposure under a plastic macrotunnel.....	65
Figura 3.2. Light incidence (A) and mean temperatures (B) during the experimental period under the plastic macrotunnel (colored arrows indicate sampling dates); and diurnal evolution of light incidence (C) and temperatures (D) in the three sampling dates.....	70
Figura 3.3. Variation in maximum plant diameter (A) and fruit yield per plant (B) throughout the cropping season in the four strawberry cultivars studied.	71
Figura 3.4. Percentage of light exposed fruits (A) and peduncle length (B) in the four strawberry cultivars studied at three sampling dates (Mid-March, End-March and Mid-April).....	72
Figura 5.1. Relative contribution of flavonoids (TFC) and anthocyanins (TAC) to total content of phenolic compounds (TPC) in strawberry, raspberry and blueberry raw fruits (A), total bioaccessible fraction (B) and total bioavailable fraction (C).....	116
Figura 6.1. Intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulation in HepG2 cells determined by the Tali® Image-Based Cytometer.....	146
Figura 6.2. Percentage of live, dead, and apoptotic HepG2 cells determined by the Tali® Image-Based Cytometer.....	148
Figura 7.1. (a) Bioaccessibility (%) and (b) potential bioavailability (%) of phenolic acids, flavanols, flavonols and anthocyanins in ‘Camarosa’ strawberries after <i>in vitro</i> digestion as determined by HPLC–DAD.....	175
Figura 7.2. (a) Bioaccessibility (%) and (b) potential bioavailability (%) of phenolic acids, flavanols, flavonols and anthocyanins in achenes from ‘Camarosa’ strawberries after <i>in vitro</i> digestion as determined by HPLC–DAD.....	176
Figura 7.3. Potential bioavailability/bioaccessibility ratio (%) of phenolic compounds in (a) whole fruits and (b) achenes.....	180
Figura 8.1. Viability of HepG2 determined by the MTT assay. Cells were incubated with different concentrations of AAPH (0–10 mM) at the indicated times.....	192
Figura 8.2. Viability of HepG2 determined by the MTT assay after incubation with different concentrations of (a) Raw fruit; (b) Fruit after gastric digestion; (c) Fruit after intestinal digestion.....	193
Figura 8.3. Viability of HepG2 determined by the MTT assay after incubation with different concentrations of (a) Achene; (b) Achene after gastric digestion; (c) Achene after intestinal digestion.....	194
Figura 8.4. Intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulation in HepG2 cells determined by the Tali® Image-Based Cytometer. Cells were pre-incubated with the	195

indicated fruit fractions and then stressed with AAPH for 24h.....

Figura 8.5. Intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulation in HepG2 cells determined by the Tali® Image-Based Cytometer. Cells were pre-incubated with the indicated achene fractions and then stressed with AAPH for 24h..... 196

Figura 8.6. Percentage of live, dead and apoptotic cells determined by the Tali® Image-Based Cytometer. Cells were pre-incubated with (a) Raw fruit; (b) Fruit after gastric digestion; (c) Fruit after intestinal digestion and then stressed with AAPH for 24h..... 197

Figura 8.7. Percentage of live, dead and apoptotic cells determined by the Tali® Image-Based Cytometer. Cells were pre-incubated with (a) Achene; (b) Achene after gastric digestion; (c) Achene after intestinal digestion and then stressed with AAPH for 24h..... 198

Resumen

Resumen

España es el primer productor de fresa para consumo en fresco de Europa, lo que convierte a Huelva, con el 95% de la producción nacional, en un núcleo fundamental de producción de dicho fruto. La rentabilidad de este sector se está centrando, por un lado, en la innovación y diversificación del cultivo –con las introducciones del cultivo de la frambuesa, el arándano, y más recientemente la mora-, y por otro lado se sustenta en la obtención de frutos de alta calidad organoléptica (frutos apreciados por los sentidos) y funcional (frutos con compuestos beneficiosos para la salud).

Numerosas evidencias científicas muestran que los alimentos ricos en compuestos fenólicos, como los frutos rojos, ejercen efectos beneficiosos en la salud humana. La acción saludable de los frutos rojos parece estar asociada a su alto contenido en antioxidantes; es decir, moléculas que neutralizan radicales libres, relacionados estos últimos con la aparición de enfermedades cardiovasculares, cáncer, etc. Químicamente estos antioxidantes presentes en los frutos pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos, que engloba distintos subgrupos con distintas propiedades y acción antioxidante, todo ello dando lugar a una capacidad antioxidante de los frutos específica.

Todos los resultados descritos en la presente Tesis Doctoral destacan las propiedades presentes en la fresa y otros frutos rojos, fundamentalmente a las que se refieren a la calidad tanto organoléptica como nutracéutica, que les aporta un valor añadido a estos frutos haciéndolos muy deseables para el consumidor, cada vez más interesado en productos con cualidades saludables. Este concepto de calidad no es algo estático, sino que involucra a una gran cantidad de caracteres del fruto los cuales están sujetos a presiones de distinto tipo. Por un lado, los factores externos, como las condiciones climáticas, afectan el cultivo y pueden condicionar el desarrollo y calidad de los frutos, pero además otros factores de naturaleza interna, como el genotipo, también pueden afectar a la calidad final. En relación a esto último, la fresa actualmente es un cultivo multivarietal, representado simultáneamente por diversas variedades,

las cuales pueden provenir de distintos programas de mejoras y, por ello, con distinto pedigree y seguramente seleccionadas en base a distintos atributos. Estos factores internos relacionados con el genotipo hacen que las distintas variedades puedan presentar distintos niveles de los caracteres de calidad de los frutos, todos ellos modulados por la presión ambiental. Esto aún se magnifica más cuando en lugar de hablar de variedades hablamos de distintas especies de frutos rojos, como la frambuesa o el arándano, que además de ser cultivos cada vez más presentes en la región de Huelva, también se caracterizan por la presencia de compuestos fitoquímicos con cualidades saludables.

La incidencia de los factores externos e internos hacen que sea complicado evaluar la calidad de una variedad. Más aún si se tiene en cuenta que para evaluar su potencial saludable no basta sólo con caracterizar los frutos en fresco, sino que es necesario tener en cuenta las transformaciones que se producen durante el proceso de digestión cuando se consumen los frutos. Para ello, se han desarrollado una serie de aproximaciones *in vitro* que simulan las condiciones fisiológicas para establecer las posibles transformaciones de los compuestos del fruto cuando se liberan de la matriz alimentaria, lo que genera la fracción bioaccesible, a partir de la cual los compuestos pueden ser potencialmente absorbidos a través del epitelio gastrointestinal. La fracción finalmente absorbida se denomina fracción biodisponible, capaz de alcanzar la circulación sistémica y, más tarde llegar al sitio específico donde pueda ejercer su acción biológica (bioactividad). Estos resultados han puesto de manifiesto la necesidad de considerar la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos tras la digestión, como estimación del potencial biosaludable de los frutos, en la caracterización de la calidad funcional de los frutos. Sin embargo, determinar el compuesto o grupo de compuestos antioxidantes que dan lugar a dicha bioactividad es un trabajo tedioso, ya que seguramente las propiedades antioxidantes de un extracto no dependen en exclusiva de un grupo de compuestos y seguramente no todos serán de naturaleza fenólica. Por ello, considerando la necesidad de seleccionar un indicador que ponga de manifiesto que matriz alimentaria podría considerar más

saludable y establecida su relación con la bioactividad, se ha señalado a la capacidad antioxidante biodisponible como posible indicador del potencial saludable de una matriz. Así, la selección de este parámetro es muy interesante para caracterizar variedades saludables de cara a los programas de mejora, que persigan la selección de parentales con caracteres saludables así como para los agricultores de cara a seleccionar las futuras variedades que vayan a cultivarse.

Abstract

Spain is the leading producer of strawberry for fresh consumption in Europe, which position the Huelva region, with 95% of the national production, a fundamental nucleus for the production of this fruit. The profitability of this sector is focusing, on the one hand, on the innovation and diversification of the crop -with the introductions of the cultivation of raspberry, blueberry, and more recently blackberry-, and on the other hand it is based on obtaining fruits of high organoleptic quality (fruits appreciated by the senses) and functional (fruits with beneficial compounds for health).

Numerous scientific evidences show that foods rich in phenolic compounds, such as berries, have beneficial effects on human health. The healthy potential of berries seems to be associated with their high antioxidant content; that is, molecules that neutralize free radicals, the latter related to the appearance of cardiovascular diseases, cancer, etc. Chemically, these antioxidants present in the fruits belong to the group of phenolic compounds, which encompasses different subgroups with different properties and antioxidant actions, all leading to a specific antioxidant capacity of the fruits.

All the results described in this Doctoral Thesis highlight the properties present in strawberries and other red fruits, mainly those that refer to both organoleptic and nutraceutical quality, which provide added value to these fruits, making them highly desirable for consumers, which are increasingly interested in products with healthy qualities. This concept of quality is not static, but involves a large number of fruit characters which are subject to different pressures. On the one hand, external factors, such as climatic conditions, affect the crop and can condition the development and quality of the fruits, but also other factors of internal nature, such as the genotype, can also affect the final quality. In relation to the latter, strawberry is currently a multivarietal crop, represented simultaneously by various varieties, which can come from different improvement programs and, therefore, with different pedigree and surely selected based on different attributes. These internal factors related to the genotype mean that the different

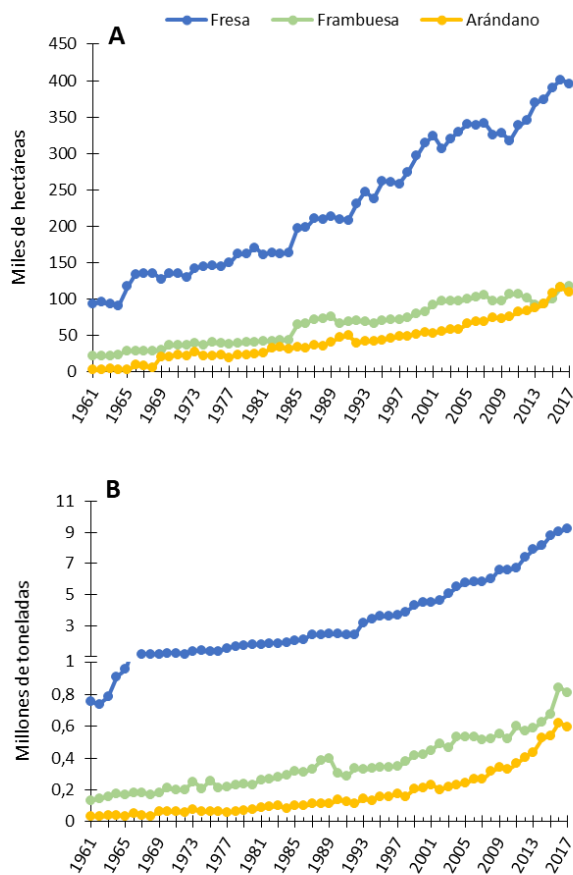
varieties can present different levels of the quality characteristics of the fruits, all of them modulated by environmental pressure. This is even more magnified when instead of talking about varieties we talk about different species of red fruits, such as raspberry or blueberry, which in addition to being crops increasingly present in the Huelva region, are also characterized by the presence of compounds phytochemicals with healthy qualities.

The incidence of external and internal factors makes it difficult to assess the quality of a variety. In addition, it should be taken into account that to assess their healthy potential it is not enough just to characterize the fresh fruits, but it is also necessary to include the transformations that occur during the digestion process when the fruits are consumed. For this, a series of *in vitro* approaches have been developed that simulate the physiological conditions to establish the possible transformations of the fruit compounds when they are released from the food matrix, which generates the bioaccessible fraction, from which the compounds can be potentially absorbed through the gastrointestinal epithelium. The fraction finally absorbed is called the bioavailable fraction, capable of reaching the systemic circulation and later reaching the specific site where it can exert its biological action (bioactivity). These results have shown the need to consider the bioavailability of bioactive compounds after digestion, as an estimate of the bio-healthy potential of the fruits, in characterizing the functional quality of the fruits. However, determining the compound or group of antioxidant compounds that give rise to said bioactivity is a tedious work, since surely the antioxidant properties of an extract do not depend exclusively on a group of compounds and surely not all of them will be of phenolic nature. Thus, considering the need to select an indicator that highlights which dietary matrix could be considered healthier and encompassed with the established relationship with bioactivity, the bioavailable antioxidant capacity has been pointed out as a possible indicator of the healthy potential of a food matrix. Thus, the selection of this parameter is very interesting to characterize healthy varieties for improvement programs, which pursue the selection of parents with healthy characters as well as for farmers to select future varieties to be cultivated.

1. Introducción general y objetivos

1.1. Importancia socioeconómica del cultivo de los frutos rojos

Los frutos rojos en general, y la fresa en particular, son unos de los frutos más consumidos en el mundo. Prueba de ello es el aumento anual tanto de la superficie dedicada a su cultivo como de su producción (Figura 1.1 A y B, respectivamente), situándose en los 9,2 millones de toneladas de fresa, 810.000 toneladas de frambuesa y 600.000 toneladas de arándano producidos en 2017 en un total de 620.000 hectáreas de cultivo a nivel mundial. De esta superficie total, el 63,5 % se destinaron al cultivo de fresa con un rendimiento de 23,3 toneladas/hectárea, el 19,0 % de la superficie se utilizó para la frambuesa obteniéndose 6,9 toneladas/hectárea y el 17,6 % del terreno se destinó al cultivo del arándano que rindió 5,4 toneladas/hectárea (FAOSTAT, 2019).



España, con más de 11.000 hectáreas de plantaciones de frutos rojos y una facturación de más de 1.000 millones de euros, es el mayor núcleo productivo de Europa y el mayor exportador de frutos rojos a nivel mundial (CAPDR, 2018). Según datos de 2017, España es el primer productor europeo de fresa (27,62 % del total) y arándano (40,80 %), y el segundo productor de frambuesa (20,30 %) por detrás de Polonia.

Figura 1.1. Evolución de la superficie (A) y de la producción (B) mundial de fresa, frambuesa y arándano. (Fuente: FAOSTAT, 2019).

En las últimas décadas, el sector de los frutos rojos ha experimentado un gran desarrollo en España tanto en superficie como en producción (Figura 1.2), siendo Andalucía la principal

Comunidad Autónoma productora, y particularmente la provincia de Huelva, que concentra la práctica totalidad de la producción nacional (~95%; CAPDR, 2018).

En esta región, la conjugación de la introducción de nuevas técnicas de cultivo, innovaciones tecnológicas e iniciativa empresarial ha convertido a la provincia de Huelva en la primera región exportadora de fresa del mundo, con una media de exportación de 240.000 toneladas en las últimas 5 campañas y 448,48 millones de euros (CAPDR, 2018). Por otro lado, las exportaciones de otros frutos rojos como frambuesa y arándano alcanzaron en 2018 unas 100.000 toneladas que suponen más de 500 millones de euros. Esto convierte a este sector en estratégico por su contribución al Producto Interior Bruto de la provincia.

Aunque en la zona productora de Huelva la fresa sigue siendo el principal fruto rojo en superficie y valor económico, desde 2013 el arándano y la frambuesa se encuentran en plena expansión y han incrementado notablemente su superficie, en detrimento de la fresa cuya superficie ha disminuido un 13% en los últimos 6 años (Figura 1.2). En la zona de Huelva, la producción de frutos rojos se destina en su mayor medida a la exportación, y su mayor volumen se concentra durante los meses de marzo a mayo de acuerdo con la duración del ciclo productivo de cada cultivo (CAPDR, 2018).

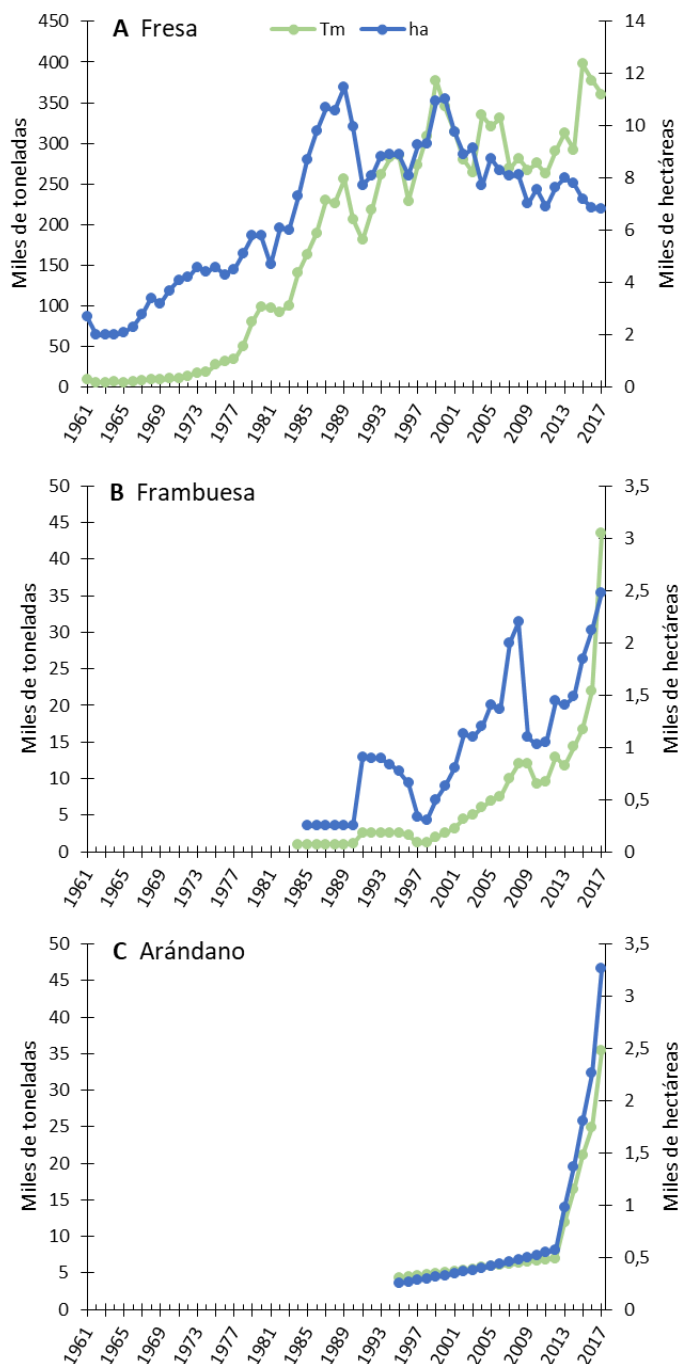
Así, la campaña de fresa comienza a mitad de diciembre con la entrada en producción de las variedades más precoces, aunque la producción representa menos del 5% del total de la campaña. Desde entonces se produce un aumento progresivo de la misma dándose el pico de producción en los meses de marzo y abril, momento en el que se comercializa más del 60% del total de la campaña; a partir de entonces se produce una caída en la producción y una disminución de la rentabilidad del cultivo, que desemboca en el final de la campaña a final de mayo.

En el caso de la frambuesa, la producción está repartida entre octubre y junio, debido a la combinación de variedades remontantes (dos picos de producción al año) y no remontantes (un solo pico), aunque entre un 50 y un 60% de la producción se concentra entre los meses de marzo

a mayo. En el arándano, su ciclo de producción abarca desde los meses de febrero a junio, si bien el pico de máximo volumen (70%) ocurre entre abril y mayo.

Todo lo anterior pone de manifiesto que los cultivos de fresa, frambuesa y arándano constituyen un motor importante en el desarrollo de la economía andaluza, con efectos directos, generando empleo y riqueza en la zona, e indirectos, permitiendo la creación de una industria auxiliar en torno al sector y de una importante red de servicios.

Figura 1.2. Evolución de la producción (Tm) y de la superficie de cultivo (ha) en España de fresa (A), frambuesa (B) y arándano (C). (Fuente:FAOSTAT 2019).



1.2. Características de los sistemas convencionales de cultivo de frutos rojos en Huelva

El cultivo convencional de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch., perteneciente a la familia *Rosaceae*) en la zona de Huelva (Figura 1.3) se lleva a cabo sobre suelos arenosos, en lomos de 35 cm de alto x 50 cm de ancho cubiertos con plástico de polietileno negro opaco (para

minimizar la evaporación de agua y prevenir la flora arvense) sobre los que se disponen las plantas a tresbolillo (30 x 25 cm). La plantación tiene lugar a mediados de octubre, y a mediados de noviembre los lomos se cubren con plástico transparente de polietileno de 150 micras de grosor formando estructuras llamadas macrotúneles (Ariza et al., 2012) que se mantienen hasta final de campaña (finales de mayo).



Figura 1.3. Cultivo convencional de la fresa en Huelva.

Previo a la plantación, se realizan labores de preparación del terreno para su limpieza, desinfección, y aporte de materia orgánica, durante los meses de verano. La limpieza consiste en un laboreo superficial para homogeneizar y evitar la compactación del suelo tras el cultivo anterior, posteriormente se procede a la incorporación de materia orgánica al terreno (estiércol de gallina comúnmente), ya que suelen ser terrenos pobres. En general, los agricultores de la zona realizan una desinfección química del suelo, mediante el uso de bromuro de metilo tradicionalmente, aunque desde su prohibición definitiva se han utilizado distintas alternativas químicas a esta materia activa, como la mezcla de 1,3-dicloropropeno con cloropicrina.

En la finca experimental del IFAPA en Moguer (Huelva) se viene utilizando desde hace más de 10 años la técnica de biosolarización, una técnica de bajo impacto ambiental de desinfección no química del suelo que consiste en una solarización al mismo tiempo que se aplica un biofumigante. Los fundamentos de esta técnica combinan el aumento de temperatura

del suelo generado por el sol (solarización) y la acción de los microorganismos que, al descomponer la materia orgánica, generan gran cantidad de gases y sustancias volátiles con efecto biocida, para el control de los organismos patógenos del suelo (biofumigación; Bello et al., 1999), creando además un ambiente anaeróbico. Como consecuencia de estos dos procesos, se logra un eficiente control de la mayoría de las plagas, enfermedades y malezas presentes en el suelo, al mismo tiempo que se conservan y promueven los microorganismos benéficos. Para realizar la biosolarización se utiliza un rotovator, el cual incorpora al suelo la materia orgánica a la vez que la cubre con un plástico transparente que se mantiene al menos 30 días. De esta forma, la radiación aumenta la temperatura del suelo, y esto unido a los vapores de la descomposición de la materia orgánica en anaerobiosis, ayuda a controlar los patógenos del suelo.

Las plantas utilizadas en cada ciclo anual proceden de viveros de altura en los que se multiplican vegetativamente mediante estolones (generando plantas clónicas) durante los meses de verano, al mismo tiempo que alcanzan las horas frío necesarias (150-200 h por debajo de 7 °C) para su correcta madurez fisiológica (López-Aranda et al., 2003).

Las variedades de fresa cultivadas son fundamentalmente de día corto, esto es, su floración se induce cuando los días son cortos (i.e., menos de 14h de luz; Darnell et al., 2003) y las temperaturas son bajas (Ito & Saito, 1962), en contraposición a las variedades de día neutro, las cuales florecen de manera relativamente independientes del fotoperiodo (López-Aranda, 2008). En los últimos años solo hay una variedad de día neutro con cierto impacto en la zona de Huelva, ‘San Andreas’, cuya representación no supera el 9% del total anual de plantas.

Actualmente existe un amplio abanico varietal de fresa en la zona como resultado de la selección de variedades con distintos atributos adaptadas a las condiciones agroclimáticas de Huelva provenientes de distintos programas de mejora nacionales e internacionales, públicos y privados.

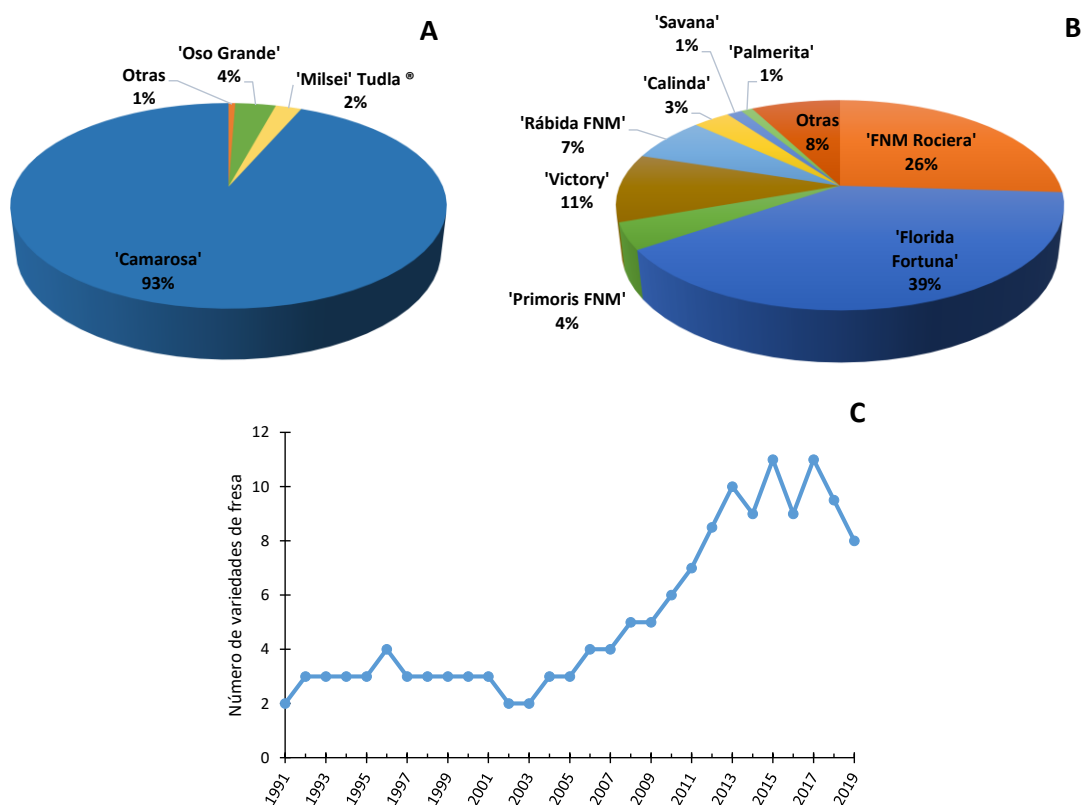


Figura 1.4. Distribución varietal en el cultivo de la fresa en Huelva en la campaña 1998 (A) y 2019 (B) y evolución del número de variedades de fresa con incidencia mayor del 1% en cada campaña desde 1991 a 2019 (C). (Fuente: Domínguez, 2012; Gómez-Mora et al., 2015; Soria et al., 2017; Medina-Mínguez et al., 2018; estimaciones del grupo IFAPA de Fresa para 2019).

Si bien en España la producción de fresa se estableció como un cultivo prácticamente monovarietal (Figura 1.4 A), dependiente de variedades de día corto procedentes de California, el aumento de programas de mejora nacionales ha ido cambiando este panorama en los últimos años hacia un escenario plurivarietal (Figura 1.4 B y C). La gran diversidad varietal responde a la demanda de variedades que, además de buena producción y calidad de fruto, permitan alargar el pico productivo (i.e., precocidad) o aumentar la resistencia a plagas y enfermedades.

Por su lado, el cultivo de la frambuesa (*Rubus idaeus* L., familia *Rosaceae*) presenta elementos en común con el de la fresa, tales como la preparación y la desinfección del suelo previo a la campaña, el alomado y la cubierta formando macrotúneles (Figura 1.5). En este caso la plantación se hace en línea en el centro del lomo, con una separación de 10-15 cm entre varas, sobre espalderas formadas por varillas de hierro unidas por cuerdas a los 20 y 100 cm.



Figura 1.5. Cultivo convencional de la frambuesa en Huelva.

Las variedades de frambuesa se dividen en dos grandes grupos atendiendo su periodo de fructificación: variedades remontantes (o reflorcientes) en las que la fructificación de las varas se produce en dos momentos a lo largo de la campaña, y variedades no remontantes (o no reflorcientes) en las que la fructificación solo ocurre una vez en la campaña, en la primavera siguiente del desarrollo de la vareta. A este último grupo pertenecen la mayoría de las variedades comerciales que se han cultivado históricamente en Huelva, como ‘Green Lyon’ o ‘Tulameen’, ya que generalmente son variedades más productivas, quedando las variedades remontantes como alternativa para cubrir las primeras cosechas de otoño-invierno. Por otro lado, en los últimos años han aparecido una serie de variedades remontantes que han ido reemplazando a las no remontantes, aumentando el abanico varietal disponible (Tabla 1.1), si bien es cierto que muchas de ellas solo están disponibles a aquellos agricultores pertenecientes a determinados “Clubs” cerrados de comercialización.

La planta de frambuesa requiere de acumulación de horas frío para la correcta fructificación (800-1600 horas frío; Muratalla et al., 2013) y obtención de frutos de alta calidad (con buen sabor y consistencia), por lo que las varas de hijuelos que nacen de la planta madre se sacan de la tierra y se conservan en cámaras frigoríficas 40-45 días antes de la plantación. En el momento de la plantación, se suele realizar una poda para rebajar en tamaño de las varas, con el

objetivo de obtener una fructificación escalonada. En las variedades remontantes, además se realiza otra poda tras la cosecha en la que se rebaja la vara que ha fructificado y se eliminan las ramas más débiles, para estimular el desarrollo de nuevas varas para la siguiente campaña.

Tabla 1.1. Variedades de frambuesa más utilizadas en la zona productora de Huelva. (Fuente: Medina-Mínguez, comunicación personal).

Tipo	Variedad
Remontante	'Kwanza', 'Imara', 'Kwelli', 'Adelita', 'Lupita', 'Maravilla', 'Cardinal', 'Sevillana', 'Ambrosia', 'Esperanza', 'Carmina', 'Radiance', 'Grandeur'.
No remontante	'Lagorite', 'Vajolet', 'Glen Lyon', 'Tulameen'.

Por último, el cultivo del arándano (*Vaccinium corymbosum* L., familia *Ericaceae*) se caracteriza por su porte arbustivo, lo que le convierte en un cultivo plurianual, en contraposición a los de fresa y frambuesa. La planta de arándano se trasplanta con 1 ó 2 años de edad, para minimizar la pérdida de individuos, y comienza a dar los primeros frutos a partir del 3º año, pero sin ser estable hasta al menos el 7º año. La vida útil de la planta es de 15-20 años, así, se requiere de una planificación y programación de prácticas a largo plazo, para no comprometer el rendimiento y la rentabilidad del cultivo.

La plantación del arándano se hace sobre lomos acolchados (35 cm de alto y 90 cm de ancho) cubiertos con plástico de polietileno opaco, formando filas únicas con una separación entre plantas de 1 a 1,5 m (Figura 1.6). Actualmente no se realiza desinfección del terreno antes de la plantación puesto que no hay sustancias activas autorizadas para este cultivo. Aunque

puede darse autofecundación, es común la alternancia de variedades en las plantaciones, puesto que la polinización cruzada incrementa la producción y aumenta el tamaño de los frutos.



Figura 1.6. Cultivo convencional del arándano en Huelva.

Las variedades de arándano que se cultivan en la zona de Huelva pertenecen al grupo de arándanos altos del Sur, uno de los 5 grupos de arándanos cultivados que existen, y que se caracteriza por sus menores requerimientos de frío para levantar su latencia invernal (200-600 horas frío). Este grupo es el grupo de arándanos que mejor se ha adaptado a las condiciones de producción de Huelva, y a él pertenecen las variedades que fueron plantadas al inicio de este cultivo en la zona: ‘Misty’, ‘Sharpblue’ y ‘O’Neil’, aunque las variedades con mayor representatividad en la actualidad son ‘Star’, ‘Ventura’, ‘Legacy’, ‘Camelia’ y ‘Gupton’, además de un buen número de variedades de Club.

Es interesante señalar que, desde su implantación en 2013, más del 76% de la superficie cultivada de fresa (CAPDR, 2018) se acoge al sistema de producción integrada (BOJA 132, 9 julio 2013). Asimismo, a demanda del sector en los últimos tiempos, se ha publicado recientemente (BOJA 184, 25 septiembre 2017) el reglamento de producción integrada específico de frutos rojos (arándanos, frambuesas y moras), por parte de la Consejería de

Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Con ello se aprecia una mayor sensibilidad y preocupación del sector por aspectos medioambientales del cultivo de frutos rojos en la región.

1.3. Efectos beneficiosos de los frutos rojos para la salud

Los frutos rojos son muy apreciados por los consumidores debido a su alta *calidad organoléptica*, es decir, su sabor y aroma característicos, pero también por su valor nutracéutico- o nutricional- y los efectos beneficiosos para la salud que se les ha atribuido (lo que denominamos *calidad funcional*). En este sentido, diversos estudios han relacionado la ingesta de frutos y hortalizas en general, y de los frutos rojos en particular, con la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares y diferentes tipos de cáncer (Hung et al., 2004; Boeing et al., 2012; Skrovankova et al., 2015; Afrin et al., 2016). Esta acción parece estar ligada a la presencia de compuestos nutracéuticos con capacidad antioxidante que actúan en la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) a nivel celular (Terry, 2011; Shashirekha et al., 2015), entre los que cabe destacar polifenoles y vitaminas (Hannum, 2004; Zafra-Stone et al., 2007; Skrovankova et al., 2015). En concreto, el alto contenido en polifenoles del tipo flavonoides y taninos hidrolizables y no hidrolizables, con cualidades saludables, (Skrovankova et al., 2015; Afrin et al., 2016; Ariza et al., 2016) descrito en fresas, frambuesas y arándanos, los hace especialmente atractivos para los consumidores además de sus cualidades nutricionales (Tabla 1.2).

Los frutos rojos tienen un alto valor nutricional, ya que presentan un bajo poder calórico, en parte debido a su alto contenido en agua bajo contenido en proteínas y grasas, son ricos en fibras dietéticas (i.e., pectina que actúan como un regulador intestinal; Ramadan et al., 2008) y representan un gran aporte de vitaminas (A, C y E, y del complejo B, que actúan como antioxidantes, ayudan a estimular el sistema inmunitario e intervienen en el metabolismo de los hidratos de carbono y las grasas; Pantelidis et al., 2007) y de micronutrientes esenciales, que

favorecen el desarrollo de los huesos y los dientes, el refuerzo de los músculos y otros procesos fisiológicos y bioquímicos (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Composición nutricional de la fresa, arándano y frambuesa. (Fuente: USDA 2018).

	Fresa	Arándano	Frambuesa
Agua (g/100g)	90,95	84,21	85,75
Energía (Kcal/100g)	32,00	57,00	52,00
Proteínas (g/100g)	0,67	0,74	1,20
Hidratos de carbono, de los cuales:			
Azúcares (g/100g)	4,89	9,96	4,42
Fibra (g/100g)	2,00	2,40	6,50
Minerales, de los cuales:			
Ca (mg/100g)	16,00	6,00	25,00
Fe (mg/100g)	0,41	0,28	0,69
Mg (mg/100g)	13,00	6,00	22,00
P (mg/100g)	24,00	12,00	29,00
K (mg/100g)	153,00	77,00	151,00
Na (mg/100g)	1,00	1,00	1,00
Zn (mg/100g)	0,14	0,16	0,42
Vitaminas, de las cuales:			
C (mg/100g)	58,80	9,70	26,20
B ₁ (mg/100g)	0,02	0,04	0,03
B ₂ (mg/100g)	0,02	0,04	0,04
B ₃ (mg/100g)	0,39	0,42	0,60
B ₆ (mg/100g)	0,05	0,05	0,06
B ₉ (μg/100g)	24,00	6,00	21,00
A (μg/100g)	1,00	3,00	2,00
E (mg/100g)	0,29	0,57	0,87
D (μg/100g)	0,00	0,00	0,00
K (μg/100g)	2,20	19,30	7,80
Lípidos, de los cuales:			
Ácidos grasos saturados (g/100g)	0,02	0,03	0,02
Ácidos grasos monosaturados (g/100g)	0,04	0,05	0,06
Ácidos grasos poliinsaturados (g/100g)	0,16	0,15	0,38
Colesterol (mg/100g)	0,00	0,00	0,00

1.3.1. Principales compuestos bioactivos

Existe una amplia gama de compuestos fitoquímicos que pueden favorecer la salud (i.e., compuestos bioactivos) y, por tanto, estar involucrados en la calidad funcional de los frutos de rojos, entre los que destacan de forma mayoritaria los compuestos fenólicos (Stoner & Seeram, 2011). Químicamente los compuestos fenólicos son un grupo muy heterogéneo, que se caracterizan por tener al menos un anillo aromático hidroxilado, al que se pueden unir uno o más grupos funcionales como ésteres o glicósidos, entre otros (Martínez-Valverde et al., 2000; Duthie & Crozier, 2000). Dichos compuestos incluyen tanto compuestos simples de bajo peso molecular como compuestos poliméricos complejos de elevado peso molecular, lo que condiciona sus propiedades físico-químicas (i.e., solubilidad, permeabilidad y actividad antioxidante). Pese a la gran variedad de compuestos fenólicos en las plantas, éstos se originan a partir de las mismas rutas metabólicas. Una de ellas es la ruta del ácido siquímico, la cual a partir de precursores del metabolismo de los carbohidratos (fosfoenolpiruvato y la eritrosa-4-fosfato) se consigue el ácido siquímico (tras varias reacciones) y aminoácidos aromáticos derivados de éste (fenilalanina, triptófano y tirosina). La mayoría de los compuestos fenólicos son biosintetizados en plantas superiores a partir de la fenilalanina a lo largo de la ruta metabólica general de los fenilpropanoides, que tiene lugar en el citoplasma celular y en la cual están implicadas numerosas enzimas (Robards et al., 1999).

Atendiendo a su estructura, sobre todo al número de carbonos del esqueleto principal, los compuestos fenólicos se dividen en varias familias (Figura 1.7).

Los ácidos fenólicos son el grupo de polifenoles químicamente más simples, constan de un único anillo aromático (C_6) con un sustituyente carboxílico, dando lugar a ácidos hidroxibenzoicos (C_6-C_1) o ácidos hidroxicinámicos (C_6-C_3), todos ellos de bajo peso molecular.

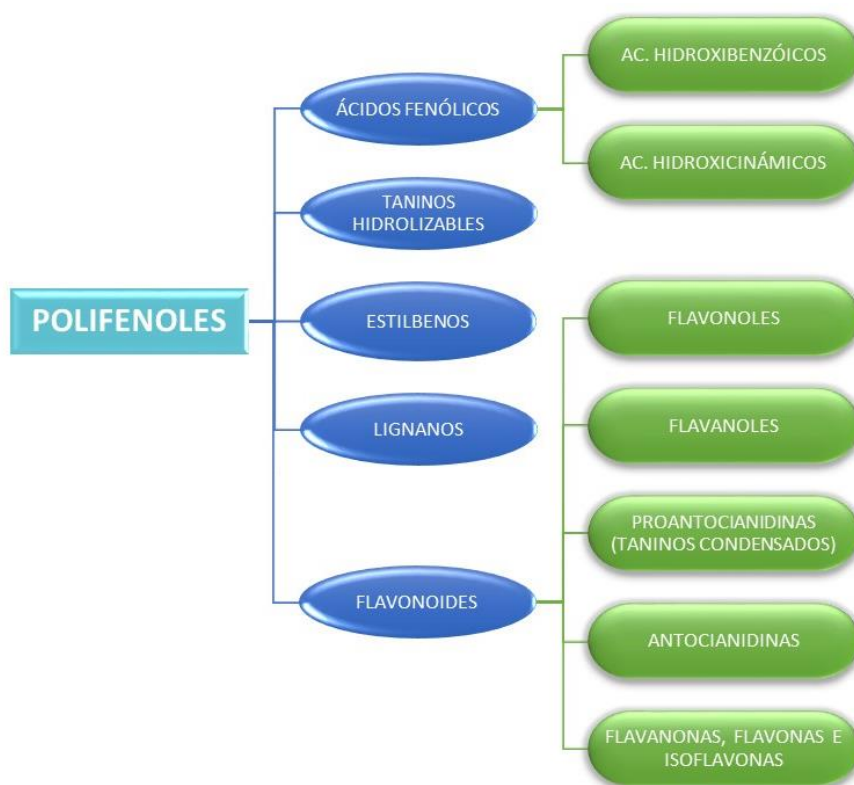


Figura 1.7. Esquema de clasificación de los compuestos fenólicos. Modificado de Hardman (2014).

Ambos grupos son muy abundantes en los frutos rojos, ejemplo de ello es el ácido elágico (el principal ácido hidroxibenzoico) que puede llegar a representar por sí solo más del 50% de los compuestos fenólicos totales en fresa, o el 88% en zarzamoras (Häkkinen et al., 1999; De Ancos et al., 2000; Nile y Park, 2014) y se ha demostrado que presenta efectos antivirales, anticancerígenos, antibacterianos y antiinflamatorios (Bushman et al., 2004; Hannum, 2004). En el grupo de los ácidos hidroxicinámicos, los ácidos caféico y ferúlico son los principales ácidos fenólicos en los frutos rojos, aunque raramente se encuentran libres, sino que tienden a esterificarse con otras moléculas como ácidos orgánicos e hidratos de carbono, siendo los derivados del ácido clorogénico (resultante de la esterificación de los ácidos cafeico y quínico) los ésteres más comunes (Paredes-López et al., 2010). Además, destaca el ácido gálico como un potente antioxidante con efectos contra el cáncer y hepatoprotectores que se encuentra en buena cantidad en las bayas (Rice-Evans et al., 1997; Tomas-Barberán & Clifford, 2000).

Los *taninos hidrolizables* (C_6)_n son el resultado de la condensación de varias unidades de ácidos gálico o elágico, dando lugar a compuestos de elevado peso molecular. Así, se distinguen dos grupos principales; los galotaninos, que son frecuentes en frutas como el mango, y los elagitaninos, característicos de frutas rojas como las fresas, frambuesas y zarzamoras (Clifford & Scalbert, 2000a). Así, se ha descrito que las fresas y frutos rojos pueden tener un contenido tres veces mayor de elagitaninos que las pacanas y las nueces, y aproximadamente 15 veces más que otros frutos secos (Landete, 2011).

Los *estilbenos* son un grupo de polifenoles de estructura $C_6-C_2-C_6$ los cuales han despertado cierto interés por su potencial saludable, como es el caso del resveratrol de la uva y su papel anticancerígeno (Manach et al., 2004). Aunque su detección en frutos rojos es minoritaria, en fresas se han detectado pequeñas cantidades de *trans*-resveratrol en pulpa y en aquenios (Sebastiá et al., 2017).

Los *lignan*os responden a la estructura $C_6-C_3-C_3-C_6$ y son abundantes sobre todo en los cereales, siendo la linaza la mayor fuente de estos compuestos fenólicos, tal como el enterodiol, aunque no se han descrito compuestos de este grupo presentes en los frutos rojos.

En último lugar, los *flavonoides* constituyen el grupo de compuestos fenólicos más diverso y ampliamente distribuido en las plantas. En este grupo, con un esqueleto del tipo $C_6-C_3-C_6$, se pueden diferenciar varias clases en función del grado de oxidación del anillo heterocíclico tricarbónico, y de la naturaleza y número de los sustituyentes unidos a los anillos (Robards et al., 1999). La presencia de un grupo hidroxilo en la posición 3 determina la subdivisión en las dos clases principales de flavonoides: los 3-hidroxi flavonoides (flavonoles, flavanoles, proantocianidinas o taninos condensados y antocianidinas) y los flavonoides no hidroxilados en posición 3 (flavonas, isoflavonas, flavanonas). Las fresas y otros frutos rojos poseen un elevado contenido en flavonoides, principalmente pertenecientes a los subgrupos flavanoles, flavonoles y antocianidinas.

Dentro del subgrupo de los flavonoles, destaca la quercetina como la más abundante y ubicua, con una potente actividad antioxidante junto con otras importantes propiedades farmacológicas, biológicas y médicas (Seeram et al., 2003; Xue et al., 2002). Los flavonoles son otro grupo importante de flavonoides presentes en las fresas y otros frutos rojos entre los que destaca la catequina, galocatequina, epicatequina, epigallocatequina, epicatequina 3-galato y epigallocatequina 3-galato (Arts et al., 2000; Cieslik et al., 2006). Las proantocianidinas o taninos condensados, son el resultado de la polimerización de varias moléculas de flavonoles, y se han descrito como el grupo de taninos más comunes en frutos rojos, (Seeram et al., 2001). Estos compuestos pueden estabilizar antocianinas uniéndose a ellas, y son los responsables del sabor amargo y astringente de algunos frutos como el cacao, manzana o la uva (Santos-Buelga et al., 2000) a través de la formación de complejos con las proteínas de la saliva.

Por último, las antocianinas o antocianos son antocianidinas unidas a un azúcar, siendo esta forma glicosilada la que se encuentra de forma natural en las frutas y vegetales frescos, y son responsables de la coloración roja, azul o morada característica de los frutos rojos (Carbone et al., 2009; Khoo et al., 2017). Se les ha atribuido actividades anticancerígenas y antienvjecimiento, así como un efecto positivo sobre el tracto urinario y los vasos sanguíneos (Moyer et al., 2002; Xue et al., 2002). Las principales antocianinas que se encuentran en la fresa son la pelargonidina-3-glucósido y la cianidina-3-glucósido (Ariza et al., 2016), mientras que en otros frutos rojos se encuentran antocianidinas derivadas de la cianidina (la más abundante en los alimentos) malvidina, petunidina, peonidina o delfinidina (Skrovankova et al., 2015).

1.3.2. Acción detoxificadora de los compuestos bioactivos

De cara a sus propiedades bioactivas, hay que destacar que la cantidad de antioxidantes del fruto no es tan determinante como su naturaleza química, ya que condiciona su acción detoxificadora de las especies reactivas del oxígeno (ROS). El término ROS incluye radicales libres y ciertas especies oxidantes no-radicales que se convierten fácilmente en radicales libres, como por

ejemplo HClO, HBrO, O₃, ONOO⁻, ¹O₂, o H₂O₂ (Halliwell & Whiteman, 2004). La estructura química de los compuestos fenólicos, con anillos aromáticos, determina su facilidad para deslocalizar cargas y ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical (Duthie et al., 2003), estabilizando las ROS. Además, pueden captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre) e inhibir la formación de radicales libres que se producen mediante las reacciones de Fenton (Rice-Evans et al., 1997). La acción detoxificadora de los distintos compuestos bioactivos presentes en la fruta se puede estimar mediante la determinación de la capacidad antioxidante. Los métodos de cuantificación de esta se dividen en dos grupos, dependiendo de si su mecanismo de acción incluye la transferencia de electrones (SET) o la de átomos de hidrógeno (HAT). Existen diversos protocolos de cuantificación de la capacidad antioxidante específicos para cada mecanismo de acción (Tabla 1.3), y es importante conocer el tipo de moléculas antioxidantes presentes en la muestra para elegir el protocolo adecuado. En el caso de los frutos rojos, los compuestos fenólicos son las moléculas que principalmente contribuyen a la capacidad antioxidante y pueden actuar mediante dos vías distintas: como captadores de radicales libres donando hidrógenos o electrones (deteniendo así el ciclo de generación de radicales libres), o como quelante de metales secuestrando iones metálicos (impidiendo la formación de radicales libres en la reacción de Fenton).

Debido a las características químicas de los compuestos fenólicos, el protocolo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; Capacidad antioxidante trolox equivalente) es el método más comúnmente utilizado para la cuantificación de su capacidad antioxidante, pues integra los dos mecanismos principales de detoxificación de radicales libres (HAT y SET; Jiménez et al., 2004).

Tabla 1.3. Ensayos *in vitro* más utilizados para cuantificar la capacidad antioxidante de una muestra y su mecanismo de acción. (Modificado de Huang et al., 2005).

Protocolo	Descripción	Mecanismo de acción
ORAC (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>)	Se basa en la medición de la fluorescencia de una molécula sometida a la acción de un generador de radicales libres	HAT
DPPH	Se basa en la reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) por los antioxidantes de la muestra.	Mixto
FRAP (<i>Ferric ion reducing antioxidant power</i>)	Se basa en la capacidad reductora del Fe que se encuentra en el complejo Fe ³⁺ -TPTZ.	SET
TEAC (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>)	Se basa en la pérdida de color azul del cromóforo ABTS+ cuando está presente un antioxidante en la muestra.	Mixto
Capacidad de reducción del Cu(II)	Cuantifica la reducción de Cu(II) a Cu(I)	SET

1.4. Factores que afectan a la calidad de los frutos rojos.

El color de los frutos, la firmeza, el aroma y el sabor (balance entre el dulzor y la acidez) son los principales parámetros para evaluar la *calidad organoléptica* de los frutos (Shamaila et al., 1992). Si bien es cierto que estos atributos son importantes a la hora de determinar la decisión del consumidor, y por tanto tienen una alta repercusión económica, cada vez se demandan frutos más saludables que puedan contribuir a la prevención de enfermedades (Weatherspoon et al., 2014), por lo que es importante incorporar estos criterios de *calidad funcional* a los nuevos programas de mejora. De hecho, la composición en polifenoles de los frutos de fresa es actualmente uno de los criterios de selección establecidos en programas de mejora en curso (Mezzetti et al., 2018).

En la planta, los compuestos fenólicos se sintetizan de forma natural como metabolitos secundarios y desempeñan diversas funciones fisiológicas, interviniendo en el crecimiento y reproducción de las plantas, y además están involucrados en la respuesta vegetal frente a

distintos tipos de factores y estreses ambientales, tanto bióticos (i.e., patógenos, predadores) como abióticos (radiación ultravioleta). En situaciones de estrés, la síntesis de antioxidantes responde a una estrategia de defensa de la planta para proteger su ADN de las ROS o para actuar directamente como defensa frente a patógenos (Lattanzio et al., 2008). Así, muchos polifenoles, especialmente ácidos fenólicos, contribuyen a la lignificación de las áreas dañadas tras un episodio de estrés biótico o poseen propiedades antimicrobianas.

Su amplia participación en distintos procesos fisiológicos de la planta, incluyendo los frutos, conlleva que exista una alta variabilidad en el contenido en compuestos fenólicos entre genotipos que a su vez está condicionada por las condiciones ambientales. Pese a que en algunos casos se conoce con detalle la composición de polifenoles de un fruto, para muchas especies existe aún poca información, y generalmente se limita a una o pocas variedades. Además de la variedad y factores ambientales durante el cultivo, otros factores pueden afectar el contenido en polifenoles de los frutos como el estado de maduración en el momento de la recolección, así como el tratamiento y almacenamiento postcosecha de los mismos (Manach, 2004).

1.4.1. Variabilidad genotípica

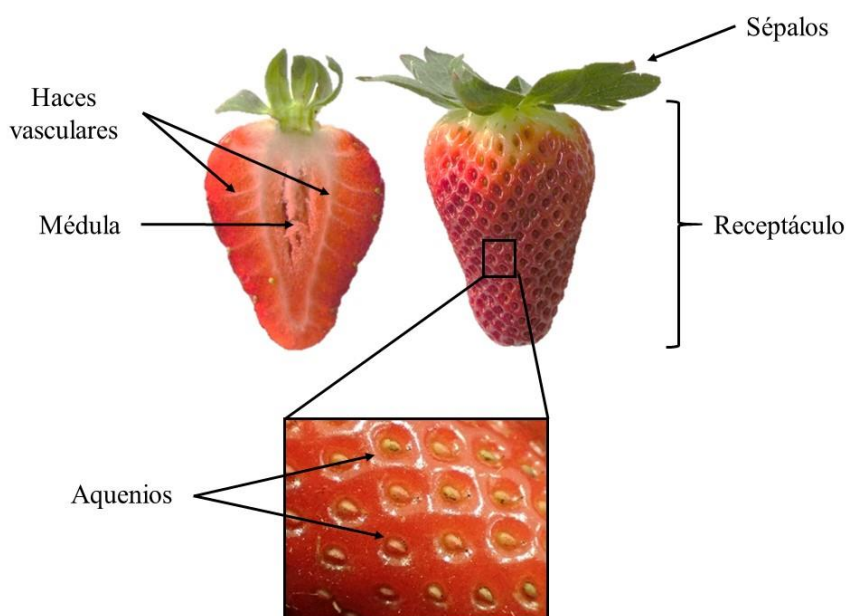
La variabilidad genotípica es el factor principal que afecta a la composición en compuestos funcionales de las especies, y engloba diferencias entre distintas especies (i.e., interespecíficas), tanto como entre variedades de la misma especie (i.e., intraespecíficas) (Scalzo et al., 2005). La influencia del genotipo sobre la calidad organoléptica y funcional de los frutos se ha puesto de manifiesto en gran cantidad de estudios (Hakkinen & Torronen, 2000; Cordenusi et al., 2002; Yoshida et al., 2002; Williner et al., 2003; Tulipani et al., 2008). En relación a los compuestos fenólicos, si bien es cierto que algunos polifenoles como la quercetina se han detectado de forma general en alimentos de origen vegetal (frutas, verduras, cereales, te, vino, entre otros), se han descrito compuestos específicos que son más o menos característicos de determinadas especies (flavononas en cítricos, isoflavonas en soja, lignanos en cereales, entre otros). Además de las

diferencias cualitativas, fruto de la diversificación de las especies, hay importantes diferencias cuantitativas entre especies, y entre genotipos de la misma especie. En los frutos rojos, Milivojević et al. (2013) observaron grandes diferencias en la cantidad de antioxidantes entre diversos géneros (*Fragaria*, *Rubus*, *Vaccinium* y *Ribes*). En esta misma línea, se ha estudiado la variación en la capacidad antioxidante de 87 genotipos de arándano, obteniéndose un rango de resultados con diferencias de más de 6 veces (Ehlenfeldt & Prior, 2001); y en el caso concreto de la fresa, se ha observado que la composición en fenoles, flavonoides y antocianos, así como la capacidad antioxidante de los frutos, difiere en las distintas variedades (Ariza et al., 2015; Fang, 2015).

Dado que cuando hablamos de frutos rojos se incluyen especies filogenéticamente muy diversas (distintas familias botánicas), y dentro de una misma especie, cultivares con distinto pedigrí (Gil-Ariza et al., 2009), cabe esperarse que la magnitud de las diferencias en la composición de compuestos saludables de los frutos, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, sea mayor cuanto mayor sea la distancia filogenética entre los mismos. Ante esta gran la variabilidad entre genotipos, de cara a la selección de parámetros de calidad funcional para su uso en programas de mejora hay que considerar que sean caracteres heredables, fenotípicamente estables y con niveles de expresión elevados (Lafitte et al., 2003). En este sentido, estudios realizados en arándano (Connor et al., 2002) y frambuesa (Connor et al., 2005) han puesto de manifiesto que el contenido en fenoles totales, el contenido en antocianinas o la capacidad antioxidante son buenos parámetros para ser utilizados en programas de mejora; mientras que en fresa se ha determinado que la variabilidad en parámetros como las vitaminas C y B, fenoles totales, antocianinas totales entre variedades y retrocruzamientos con especies silvestres (*F. virginiana*), apuntado a estos caracteres de calidad de fruto como susceptibles de potencial de mejora genética (Mezzetti et al., 2016). En consonancia, diversos programas de mejora realizados con otros cultivos han obtenido variedades con características funcionales mejoradas como la variedad de sandía 'Fashion', con alto contenido en licopeno, las variedades de tomate

‘Lycomate’ y ‘Doublerrich’, con alto contenido en licopeno y vitamina C, respectivamente, o la variedad ‘Almagro’ de berenjena, con alto contenido en ácido clorogénico (Adalid et al., 2010; Tarazona-Díaz et al., 2011; Hurtado et al., 2014). Por su parte, en algunos programas de mejora de fresa se han considerado aspectos relacionados con el aroma del fruto (Kerler et al., 2000) y el sabor (Aharoni et al., 2004) y se están dando los primeros pasos en la caracterización de la composición en compuestos bioactivos de distintas variedades de fresa para su uso potencial en programas de mejora (Capocasa et al., 2008a; Tulipani et al., 2008; Mezzetti et al., 2013; Ariza et al., 2016).

Es importante señalar que esta caracterización se lleva a cabo en el fruto completo de la fresa; sin embargo, botánicamente la fresa es una infrutescencia resultado de un engrosamiento del receptáculo floral, sobre cuya superficie se asientan los verdaderos frutos, denominados aquenios. El receptáculo de la fresa representa más del 90% del peso fresco del fruto de la fresa, y está formado por una médula central con los haces vasculares que se va dividiendo y adentrándose en el córtex, el cual está formado por tejido parenquimatoso y finalmente una fina epidermis (Figura 1.8). Por su parte los aquenios se caracterizan por presentar un pericarpo grueso, una testa delgada, una única capa endospermática y un embrión (Darrow, 1966), cuyo desarrollo se completa diez días después de la antesis (Thompson, 1971). Se conectan al



receptáculo mediante haces vasculares y su número oscila entre variedades, pudiendo encontrarse entre 20 y 500 aquenios por receptáculo (Darrow, 1966; Ariza et al., 2011).

Figura 1.8. Estructura general del fruto de fresa.

El distinto origen ontogénico de los tejidos que conforman el receptáculo y los aquenios puede conllevar una diferente composición de antioxidantes. Además, dependiendo del nivel de contribución del aquenio a la calidad funcional del fruto completo, podría ser un carácter de interés para la selección en programas de mejora. Sin embargo, hasta la fecha apenas existen trabajos que determinen de forma comparativa la contribución del aquenio a la calidad funcional del fruto completo en distintos genotipos de fresa (Aaby et al., 2005).

1.4.2. Efecto ambiental sobre la variabilidad de los compuestos funcionales

Como se ha dicho anteriormente, además del genotipo, el ambiente influye de manera directa en la manifestación de los caracteres de la planta. Por un lado, se ha puesto de manifiesto en algunas hortícolas y frutos rojos que los caracteres funcionales en los frutos pueden ser dependientes de las prácticas de cultivo. En algunas variedades de lechuga se ha detectado que el forzado mediante cubiertas de plástico con distinto filtro UV produce una variación significativa en el contenido en polifenoles. En fresa, Anttonen et al. (2006) describieron que un nivel bajo de fertilización ($0,6 \text{ mS cm}^{-1}$) aumentaba el contenido en flavonoles y ácido elágico, aunque no en la misma proporción entre las variedades estudiadas. También se ha descubierto que el color del plástico de cobertera de los lomos puede influir en el aroma de la fresa (Loughrin & Kasperbauer, 2002), y que el recorte hídrico en arándano cultivado bajo plástico puede aumentar el contenido en antocianos (Cardeñosa et al., 2016). Así, parece que el manejo del cultivo a todos los niveles (suelo, fertilización, riego, cubierta y forzado, entre otros) no solo influye en el desarrollo del cultivo, sino que también puede ser determinante en la calidad funcional de los frutos.

Por otro lado, la variación en las condiciones climáticas influye en la composición en polifenoles de fresa siendo diferente dependiendo del momento de campaña (Ariza et al., 2015). Además, se ha descrito que una mayor exposición a la luz aumenta la biosíntesis de flavonoides en fresa (Kadomura-Ishikawa et al., 2013) y que las bajas temperaturas influyen negativamente

en la ratio azúcar/ácido y en la capacidad antioxidante de los frutos de fresa (Davik et al., 2006). En arándano, también se ha descrito una correlación entre las bajas temperaturas y un aumento de antocianos (Zoratti et al., 2015a), flavonoles y ácido hidroxicinámico (Uleberg, 2012).

La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha en frutos rojos se fundamentan en la caracterización de los compuestos antioxidantes de los genotipos sin tener en cuenta la variabilidad de éstos debida al ambiente, lo que puede dar lugar a resultados difícilmente comparables entre estudios o a conclusiones erróneas en la valoración de variedades. Así, es importante determinar la influencia ambiental sobre la calidad funcional de los frutos, mediante el análisis de las interacciones genotipo x ambiente y de la capacidad de los genotipos para modular su respuesta a las variaciones ambientales, es decir, la plasticidad fenotípica (Carbone et al., 2009; Palmieri et al., 2017).

La variabilidad de los compuestos funcionales frente al ambiente se contrapone con la estabilidad, como característica deseable para un carácter en los programas de mejora. De hecho, la estabilidad es un rasgo muy valorado para la selección varietal. Así, en sandía se destacó la variedad 'Crimson Sweet' como una línea endogámica en la que los caracteres funcionales de los frutos, además de ser indicativos de alta calidad, eran muy estables ante diferentes condiciones climáticas (Dia et al., 2016). En este contexto, la estabilidad en los parámetros de calidad de fruto de los genotipos se convierte en un carácter esencial a considerar de cara a seleccionar una variedad con atributos saludables.

1.5. Calidad funcional y potencial biosaludable

Además del efecto genotípico y ambiental sobre la calidad funcional de los frutos, es importante considerar cómo afecta el proceso de digestión a la liberación, transformación y absorción de dichos antioxidantes en condiciones fisiológicas (Brown et al., 2012), lo que condiciona su posible acción beneficiosa en el organismo tras la ingesta, es decir, su *bioactividad*. Así, durante

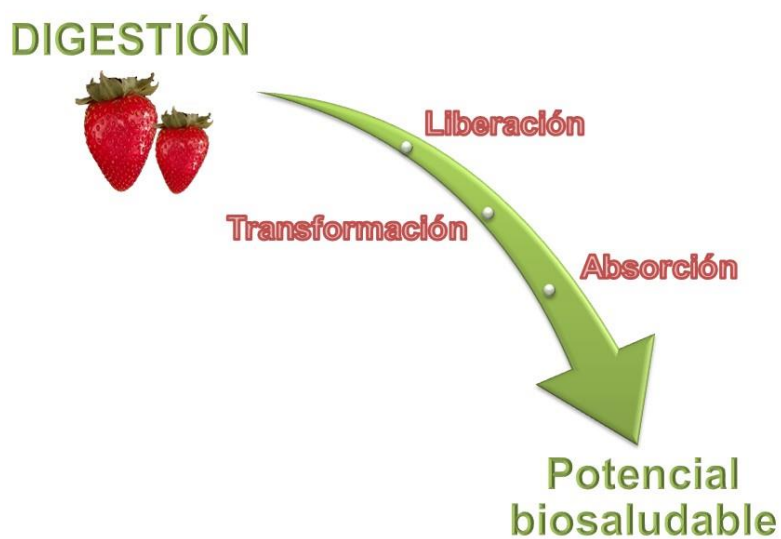


Figura 1.9. Esquema del proceso de digestión.

la digestión, los compuestos presentes en una matriz alimentaria pasan por una primera fase de liberación y transformación, que genera la *fracción bioaccesible*, a partir de la cual los compuestos pueden ser potencialmente absorbidos a través del epitelio gastrointestinal. La fracción finalmente absorbida se denomina *fracción biodisponible*, capaz de alcanzar la circulación sistémica y, más tarde llegar al sitio específico donde pueda ejercer su acción biológica (Porrini & Riso, 2008; Figura 1.9).

La *biodisponibilidad* de los compuestos tras la digestión viene condicionada por numerosos factores tales como la gran variedad estructural de los compuestos fenólicos, la influencia de factores genéticos, agronómicos, del procesado y almacenamiento (D'Archivio et al., 2010; Tabla 1.4).

Los compuestos fenólicos generalmente no sufren modificaciones a nivel oral, aunque se ha descrito la hidrólisis de algunos glicósidos de flavonoides a sus respectivas agliconas por acción de α -glucosidasas salivares (Walle et al., 2005). La mayor parte del proceso de transformación y/o asimilación de estos compuestos ocurre a nivel del estómago e intestino. Los polifenoles más abundantes en un alimento no son siempre los más activos biológicamente, bien porque tienen una baja actividad intrínseca, o bien porque son pobremente absorbidos, altamente metabolizados y/o rápidamente excretados (Manach et al., 2004).

Tabla 1.4. Principales factores que afectan a la biodisponibilidad de los polifenoles en humanos (Modificado de D'Archivio et al., 2010).

Factores	Ejemplos
Factores intrínsecos	Composición química del fruto Concentración en el alimento
Factores externos	Exposición a la luz del fruto Estado de maduración Manejo del cultivo Condiciones climáticas durante el desarrollo del fruto
Factores relacionados al procesamiento	Tratamiento térmico (i.e., cocción) Troceado y homogenización Almacenamiento
Factores relativos al alimento	Matriz alimentaria (i.e., fibra alimentaria, grasas) Efecto sinérgico o antagónico de otros compuestos
Factores relacionados con el individuo	Actividad enzimática Tránsito intestinal Flora del colon Factores sistémicos (i.e., edad, sexo, patologías, condición física)

Los estudios de biodisponibilidad se fundamentan en estudiar qué ocurre con los compuestos de un alimento una vez ingeridos, mientras que los estudios de bioactividad, se centran en evaluar los efectos beneficiosos que los compuestos biodisponibles pueden aportar a nuestro organismo. Para el estudio de la biodisponibilidad, los modelos *in vivo* reflejan mejor la complejidad de los procesos físico-químicos y fisiológicos que ocurren en el sistema digestivo humano; sin embargo, los modelos *in vitro* son una alternativa práctica para evaluar la biodisponibilidad de los compuestos de un alimento en un periodo de tiempo relativamente corto (Manach et al., 2005; Coles et al., 2005; Correa-Betanzos, 2013; Bohn et al., 2018).

Así, en los últimos años se han desarrollado distintos modelos *in vitro* que asemejan el proceso fisiológico de digestión y han permitido comenzar a dilucidar las implicaciones de la liberación, transformación y absorción de los compuestos presentes en las matrices alimentarias, entre ellas los frutos rojos (Carbonell-Capella et al., 2014; Lucas-González et al., 2018). Específicamente, el método desarrollado por Gil-izquierdo et al. (2002) permite analizar las modificaciones que sufren los compuestos fenólicos de diversos alimentos, como zumos de

frutas, mermeladas o frutos completos tras la digestión. Estudios previos en albahaca y jengibre han demostrado que durante la digestión *in vitro* los flavonoides aumentaron y los fenoles totales y capacidad antioxidante disminuyeron en comparación con la cuantificación química (Yang et al., 2016). En el caso de los frutos rojos, la cantidad de fenoles, flavonoides y antocianos liberados tras la digestión *in vitro*, así como su capacidad antioxidante, disminuyó en arándano (Jiao et al., 2018) y en especies del género *Aronia* (Bermúdez-Soto et al., 2007a).

Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de considerar la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos tras la digestión, como estimación del *potencial biosaludable* de los frutos, en la caracterización de la calidad funcional de los frutos, y con ello, definir los objetivos de programas de mejora orientados hacia la obtención de frutos beneficiosos para la salud.

No obstante, de cara a los programas de mejora, es necesario dar un paso adelante que permita relacionar el potencial biosaludable de los frutos con la bioactividad (i.e., acción beneficiosa en el organismo) de los compuestos biodisponibles. Para el estudio de la bioactividad existen diversos métodos que van desde estudios clínicos en humanos, con gran complejidad e inversión técnica y económica, a otras aproximaciones con grado decreciente de complejidad, como los estudios *in vivo* apoyados con animales de experimentación o *in vitro* con cultivos celulares (Wolfe & Liu, 2007).

1.6. Objetivos

El objetivo principal de esta tesis ha sido analizar la estabilidad de los compuestos antioxidantes en distintos genotipos y bajo distintas condiciones ambientales y el papel que juegan en el potencial biosaludable de los frutos rojos, para determinar su uso como indicadores de calidad funcional en programas de mejora encaminados a obtener variedades de frutos rojos más saludables.

Con esta finalidad se plantearon los siguientes objetivos específicos y sus correspondientes subobjetivos:

1. Evaluar el efecto de las condiciones agroclimáticas en la calidad organoléptica y funcional de los frutos en distintos genotipos de fresa.

1.1. Análisis de la estabilidad de la calidad organoléptica y funcional de los frutos de distintas variedades de fresa ante la variación de las condiciones ambientales (**Capítulo II**).

1.2. Nivel de exposición a la luz de los frutos sobre su calidad funcional en distintas variedades de fresa (**Capítulo III**).

2. Evaluar el potencial biosaludable de los frutos rojos: análisis de la composición, biodisponibilidad y bioactividad de los compuestos antioxidantes tras el proceso de digestión.

2.1. Evaluación de la interferencia de los reactivos de la digestión *in vitro* en la cuantificación de los compuestos antioxidantes: consideraciones metodológicas para su uso como método de aproximación al estudio *in vivo*. (**Capítulo IV**).

2.2. Análisis interespecífico de la biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes en distintos frutos rojos. (**Capítulo V**).

2.3. Análisis intraespecífico de la biodisponibilidad y bioactividad de los compuestos antioxidantes en distintas variedades de fresa. (**Capítulo VI**).

2.4. Determinación de la contribución de los distintos tejidos de la fresa a la biodisponibilidad de antioxidantes total del fruto y su bioactividad. (**Capítulo VII y VIII**).

**2. Análisis de la estabilidad de la calidad organoléptica
y funcional de los frutos de distintas variedades de fresa
ante la variación de las condiciones ambientales**



Este capítulo corresponde al objetivo 1.1 de la Tesis Doctoral y ha sido publicado como:

Cervantes, L., Ariza, M.T., Miranda, L., Lozano, D., Medina, J.J., Soria, C., & Martínez-Ferri, E. (2020). Stability of fruit quality traits of different strawberry varieties under variable environmental conditions in the field. Agronomy, 10, 1242.

<https://doi.org/10.3390/agronomy10091242>

Stability of fruit quality traits of different strawberry varieties under variable environmental conditions in the field

L. Cervantes, M.T. Ariza, L. Miranda, J.J. Medina, C. Soria, E. Martínez-Ferri

Abstract

Strawberry fruits are highly appreciated by consumers due to their organoleptic and functional quality. Fruit quality traits can be affected by genotype x environment interactions, determining the final consumer acceptance of fruits. Traits stability under varying environments is necessary to ensure fruit quality of strawberries selected by breeding programs. In this work the inter- and intra-annual variation of the of organoleptic and functional fruit quality parameters of five strawberry varieties throughout four consecutive cropping seasons was analyzed to assess their relative stability. In most varieties, organoleptic parameters showed the higher inter-annual stability but the greater variability throughout the season, while the reverse was true for the functional quality parameters. Relative humidity and mean and minimum temperatures were the environmental variables that partially accounted for fruit quality variation but other factors along with the genotype, may also be influencing. Among the varieties, 'Splendor' displayed a greater year-on-year stability in organoleptic parameters, and 'Sabrina' and Candonga® showed higher inter- and intra-annual stability on functional fruit quality, respectively. Environmental variation did not affect fruit quality parameters similarly in all strawberry varieties. In 'Sabrina' and Candonga® antioxidant capacity (TEAC) was greater and stable throughout the cropping season, underlining TEAC as a tool for varietal selection, and suggesting these two varieties as parents for breeding programs seeking for healthy features and high quality fruits that meet consumer demands.

Keywords: Breeding; *Fragaria x ananassa*; fruit quality variability; environmental variation; genotype.

3. Efecto del nivel de exposición a la luz de los frutos sobre su calidad funcional en distintas variedades de fresa



Este capítulo corresponde al objetivo 1.2 de la Tesis Doctoral y ha sido publicado como:

Cervantes, L., Ariza, M.T, Gómez-Mora, J.A., Miranda, L., Medina, J.J., Soria, C., & Martínez-Ferri, E. (2019). Light exposure affects fruit quality in different strawberry cultivars under field conditions. Scientia Horticulturae, 252, 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.058>

Light exposure affects fruit quality in different strawberry cultivars under field conditions

L. Cervantes, M.T. Ariza, J.A. Gómez-Mora, L. Miranda, J.J. Medina, C. Soria & E. Martínez-Ferri.

Abstract

Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits are highly appreciated worldwide because of their flavour and their content on healthy-related compounds. Most of these compounds have antioxidant properties and photo-protective activities involved in plant response against environmental constrains, including light availability. Thus, fruit quality might be affected by variation in environmental factors such as light conditions. A field experiment, performed under conventional cropping conditions, was designed for assessing the effects of the light exposure level of fruits on fruit quality parameters in four strawberry cultivars ('Sabrina', 'Fortuna', 'Splendor' and 'Primoris') during a cropping season. To assess to what extent strawberry genotypes are able to modulate their fruit quality traits in response to light conditions, a plasticity index was calculated for a quantitative estimation of the amount of phenotypic change induced by the environment (i.e., light-exposure) on the different strawberry cultivars.

Results showed that proportion of exposed fruits compared to non-exposed ones was similar in all cultivars despite their differences in canopy size. This was achieved by modulating peduncle length: the higher the canopy size, the higher the peduncle length. This work also demonstrates that light incidence influences strawberry fruit quality - flavour and antioxidant content- and that the responsiveness to light conditions, estimated by the plasticity index, of strawberry fruits is genotype dependent. These results are suggesting differences among cultivars in the ability of adapting to variable light environments, and their significance in a breeding context and from an applied point of view is discussed.

Keywords: antioxidant, breeding, canopy size, peduncle, phenotypic plasticity, radiation.

4. Evaluación de la interferencia de los reactivos de la digestión *in vitro* en la cuantificación de los compuestos antioxidantes: consideraciones metodológicas para su uso como método de aproximación al estudio *in vivo*

Este capítulo corresponde al objetivo 2.1 de la Tesis Doctoral y ha sido publicado como:

Cervantes, L., Martínez-Ferri, E., Carrera, M., Soria, C., & Ariza, M.T. (2019). Effectiveness of different depuration procedures in removing reagents interference on in vitro digested strawberry extracts for reliable antioxidant determinations. Journal of Berry Research, 9, 473–481. <https://doi.org/10.3233/JBR-190385>

Effectiveness of different depuration procedures in removing reagents interference on *in vitro* digested strawberry extracts for reliable antioxidant determinations

Lucía Cervantes, Elsa Martínez-Ferri, Marta Carrera, Carmen Soria & María Teresa Ariza.

Abstract

Healthy benefits associated with strawberries consumption are mostly related to their antioxidant composition, mainly polyphenols. Quality assessment on fresh fruits is commonly done by spectrophotometric methods, but intake and digestion may alter their composition and healthy properties. To assess antioxidants bioavailability at different gastrointestinal-tract levels, *in vitro* digestion (*IvD*) simulations are used but reagents involved in may interfere in antioxidant determinations despite depuration procedures are employed. To test the magnitude of reagents interference in *IvD* approaches and the effectiveness of different depuration procedures for reliable antioxidant quantifications on strawberries.

IvD assays were done with water and strawberry samples to obtain digested fractions (gastric and intestinal). After passing-through hydrophilic cotton, digested extracts were subjected to different depuration procedures: centrifugation, Sep-Pack and 0.45 μ m nylon-filter. Antioxidant content and capacity were evaluated spectrophotometrically.

IvD reagents interfered in all antioxidant determinations, especially in the intestinal fractions. Depuration procedures differed in their effectiveness for reagents removal and in their antioxidant retrieval efficiency, with hydrophilic cotton displaying better recovery efficiency.

Reagents interference should be considered for antioxidant content and capacity determinations after *IvD* but, for reliable estimations of healthy compounds of food matrices, depuration methods should prioritize antioxidant recovery over reagents removal.

Keywords: bioavailability; biliar salts; pepsin; gastrointestinal digestion; phenolic compounds; spectrophotometric.

5. Análisis interespecífico de la biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes en distintos frutos rojos

Este capítulo corresponde al objetivo 2.2 de la Tesis Doctoral y ha sido publicado como:

Cervantes, L., Martínez-Ferri, E., Soria, C., & Ariza, M.T. (2020). Bioavailability of phenolic compounds in strawberry, raspberry and blueberry: Insights for breeding programs. Food Bioscience, 37, 100680. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100680>

Bioavailability of phenolic compounds in strawberry, raspberry and blueberry: Insights for breeding programs.

Lucía Cervantes, Elsa Martínez-Ferri, Carmen Soria, & María Teresa Ariza.

Abstract

Epidemiological studies have related berry intake to healthiness, which has been mainly associated with the polyphenolic content and the antioxidative properties of raw fruits. However, the digestion process can affect antioxidant release (bioaccessibility) and absorption (bioavailability) from fruit food matrices (i.e., digestibility), which also depend on their dietary fiber content, which together determine the potential health benefits of berry species.

In this study, digestibility of strawberry, raspberry and blueberry phenolic compounds, was evaluated after *in vitro* digestion and compared to antioxidant content and capacity of their raw fruits for a more reliable assessment of their potential healthful effects. These berry species also differed in their fruit dietary fiber content. The polyphenolic profiles of fruits were quantified using spectrophotometry and HPLC. Results showed no consistency between antioxidant content and capacity of raw and digested fruits in the three berries. Blueberry showed the highest antioxidant capacity (AC) associated with higher total phenolic content in raw fruits whereas, after digestion, strawberry (with a lower dietary fiber content), showed the highest total phenolic content and AC in the bioavailable fractions ('AC-bioavailable'). These results suggested that 'AC-bioavailable' may be an useful index to select for wholesomeness genotypes within berry breeding programs.

Keywords: antioxidant capacity, strawberry, raspberry, blueberry, digestibility, simulated digestion.

6. Análisis intraespecífico de la biodisponibilidad y bioactividad de los compuestos antioxidantes en distintas variedades de fresa.

Este capítulo corresponde al objetivo 2.3 de la Tesis Doctoral y se encuentra en preparación para su envío a Food Chemistry.

Bioavailability and bioactivity of strawberry antioxidant compounds: intraspecific analysis

6.1. Introduction

Over the past few decades there has been a significant shift in the general attitude of consumers towards the relation between food and health. They have increased its concern on the food health benefits in a broad sense, both in terms of positive effects and disease prevention. As a result, functional foods with nutraceutical compounds are progressively hitting the market, meeting the consumers growing demand.

In this context, strawberries are among the most consumed fruits worldwide, not only because of their tasty flavour and nutritional value (Nile & Park, 2014; Talcott, 2007) but also because of their functional quality. This quality is based on a natural source of phytochemicals (Nile & Park, 2014; Giampieri et al., 2012; Azzini et al., 2010), polyphenols mostly, that act as potent antioxidants with a proven range of biological effects. The health benefits associated with these polyphenols are based on counteracting the oxidative stress produced as a result of the cell metabolism, through their antioxidative properties. However, the imbalance between antioxidants *versus* oxidative stress has been proposed as one of the main risk factors conducting to several chronic diseases, such as cardiovascular diseases or cancer, among others (Willcox et al., 2004).

In strawberry, polyphenols are one of the major contributors to the total antioxidant capacity (i.e., AC) of fruits (Ariza et al., 2016; Stoner & Seeram, 2011; Wang et al., 2018), which is defined as the ability of antioxidant compounds to protect a biological system against the potentially harmful effect of processes or reactions involving reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS; Karadag et al., 2009). In this sense the AC is considered as an integrative parameter of their antioxidative properties and, therefore, AC could be suggested as a reliable index for the estimation of healthy effect on cells (bioactivity; Li et al., 2017).

In an overall perspective, strawberry cultivation includes a wide range of varieties as a result of several breeding programs developed throughout the world to obtain genotypes adapted to the agroclimatic conditions of specific areas. Thus, these varieties may have both different amount and composition of antioxidants (Mezzetti et al., 2018; Tulipani et al., 2008) and, however, could present a unique impact on consumer health due to the different contribution of specific compounds to their antioxidant capacity (Wang, 2011).

Thereby, the phytochemical composition of each variety and the contribution of each compound to the fruit AC is only the first step for the correct assessment of the functional quality of a strawberry variety. Besides the chemical composition, the health-promoting effects of food matrices depend also on the release and transformations their antioxidants suffer along the gastrointestinal tract during the intake and digestion (Sengul et al., 2014; Granese et al., 2014). This process conditions the release (bioaccessibility), absorption (bioavailability) and, therefore, the biological effects (bioactivity) of the polyphenol compounds of the strawberry varieties (Shahidi & Peng, 2018; Kosińska-Cagnazzo et al., 2015). Thus, the amount and type of polyphenols does not necessarily match in raw fruits compared to digested extracts and, therefore, neither with their potential healthful effects. This fact makes not feasible to select varieties for their AC in raw fruit and, therefore, hinders the selection of strawberry varieties with healthy attributes in upcoming breeding programs.

In vitro digestion models are powerful tools to simulate the physiological conditions occurring in human digestion, despite being more time consuming than the raw fruit antioxidants' extraction (Bohn et al, 2018; Minekus et al., 2014). However, they are currently used as a first approach to assess to what extent antioxidants of fruits are potentially released (i.e., bioaccessible) after intake, transformed and/or metabolised from the food matrix, and therefore, potentially absorbed (i.e., bioavailable; D'Archivio et al., 2010). Nevertheless, the absorption of this molecules does not warranty itself a beneficial action and bioactivity assays are needed.

Previous studies have revealed differences in both, quantity and type of antioxidants, and also AC, when different strawberry varieties and tissues were compared (Nowicka et al., 2019; Ariza et al., 2018a; Ariza et al., 2016), as well as in the quantity and AC of digested extracts compared to raw fruits (Cervantes et al., 2020; Ariza et al., 2018a; Thomas-Valdés et al., 2018; McDougall et al., 2005b). However, taking into account these differences, up to date it is unknown to what extent a higher AC bioavailable translates into greater bioactivity. Specifically, this refers to the necessity of checking if differences in AC bioavailable between varieties are translated, to a greater or lesser extent, in differences in their protective effects. Thus, this relationship would allow the selection of the most accurate indicator for healthy properties and would lead to the association of different strawberry profiles -defined by their antioxidants and AC bioavailable- with its bioactivity, and concomitantly to find varieties for breeding program focusing on selecting wholesome fruit.

For this reason, the aims of the present work were: i) to establish the pattern of release (and absorption, if applicable) of antioxidants and AC in different berries, ii) to define the major antioxidant group that contributes to AC and to evaluate the relationship between AC-bioavailable and AC-raw fruit in different varieties, iii) to analyze the effect of high AC-bioavailable extract on its bioactivity ,in order to select both, a reliable index for wholesomeness fruits and health varieties (as parental), useful for breeding programs.

6.2. Materials and Methods

6.2.1. Plant material and experimental design

Twelve short-day strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars (Table 6.1) were grown under similar agronomical field conditions in a complete randomized block design with three replicate plots of 50 plants, spaced at 30 x 25 cm. Plants were planted in mid-October 2017 at the IFAPA field experimental station “El Cebollar” in Huelva, Spain (lat. 37°16' N, long. 6°50' W, alt. 63 m a.s.l.) following conventional cropping practices of the Huelva region, the main berries

cropping area in Europe (Eurostat, 2018). Briefly, planting was done over mulched raised beds (35 cm high and 50 cm wide for strawberry) of sandy soil (4% clay, 10% loam, 85.74% sand and 0.26% organic matter) previously biosolarized (Domínguez et al., 2014). Polyethylene-covered tunnel structures of 150 μm thickness (macrotunnel; Ariza, et al., 2012) were installed in mid-November and removed at the end of the cropping season (early June). During the experimental season, mean maximum and minimum temperatures, under the tunnels, were $27.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $8.7 \pm 0.3^\circ\text{C}$, respectively. Under these conditions, agronomical performance of the study cultivars was similar to those of grown commercially, with main productive peaks in mid-May.

In order to assess polyphenol content and antioxidant capacity, 50 fresh and fully ripened strawberry fruits from each cultivar were harvested on each replicate plot in mid-April. Sampled fruits were immediately homogenized in a Multiquick MR 6500 blender from Braun (Kronberg, Germany), and puree samples were stored at -20°C until analyses were conducted.

Table 6.1. Strawberry varieties in the study and their breeder company.

Variety	Company	Variety	Company
Candongga ®	Planasa	'Marquis'	Driscoll's
'Charlene'	Nova Siri Genetics	'Melissa'	Nova Siri Genetics
'Flaminia'	Consorzio italiano vivaisti	'Primoris'	Fresas Nuevos Materiales
'Flavia'	Consorzio italiano vivaisti	'Rabida'	Fresas Nuevos Materiales
'Fortuna'	Univ Florida /Emcocal	'Rociera'	Fresas Nuevos Materiales
'Marisol'	Nova Siri Genetics	'Sabrina'	Planasa

6.2.2. Preparation of antioxidant extracts from berry fruits

6.2.2.1. Raw fruits: hydromethanolic extraction:

The antioxidant content and capacity in raw fruits of each cultivar were determined on hydromethanolic extracts obtained from ~ 1 g puree incubated in 10 ml of 80% methanol aqueous solution acidified with 0.1% HCl for 2h at room temperature (Ariza et al., 2016). Extracts were



centrifuged at 10000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatant was filtered and stored at -20°C until spectrophotometric and HPLC analyses.

6.2.2.2. *In vitro* digestion: digested fractions:

Potential release (bioaccessibility) and absorption (bioavailability) of antioxidant compounds on selected cultivars were evaluated by simulating an *in vitro* digestion process following the method of Gil-Izquierdo et al. (2002), with some modifications (Ariza et al., 2018a). Thus, 10 g of strawberry puree were diluted with distilled water (100 ml) and stirred with pepsin (0.734 mg/g) and HCl (reaching pH ~1.7-2) at 37°C for 2 h, simulating gastric conditions (gastric fraction). After gastric digestion, the pH of this mixture was raised to 7.8 with NaHCO₃ (7 M), and pancreatin and bile salts (9 mg/g and 56.25 mg/g, respectively) were added. The mixture was incubated at 37°C for 2 h, simulating intestinal digestion (intestinal fraction).

Simultaneously on each sequential phase, a dialysis membrane (molecular weight cut-off 12000–14000 Da) was immersed into each fraction, containing ultrapure water, for gastric fraction, or the amount of NaHCO₃ necessary to titrate the mixture of gastric digestion fraction to pH 7.8, for the intestinal one.

After each phase, an aliquot was collected and stored until analysis. The solution outside the dialysis membrane (i.e., Gastric fraction outside membrane: ‘G-Out’ and Intestinal fraction outside membrane: ‘I-Out’) represents the potentially released or bioaccessible fractions, while the solution contained inside the membrane (i.e., Gastric fraction inside membrane: ‘G-In’ and Intestinal fraction inside membrane: ‘I-In’) represent the potentially absorbed or bioavailable fractions.

All digested fractions collected were centrifuged at 4°C and 10000 rpm for 10 min and the supernatant was stored at -20°C until spectrophotometric and HPLC analyses. In order to avoid the interference of the *in vitro* digestion reactants on the spectrophotometric determinations, data were corrected as described in Cervantes et al. (2019b).

6.2.3. Determination of phenolic compounds

6.2.3.1. UV–Vis analysis:

Phenolic compounds and antioxidant capacity of the hydromethanolic extracts (raw fruits) and all digested fractions from the study strawberry genotypes were determined in triplicate by UV–Vis spectrophotometry, using a Shimadzu PharmaSpec UV-1700 instrument (Kyoto, Japan). Thus, the total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and total anthocyanin content (TAC) were assayed according to Ariza et al. (2018a). The antioxidant capacity (AC) was also evaluated by the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay as described by Ariza et al (2018a). Results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE), catechin equivalents (CAE), pelargonidin-3-glucoside equivalent (PE) and micromols of Trolox equivalents (TE) per 100 grams of fresh weight (FW), respectively.

6.2.3.2. HPLC quantification:

6.2.3.2.1. HPLC–DAD conditions.

HPLC analysis of phenolic compounds was assessed on an Agilent 1200 HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto-CA, USA) operated by a Windows based ChemStation software. The HPLC equipment was used with a diode array detector (DAD). System consisted of a quaternary pump, degasser, and auto sampler. The column used was a Zorbax Eclipse Plus C-18 LC Column (3.00 mm x 150 mm, 3.5 μ m) furnished with a guard column (4.6 mm x 12.5 mm, 5 μ m), both from Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto-CA, USA).

All samples were filtered through a 0.45 μ m filter (type Captiva Econofltr Nylon 25 mm, Agilent Technologies, Palo Alto-CA, USA) before HPLC analysis.

6.2.3.2.2. Chemicals and reagents.

The solvents used included ethanol, methanol, acetonitrile, acetic acid, formic acid and water, which were all purchased in HPLC-gradient grade from Sigma–Aldrich.

Chemical standards of cyanidin-3-O-glucoside chloride (CAS number 7084-24-4; purity \geq 96%; linear dynamic range 0.5–40 μ g/ml), pelargonidin-3-O-glucoside chloride (CAS number 18466-51-8; purity \geq 95%; linear dynamic range 0.5–40 μ g/ml), pelargonidin-3-o-rutinoside chloride (CAS number 33978-17-5; purity \geq 90%; linear dynamic range 0.5–40 μ g/ml), peonidin-3-O-glucoside chloride (CAS number 6906-39-4, purity \geq 95%; linear dynamic range 0.5–40 μ g/ml), malvidin chloride (CAS number 643-84-5, purity \geq 97%; linear dynamic range 5–40 μ g/ml), procyanidin B1 (CAS number 20315-25-7; purity \geq 90%; linear dynamic range 1–80 μ g/ml), procyanidin B2 (CAS number 29106-49-8; purity \geq 90%; linear dynamic range 1–80 μ g/ml), rutin (CAS number 153-18-4, purity \geq 99%; linear dynamic range 0.25–20 μ g/ml) and gallic acid (CAS number 149-91-7, purity \geq 99%) were purchased from Extrasynthese (Genay, France). Standards of myricetin (CAS number 529-44-2; purity \geq 98%; linear dynamic range 1–20 μ g/ml), kaempferol (CAS number 520-18-3; purity \geq 98%; linear dynamic range 0.05–20 μ g/ml), epicatechin (CAS number 490-46-0, purity \geq 98%; linear dynamic range 1–80 μ g/ml) and chlorogenic acid (CAS number 327-97-9, purity \geq 98%; linear dynamic range 0.5–20 μ g/ml) were purchased from Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (Sichuan, China). Standards of quercetin (CAS number 117-39-5; purity \geq 90%; linear dynamic range 0.05–20 μ g/ml), (+)-catechin hydrate (CAS number 225937-10-0; purity \geq 98%; linear dynamic range 1–80 μ g/ml), ellagic acid (CAS number 476-66-4; purity \geq 95%; linear dynamic range 1–16 μ g/ml), *p*-coumaric acid (CAS number 501-98-4; purity \geq 98%; linear dynamic range 0.5–20 μ g/ml), *trans*-cinnamic acid (CAS number 140-10-3; purity \geq 99%; linear dynamic range 0.5–20 μ g/ml) and caffeic acid (CAS number 331-39-5, purity \geq 98%; linear dynamic range 0.5–20 μ g/ml) were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Stock standard solutions of individual compounds in methanol were prepared at a 500 mg/l concentration and stored at -20°C . Multi-compound working standard solutions were also prepared by dilution of the stock solutions in methanol and stored at -20°C in amber coloured vials. Thus, different concentration of working standard solutions were used to build the

calibration curve for each compound so that quantifying the analyte concentrations can be reliably detected (above the limit of detection; LOD).

6.2.3.2.3. HPLC–DAD analyses.

The quantification of the individual compounds of a strawberry sample -or multi-compound working standard solutions- was assayed by injecting a 20 µl aliquot into the column and eluted at 35°C at a constant flow rate of 0.4 ml/min.

For the determination of phenolic acids and flavanols, the mobile phase consisted on water containing 2% acetic acid (v/v) (Component A) and acetic acid/ water/acetonitrile mixture (1:49:50, v/v/v; Component B). The gradient used was as follows: 10 min at 90% A, from 90% to 45% A in 50 min, from 45% to 2% A in 10 min, from 2% to 90 % in 2 min and hold 90% A for 10 min. The total run time was 82 min, and during that time a diode-array detector (DAD) in the full-scan mode (200–600 nm) was used to determine phenolic acids and flavanols. The maximum characteristic wavelengths for the analytes were 309 nm for *p*-coumaric acid; 280 nm for gallic acid, ellagic acid, *trans*-cinnamic acid, procyanidin B1, procyanidin B2, (+)-catechin hydrate and epicatechin, and 320 nm for chlorogenic and caffeic acid.

For the determination of flavonols and anthocyanins, the mobile phase consisted of water/formic acid/acetonitrile (87:10:3, v/v/v; Component A) and water/formic acid/acetonitrile (40:10:50, v/v/v; Component B). The gradient used was as follows: from 90% to 75% A in 10 min, from 75% to 69% A in 5 min, from 69% to 60% A in 5 min, from 60% to 50% A in 10 min, from 50% to 0 % in 10 min, hold for 5 min, then from 0% to 90% A in 5 min and hold for 3 min. The total run time was 53 min, and a DAD was used in the full-scan mode (wavelength range 200–600 nm) to determine flavonols and anthocyanins. The maximum characteristic wavelengths for the analytes were 370 nm for rutin, myricetin, quercetin, naringenin and kaempferol; and 520 nm for cyanidin-3-O-glucoside chloride, pelargonidin-3-O-glucoside chloride, pelargonidin-3-O-rutinoside chloride, peonidin-3-O-glucoside chloride and malvidin.

6.2.4. Bioactivity assay of the strawberry digested extracts

The effect of bioavailable extracts of selected strawberry cultivars on cells was assessed by analysing intracellular ROS production and apoptosis induction on HepG2 cells cultures.

Prior to ROS and apoptosis assessment, the concentration of each digested fraction was selected taking into account our previous works with commercial strawberry cultivars (Ariza et al., 2018b), where the concentrations employed for each fraction as well as the stressor agent concentration (AAPH) were chosen according to the MTT viability assay ensuring a vitality greater than 90%. Thus, for ROS and apoptosis assays, cells were treated for 24h with the gastric or intestinal strawberry bioavailable fraction at two chosen concentrations (2 and 5µg/ml), in presence or absence of AAPH (2.5 mM). Data were reported as a mean value of three independent analyses.

6.2.4.1. Culture of HepG2 cells:

HepG2 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC ® CL-173TM) and were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin until 80-90% of confluence when sub-cultured. Cells were maintained in an HeraCell CO₂ incubator at 37°C with 5% CO₂.

6.2.4.2. Evaluation of intracellular ROS production:

Evaluation of intracellular ROS production was performed through the CellROX® Oxidative Stress Kit (Invitrogen TM, Life Technologies, Milan, Italy) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded in 6-well plates at a density of 1.5x10⁵cells/well and treated with the selected concentrations of the gastric or intestinal strawberry bioavailable fraction, in the presence or absence of AAPH. After treatment, cells were washed twice with PBS and detached by trypsinization with 0.5 ml of trypsin-EDTA

solution for 2-5 min at 37°C in 5% CO₂ incubator. The trypsin was neutralized with 1.5 ml of complete medium and cells were collected prior to centrifugation at 1500 rpm for 10 min at 4°C. Then, the supernatant was discarded and pellet was re-suspended in 1 ml of complete medium. CellROX® Orange Reagent was added at a final concentration of 5 µM, samples were incubated for 30 min at 37°C, centrifuged to remove medium and dye excesses, and re-suspended again in PBS. After that, cells were analyzed with the Tali® Image-Based cytometer (Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy). Untreated cells, which were also labeled with CellROX® Orange Reagent, were used to determine baseline levels of oxidative activity. Results were expressed as the fold increase of the intracellular ROS content compared to the control.

6.2.4.3. Evaluation of apoptosis:

For apoptosis quantification, the Tali™ Apoptosis Assay Kit–Annexin V Alexa Fluor® 488 (Invitrogen TM, Life Technologies, Monza, Italy) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded in 6-well plates at a density of 1.5 x 10⁵ cells/well and treated with the selected concentrations of the gastric or intestinal strawberry bioavailable fraction, in the presence or absence of AAPH. After treatment, cells were washed twice with PBS and detached by trypsinization with 0.5 ml of trypsin–EDTA solution for 2–5 min at 37°C in a 5% CO₂ incubator. The trypsin was neutralized with 1.5 ml of complete medium and cells were collected prior to centrifugation at 1500 rpm for 10 min at 4°C. Then, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 100 µl of annexin binding buffer (ABB), and 5 µl of Annexin V Alexa Fluor® 488 was added, mixed well, and incubated in the dark at room temperature for 20 min. Cells were then centrifuged at 1000 rpm for 5 min, resuspended in 100 µl of ABB, and then 1 µl of Tali™ Propidium Iodide was added, mixed well, and incubated in the dark at room temperature for 5min. Samples were analyzed with the Tali® Image-Based

cytometer and the percentage of live, dead, and apoptotic cells was determined on the basis of the respective fluorescence.

6.2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statistix software 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). Data were subjected to ANOVA, and differences among means were assessed using Tukey honest significant difference (HSD) Prior to ANOVA, normality and homogeneity were tested using the Kolmogorov-Smirnov test and Cochran's C test, respectively.

6.3. Results and Discussion

The total content of phenolics (TPC), flavonoids (TFC), anthocyanins (TAC), and the antioxidant capacity (AC), in twelve strawberry varieties were determined on raw fruits using UV–Vis spectrophotometer before (hydromethanolic extract) and after *in vitro* digestion (digested fractions). The phenolic profiles of both types of extracts were also established on selected varieties, using HPLC–DAD, and bioactivity assays for evaluating the protective effects against oxidative damage in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells.

6.3.1. Polyphenol composition and antioxidant capacity of strawberry raw fruits

Table 6.2 shows TPC, TFC, TAC, as well as AC, for the twelve strawberry varieties. In the raw fruits, the antioxidant content of the study varieties varied from 181.49–226.10 mg GAE/100 g FW in TPC, 74.38–133.46 mg CAE/100 g FW in TFC, 13.78–24.92 mg PE/100 g FW in TAC and 32.27–53.97 $\mu\text{mol TE/g FW}$ in AC. Although they were in similar range to those previously reported for many strawberry genotypes (Nowicka et al., 2019; Gündüz & Özdemir, 2014;

Tulipani et al., 2008), there was variability in the antioxidant compounds and capacity among varieties according to previous works (Nowicka et al., 2019), suggesting that genotypic differences in the *Fragaria x ananassa* varieties are an important factor for assessing strawberry fruit quality.

These differences in the strawberry composition were not of the same magnitude in every polyphenol group. In this sense, TPC was the parameter with the lowest variability in terms of variation coefficient (CV; 7.68%, 20.71%, 19.48% and 14.69% for TPC, TFC, TAC and AC respectively). These figures are indicative of the existing genetic variability, since environmental factors are diminished because all study varieties are cropped under the same conditions.

Regarding the antioxidant composition (Table 6.2.), 'Flaminia' and 'Primoris' showed the highest content of TPC and TFC, while the reverse was true for 'Fortuna' and 'Charlene'. However, 'Fortuna' stood out as the variety with the highest TAC, in contrast to the lower level of 'Marquis', 'Charlene' and 'Rabida'. The highest and lowest AC was found in 'Primoris' and 'Rabida', respectively, which, in contrast with their high TPC, suggested that the contribution of each polyphenol group on each variety to the antioxidant capacity may differ, which could explain the absence of global correlations between TPC and AC, or TAC and AC although correlations showed a global trend between TFC and AC ($R^2=0.4029$; $p<0.05$).

The results obtained in previous studies confirmed that strawberry fruit has high antioxidant properties (Tulipani et al., 2008; Ariza et al., 2018a), represented by the parameter AC as an integrative parameter related to the healthy promoting properties (Ariza et al., 2016; Stoner & Seeram, 2011; Wang et al., 2018). In addition, in our results this antioxidant potential of strawberries could be associated partly with the polyphenol composition (as seen in the correlation with TFC; Table 6.2), but also other polyphenol-type compounds could be involved, such as tannin compounds as suggested by Nowicka et al. (2019).

The differences observed in the polyphenol amounts did not translate into differences in the polyphenol profile, as the strawberry varieties maintained, to a great extent, the proportion of

each polyphenol group (Table 6.2). Thus, the TFC and the TAC ratios were similar for the study varieties (~40% and ~10%, respectively). This result also indicated that, despite a variation in the composition of polyphenolics among varieties existed, the proportion of phenolic compounds is nearly stable within the genotypes studied, in contrast to what described in Cervantes et al. (2020) when comparing to other berry species, such as raspberry or blueberry.

Table 6.2. Total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), total anthocyanin content (TAC) and antioxidant capacity (AC) of raw fruits from twelve commercial strawberry varieties following conventional cropping practices. Different letters indicate significant differences on the antioxidant composition among varieties ($p < 0.05$).

	TPC*		TFC*		TAC*		AC #		TFC/TPC ratio	TAC/TPC ratio
Candongga®	187.14 ± 8.34	de	83.06 ± 10.63	de	19.82 ± 0.87	bcd	42.13 ± 3.23	cde	0.44	0.11
'Charlene'	184.72 ± 5.39	de	90.89 ± 3.16	cde	13.96 ± 1.53	e	47.60 ± 3.66	abc	0.49	0.08
'Flaminia'	226.10 ± 10.46	a	133.46 ± 5.90	a	16.78 ± 1.57	de	48.49 ± 0.92	abc	0.59	0.07
'Flavia'	211.59 ± 12.23	abcde	86.36 ± 0.49	de	22.55 ± 1.07	abc	46.09 ± 3.80	bcd	0.41	0.11
'Fortuna'	181.49 ± 7.22	e	79.29 ± 1.14	e	24.92 ± 1.68	a	35.24 ± 0.39	ef	0.44	0.14
'Marisol'	188.48 ± 6.26	cde	78.81 ± 1.89	e	20.96 ± 0.51	abcd	50.85 ± 4.42	ab	0.42	0.11
'Marquis'	224.22 ± 7.38	ab	106.85 ± 4.50	bc	13.87 ± 1.23	e	40.80 ± 3.53	cde	0.48	0.06
'Melissa'	198.69 ± 9.77	bcde	74.38 ± 13.9	e	19.05 ± 1.28	cd	38.87 ± 0.94	def	0.37	0.10
'Primoris'	214.55 ± 9.41	abc	123.55 ± 4.80	ab	23.69 ± 1.10	ab	53.97 ± 1.11	a	0.58	0.11
'Rábida'	215.89 ± 13.32	ab	84.85 ± 3.15	de	13.78 ± 1.78	e	32.27 ± 2.46	f	0.39	0.06
'Rociera'	205.41 ± 8.08	abcde	98.82 ± 2.27	cd	19.69 ± 1.80	bcd	41.80 ± 1.72	cde	0.48	0.10
'Sabrina'	197.35 ± 10.74	bcde	74.94 ± 6.30	e	19.51 ± 2.21	bcd	41.14 ± 1.19	cde	0.38	0.10

*mg standard/100 g FW; #µmol TE / g FW

In addition, the characterization of the raw fruits has some limitations for assessing the fruit healthy potential, since the physiologic processes after the intake affect the release from the food matrix and the absorption of the antioxidant compounds (Ariza et al., 2018a; Cervantes et al., 2020). This situation highlights the necessity of employing *in vitro* digestion assays in order to mimic the physiological conditions when the fruits are consumed.

6.3.2. Polyphenol composition and antioxidant capacity after *in vitro* digestion

Observed the differences on antioxidants in the study varieties, 5 out of the 12 initial strawberry varieties were selected due to their contrasting profile of antioxidants (Table 6.3). In order to analyze the effect of digestion process on the potential release and absorption of antioxidants, the *in vitro* digestion process was assessed, and the content of bioavailable polyphenols has been summarized in Table 6.4.

	TPC	TFC	TAC	AC
'Primoris'	H	H	H	H
'Fortuna'	L	L	H	L
'Flaminia'	H	H	L	H
'Marquis'	H	H	L	L
'Charlene'	L	L	L	H

Table 6.3. Simplification of the polyphenol profile (total phenolic content: TPC; total flavonoid content: TFC; total anthocyanin content: TAC; and antioxidant capacity: AC) in raw fruit of 5 selected strawberry varieties. H: high or L: Low amount of antioxidants.

Table 6.4. Comparison of the antioxidant composition of raw fruit extract and bioavailable fractions (after *in vitro* digestion process) in five strawberry varieties. The total potential bioavailability has been calculated from the absorbed fraction gastric + intestinal. Different letters designate significant differences on the antioxidant composition among varieties ($p < 0.05$).

	'Primoris'	'Fortuna'	'Flaminia'	'Marquis'	'Charlene'
TPC*					
Raw fruit	214.55 ± 9.41 a	181.49 ± 7.22 b	226.10 ± 10.46 a	224.22 ± 7.38 a	184.72 ± 5.39 b
Gastric Absorbed	85.00 ± 1.30 a	71.37 ± 2.03 b	49.32 ± 3.14 c	43.36 ± 0.38 cd	37.71 ± 0.96 d
Intestinal Absorbed	57.55 ± 1.75 b	67.28 ± 2.35 a	20.36 ± 0.93 d	23.25 ± 0.56 cd	26.54 ± 2.04 c
Total bioavailability	113.85 ± 13.02 b (53.07%)	134.72 ± 2.31 a (74.23%)	74.42 ± 3.76 c (32.91%)	67.14 ± 0.44 c (29.95%)	67.50 ± 1.27 c (36.54%)
TFC*					
Raw fruit	123.55 ± 4.80 a	79.29 ± 1.14 c	133.46 ± 5.90 a	106.85 ± 4.50 b	90.89 ± 3.16 c
Gastric Absorbed	5.84 ± 0.09 a	3.10 ± 0.07 c	6.40 ± 0.28 a	6.52 ± 0.09 a	4.55 ± 0.35 b
Intestinal Absorbed	5.66 ± 0.13 b	3.35 ± 0.10 c	8.29 ± 0.27 a	7.85 ± 0.26 a	4.87 ± 0.85 bc
Total bioavailability	11.35 ± 0.22 bc (9.19%)	6.54 ± 0.06 d (8.25%)	15.10 ± 0.75 a (11.31%)	14.44 ± 0.30 ab (13.52%)	10.53 ± 0.56 c (11.59%)
TAC*					
Raw fruit	23.69 ± 1.10 a	24.92 ± 1.68 a	16.78 ± 1.57 b	13.87 ± 1.23 b	13.96 ± 1.53 b
Gastric Absorbed	1.86 ± 0.05 c	4.02 ± 0.20 a	1.43 ± 0.02 c	1.80 ± 0.04 c	3.05 ± 0.19 b
Intestinal Absorbed	1.04 ± 0.11 bc	1.20 ± 0.06 b	0.00 ± 0.00 c	2.14 ± 0.11 b	3.63 ± 0.37 a
Total bioavailability	2.72 ± 0.12 bc (11.48%)	5.14 ± 0.42 a (20.62%)	1.39 ± 0.03 b (8.28%)	3.65 ± 0.08 ab (26.30%)	6.44 ± 0.76 a (46.16%)
AC[#]					
Raw fruit	53.97 ± 1.11 a	35.24 ± 0.39 c	48.49 ± 0.92 a	40.80 ± 3.53 bc	47.60 ± 3.66 ab
Gastric Absorbed	1.04 ± 0.02 c	0.36 ± 0.03 d	1.64 ± 0.07 b	2.47 ± 0.03 a	1.10 ± 0.05 c
Intestinal Absorbed	2.90 ± 0.14 c	4.04 ± 0.19 b	5.54 ± 0.10 a	5.18 ± 0.20 a	3.10 ± 0.21 bc
Total bioavailability	4.02 ± 0.13 b (7.44%)	4.17 ± 0.24 b (11.82%)	7.19 ± 0.09 a (14.82%)	7.66 ± 0.18 a (18.77%)	4.37 ± 0.19 b (9.18%)

*mg standard/100 g FW; [#]μmol TE / g FW

After *in vitro* digestion, all analyzed strawberries presented a different polyphenolic composition and antioxidant capacity in the released fractions in comparison to the raw material (data not shown), in agreement with similar previous studies in strawberry (Ariza et al., 2018a; Cervantes et al., 2019). All varieties showed an increase in the TPC amount in the bioaccessible fractions while a decrease for TFC, TAC and AC, highlighting the uneven effect of the digestion process to the different compounds. This TPC decrease is also evident in other strawberry varieties (Cervantes et al., 2020), but is contrasting with other food matrices like the tea extract (Record & Lane, 2001), grapes (Granese et al., 2014), pomegranate (Perez-Vicente et al., 2002), raspberry or blueberry (Cervantes et al., 2020), which could imply either a different interaction of the phenolic compounds with the food matrix in different species or differences on the transformation rate of the phenolic compounds in comparison to phenolics with higher molecular weight, such as flavonoids or anthocyanins, among others.

Despite strawberry raw fruits are nearly in the same range of antioxidants composition, and since they are genotypes of the same specie with a conserved pedigree, it would be expected a similar effect of the digestion process in all genotypes. However, despite a common trend in the effect of the digestion process respect to the raw fruit, it affected to a different extent in the strawberry varieties, in accordance with previous research (Carbonell-Capella et al., 2014; Marhuenda et al., 2016; Quan et al., 2018). Thus, the potential release and absorption of the antioxidant compounds was not proportional for all the varieties, since 'Primoris' was one of the genotypes with the highest TPC, TFC TAC and AC in raw fruit, but it was not translated to the highest content after the *in vitro* digestion. The lack of proportionality in the potential release and absorption compared to the raw fruit content could be explained by the conditions of the digestion process along with the heterogeneous antioxidant composition (described in section 3.1) that could be producing a different pattern of molecules' transformations and degradations on each variety.

Regarding the potential absorption of each antioxidant group, it was noteworthy that despite TPC, TFC and TAC being equally or highly absorbed at the gastric level on each variety, the AC showed higher levels of intestinal absorption. These figures are indicating that the compounds released and absorbed at gastric level presented lower AC in comparison with the bioavailable compounds obtained in the intestinal fractions. For each variety, the total bioavailable fraction made it possible to compare the amount of each antioxidant group after the application of hydrometanol extraction methods and after *in vitro* digestion. In this sense, a higher amount of total bioavailable polyphenol group did not warranty a higher rate of recovery, since it also depended on the content before digestion. These results showed that the mayor proportion of TPC bioavailable was assessed in 'Fortuna' (74.23% of TPC in raw fruit was also absorbed in digestion), in contrast to the nearly 30% showed by 'Marquis'. The opposite tendency was found for TFC, with 'Marquis' as the variety with higher proportion of potential absorption and 'Fortuna' with the lower. 'Charlene' showed, in turn, the highest potential absorption for the total anthocyanin content (46.16%), a 1.76-fold higher TAC than the closest variety ('Marquis') and a 5.57-fold higher than 'Flaminia', the variety with lower bioavailability for this group. As expected, a different composition in raw fruits (section 6.3.1) gave rise to a different release and absorption among varieties.

Although some previous works have highlighted the relation between TPC and health promoting properties in many fruits through their antioxidant properties (i.e., AC), our results were in concordance with Tulipani et al. (2008), showing no correspondence between the TPC and its AC in raw fruits (AC_{RF}) (section 6.3.1), and this same tendency was followed for the absorbed fractions. Thus, 'Primoris' and 'Fortuna' showed the highest TPC bioavailable and the lowest AC bioavailable (AC_{BD}), but the contrary was true for 'Flaminia' and 'Marquis'.

As it has not been possible to establish a relationship between the analyzed phenolic groups and the AC, it would be interesting to be able to identify some individual compound as

the maximum responsible for AC_{RF} and/or AC_{BD} . Therefore, analyzing the composition of individual compounds of the selected varieties before and after digestion is required.

6.3.3. Comparative quantification of individual compounds and its bioavailability

In order to characterize the composition in individual phenolic compounds of raw fruit and digested extracts, two varieties have been selected by their contrasting pattern of AC_{RF} and AC_{BD} . Thus, 'Marquis' and 'Primoris' were chosen for this characterization using HPLC-DAD analysis (Table 6.5).

In raw fruit, the amount of analyzed compounds was generally similar or statistically higher in 'Primoris', for both the raw material and digested absorbed samples, with the exception of gallic acid and procyanidin B1 and B2 which their content were higher in the raw fruit of 'Marquis'. However, in both, gastric and intestinal fractions, the individual phenolic compounds seemed not to be correlated with the results of the AC_{BD} , because they showed significantly higher values in 'Primoris' compared to 'Marquis', although the AC_{BD} of 'Marquis' was higher than in 'Primoris' (Table 6.4). Thus, it was found no correspondence between the gastric and intestinal bioavailability and the values of AC_{BD} (Table 6.4) in these two varieties. This result is suggesting that the higher AC_{BD} found in 'Marquis' may not be related to (or not exclusively) the polyphenols assayed, despite they were previously selected for being the most representative strawberry polyphenol compounds, and therefore, more efforts are needed in order to identify and characterize them in these varieties. As it has been discussed previously in section 6.3.1, the composition among varieties is diverse and in concordance to this result the polyphenols selected may not be contributing to a greater extent to the AC_{BD} in these varieties.

When comparing the amount of each compound in the bioavailable fractions in comparison to raw fruits, some compounds arose above 100% recovery (gallic acid, epicatechin in both varieties and myricetin in 'Primoris'), meaning that the conditions during the digestion could be producing changes of other compounds resulting in these polyphenols. Besides, a varietal

difference was observed, since 'Primoris' generated 3-fold the gallic acid generated by 'Marquis'. In this sense, this overgeneration could be produced by degradation of gallotannins, as demonstrated in tea extracts by human pharmacokinetics studies (Shahrzad et al., 2001). On the other hand, most of the phenolic compounds analyzed showed a recovery lower than 100% or even no-quantified compounds. This fact highlighted the transformations due to the *in vitro* digestion conditions (Brown et al., 2012), even leading to the degradation of molecules, and also that these transformations differed between berry extracts since it seemed to be dependent on the overall phenolic composition of each extract as suggested previously.

Table 6.5. Composition on phenolic acids and hydrolysable tannins, flavanols, flavonols and anthocyanins of two strawberry varieties ('Marquis' and 'Primoris') raw fruits and digested fractions. The total potential bioavailability has been calculated from the absorbed fraction gastric + intestinal, and the percentage of the recovery of each compound in the bioavailable fractions respect to the raw fruits is shown in brackets. Different letters designate significant differences on the antioxidant composition among varieties for the same fraction ($p < 0.05$).

	<i>Raw Fruit</i>		<i>Gastric bioavailability</i>		<i>Intestinal bioavailability</i>		<i>Total bioavailability</i>		
	<i>'Marquis'</i>	<i>'Primoris'</i>	<i>'Marquis'</i>	<i>'Primoris'</i>	<i>'Marquis'</i>	<i>'Primoris'</i>	<i>'Marquis'</i>	<i>'Primoris'</i>	
Phenolic acids and hydrolysable tannins	Gallic acid	1.68 ± 0.02 a	0.95 ± 0.16 b	0.77 ± 0.07 a	0.86 ± 0.03 a	1.21 ± 0.01 b	2.05 ± 0.08 a	1.98 ± 0.07 (117.86%) b	2.90 ± 0.11 (305.26%) a
	Chlorogenic acid	4.19 ± 0.24 b	39.59 ± 1.77 a	1.07 ± 0.11 b	7.43 ± 0.36 a	0.35 ± 0.03 b	0.65 ± 0.16 a	1.42 ± 0.14 (33.89%) b	7.86 ± 0.49 (19.85%) a
	Caffeic acid	0.74 ± 0.02 b	1.03 ± 0.07 a	0.28 ± 0.00 b	0.35 ± 0.01 a	<LOD b	0.33 ± 0.01 a	0.28 ± 0.00 (37.84%) b	0.68 ± 0.02 (66.02%) a
	p-Coumaric acid	0.50 ± 0.01 a	0.51 ± 0.01 a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Ellagic acid	20.62 ± 3.69 b	117.38 ± 4.30 a	1.76 ± 0.43 b	9.52 ± 0.27 a	<LOD	<LOD	1.76 ± 0.43 (8.53%) b	9.52 ± 0.27 (8.11%) a
	trans-Cinnamic acid	0.28 ± 0.00 b	0.42 ± 0.03 a	<LOD b	0.13 ± 0.00 a	0.12 ± 0.00 b	0.17 ± 0.01 a	0.12 ± 0.00 (42.86%) b	0.30 ± 0.01 (71.42%) a
Flavanols	Procyanidin B1	16.48 ± 0.16 a	13.80 ± 0.79 b	0.07 ± 0.05 a	<LOD b	<LOD	<LOD	0.07 ± 0.05 (0.42%)	<LOD
	Catechin	16.18 ± 0.31 a	16.84 ± 0.27 a	1.02 ± 0.09 a	0.92 ± 0.10 a	2.19 ± 0.19 a	1.87 ± 0.27 a	3.21 ± 0.17 (19.84%)	2.79 ± 0.37 (16.56%)
	Procyanidin B2	7.12 ± 0.08 a	5.71 ± 0.16 b	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Epicatechin	<LOD	<LOD	0.94 ± 0.03 b	1.07 ± 0.03 a	<LOD	<LOD	0.94 ± 0.03 (100%) b	1.07 ± 0.03 (100%) a
Flavonols	Rutin	1.37 ± 0.07 a	1.57 ± 0.34 a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Myricetin	0.33 ± 0.09 a	0.44 ± 0.07 a	<LOD	<LOD	<LOD b	0.57 ± 0.00 a	<LOD b	0.57 ± 0.00 (129.55%) a
	Quercetin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	Kaempferol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Anthocyanins	Cya-3-glu	0.80 ± 0.03 b	1.75 ± 0.24 a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	PeI-3-glu	14.65 ± 0.42 b	26.84 ± 1.58 a	1.28 ± 0.08 b	2.08 ± 0.11 a	0.33 ± 0.08 a	0.30 ± 0.04 a	1.60 ± 0.01 (10.92%) b	2.38 ± 0.08 (8.87%) a
	PeI-3-rut	1.18 ± 0.07 a	1.31 ± 0.03 a	0.17 ± 0.01 b	0.25 ± 0.01 a	0.01 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a	0.17 ± 0.00 (14.41%) b	0.30 ± 0.01 (22.90%) a
	Peo-3-glu	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

mg standard/100 g FW

These different results for ‘Marquis’ and ‘Primoris’ pointed to a varietal bias whereby the composition and type of polyphenols are modified during the digestion process and, consequently, a different health-promoting effect could be expected.

In the view of the results, the higher AC after digestion (AC_{BD}) of ‘Marquis’ in comparison to ‘Primoris’ could not be explained with the composition in individual polyphenolic. However, in order to consider this parameter as an indicator of the strawberry healthy properties, a bioactivity assay of these fractions in varieties with a contrasting profile is needed.

6.3.4. Bioactivity assessment of strawberry on HepG2 cells

In order to attribute a potential health effect to the strawberry samples, the protective effects against oxidative damage of digested extracts was evaluated in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2). For this assay only the bioavailable fractions were selected as they are considered to be the extracts that reach the cells after the intake, and thus, the unique sample that could produce a beneficial effect.

In control cells, a basal amount of intracellular ROS is quantified and, as expected, cells treated with a stressor agent (AAPH) increased the intracellular ROS levels compared to control cells (untreated; Figure 6.1. A and B). However, when cells were administrated the ‘Marquis’ or ‘Primoris’ bioavailable extracts, the amount of ROS observed were similar than in control cells, indicating that both extracts (gastric and intestinal extracts) and concentrations were harmless and adequate for the cells. The lower concentration was established in previous reports for the variety ‘Camarosa’ (Ariza et al., 2018b) and this study was done following the same approach for comparable results.

The preincubation of the bioavailable fractions and subsequent application of AAPH did not result in a decrease of the ROS values, reaching values similar to those of AAPH-treated cells, with the exception of ‘Marquis’ (2 μ g/ml) + AAPH which significantly lowered the ROS

level and, although it did not reach the level of ROS in control cells, it was the most effective treatment counteracting the oxidative damage caused by AAPH. This effect, observed at gastric and intestinal level, indicated that this extract had a protective effect by detoxifying through antioxidation processes and counteracting the harmful effect of ROS. It was remarkable that the higher dose of 'Marquis' (5µg/ml) + AAPH did not have the same efficacy decreasing the ROS levels as the lower dose (2µg/ml), possibly for being too high concentration and giving rise to a pro-oxidation effect. This pro-oxidative phenomenon has also been observed in other assays when adding excessive antioxidant agent. In this regard, Lambert & Elias (2010) report a pro-oxidant effect of tea catechins responsible for the induction of apoptosis in tumor cells, and in relation to ROS levels Lee & Lee (2006) reviewed that polyphenols can act both as antioxidants and prooxidants depending on their structure and the conditions, and that this prooxidant activity could be directly proportional to the number of hydroxyl groups.

The higher ROS counteraction of 'Marquis' respect to 'Primoris' followed the same trend as the AC-bioavailable results described in Table 6.4, although it could not be attributable to any specific compound (Table 6.5). Besides, in this study, as reported in Brown et al. (2012) for the colorectal cancer, the bioactivity is demonstrated to be genotype-dependent, and in this sense, the healthy promoting properties of a variety is not only due to the composition of the raw fruits, but also because of the transformations during the digestion process conditions its bioactive effects, as described in Ariza et al. (2018b). In this sense, Chen et al. (2016) found that wild raspberry extract produced a higher protective effect against acrylamide-induced cytotoxicity after digestion compared with to the raw fruits. In addition to the literature, this assay provides a clue indicating that a higher dosage not necessarily imply higher beneficial effect, and that the composition of the sample is more decisive instead.

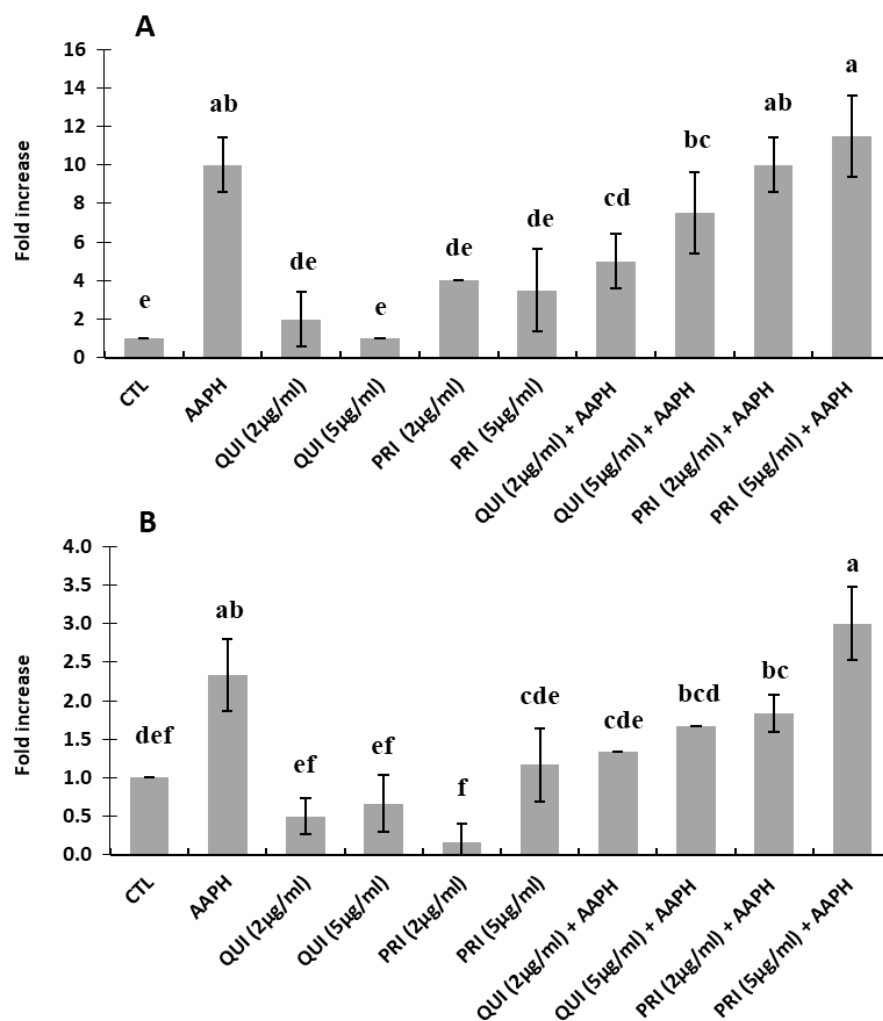


Figure 6.1. Intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulation in HepG2 cells determined by the Tali® Image-Based Cytometer. Cells were preincubated with the indicated fruit fractions (at 2 or 5 µg/ml) and some of them were also stressed with AAPH for 24 h. Values are expressed as the mean ± SD of three independent experiments (n = 3). Columns belonging to the same set of data (A: bioavailable gastric fraction; B: bioavailable intestinal fraction) with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$). CTL: cells without treatment; AAPH: cells incubated with AAPH; QUI: cells preincubated with bioavailable digestion extract from ‘Marquis’; PRI: cells preincubated with bioavailable digestion extract from ‘Primoris’; QUI + AAPH: cells preincubated with ‘Marquis’ extract and then stressed with AAPH; PRI + AAPH: cells preincubated with ‘Primoris’ extract and then stressed with AAPH.

Regarding the survival assay, significant differences ($p < 0.05$) were found in the percentage of live and dead cells after treatment with the strawberry fractions (gastric or intestinal bioavailable extracts) compared to the control (Figure 6.2 A and B), with the exception of ‘Marquis’ at 2 µg/ml who showed no significant differences either in the percentage of live or death cells after application of both, the gastric and the intestinal treatment. In the gastric

fractions, the treatment with 'Marquis' at 5µg/ml and 'Primoris' at 2µg/ml and 5µg/ml produced a decrease in cell viability similar to the AAPH treatment. However, this effect was not observed in cells treated with intestinal fractions, where although cell survival decreased, it did not reach AAPH treatment values mainly due to differences in quantity and composition of both types of fractions.

In previous studies had been already stated the differences in the antiproliferative properties of different whole berry fruits (Boivin et al., 2007), but in this assay, a treatment with a strawberry digested extract produced a different response in the viability of cells depending on the extract (bioavailable gastric or intestinal), the dosage, and the strawberry genotype. Thus, the administration of 'Marquis' (2µg/ml) did not show any pro-oxidant effect conducting to a rise in the cell death, contrarily to what observed for the 5µg/ml dose. Instead, the effect in cell viability observed in 'Primoris' (2 and 5µg/ml) could be due to toxic effect because of other kind of molecules, since their antioxidant capacity was lower than in 'Marquis' bioavailable extracts (Table 6.4).

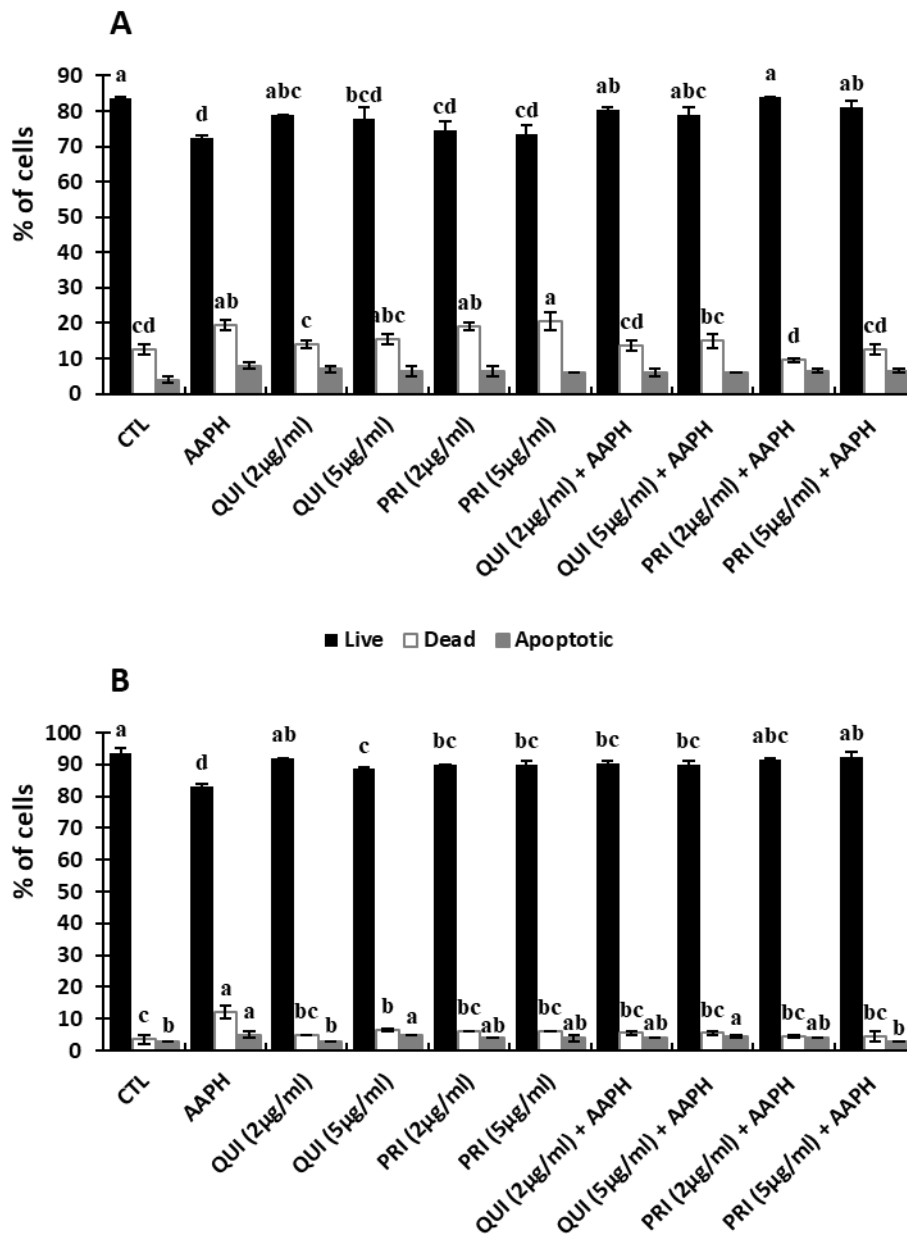


Figure 6.2. Percentage of live, dead, and apoptotic HepG2 cells determined by the Tali® Image-Based Cytometer. Cells were preincubated with the indicated fruit fractions at two concentrations and some of them were also stressed with AAPH for 24 h. Values are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments ($n = 3$). Columns belonging to the same set of data (A: bioavailable gastric fraction; B: bioavailable intestinal fraction) with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$). CTL: cells without treatment; AAPH: cells incubated with AAPH; QUI: cells preincubated with bioavailable digestion extract from ‘Marquis’; PRI: cells preincubated with bioavailable digestion extract from ‘Primoris’; QUI + AAPH: cells preincubated with ‘Marquis’ extract and then stressed with AAPH; PRI + AAPH: cells preincubated with ‘Primoris’ extract and then stressed with AAPH.

As expected, when the control cells were treated with the stressor agent AAPH, a lower level of live cells was observed, concomitantly with a higher level of dead cells. In this situation, when cells were treated with gastric extracts and AAPH, both varieties in both concentrations (2 and 5µg/ml) reduced the number of dead cells with respect to the AAPH-stressed group and restored the percentage of live cells to values statistically similar to the control. As for the intestinal treatment, all the extracts counteracted the effect of the AAPH, and although the extracts of 'Primoris' produced a level of live cells higher than 'Marquis' and similar to the control situation, the percentage of live cells among varieties and concentrations did not show significant differences.

To date there was not enough information available about how the bioactivity could change among varieties. Overall, with all the results above described, 'Marquis' was the strawberry variety capable to counteract to a greater extent the cell oxidative damage caused by a chemical agent, as demonstrated by intracellular ROS accumulation and viability data.

These results agreed to a higher extent with the total antioxidant capacity test than to their composition in phenolic compounds, leading to the possibility that the AC protocol after *in vitro* digestion (AC_{BD}) could be used as an indicator of fruit wholesomeness. Generally, the various protective effects of different digested berry species have been widely demonstrated in the literature (neuroprotective, Tavares et al., 2012; scavenging activity, Chen et al., 2016; anti-proliferative, Bermúdez-Soto et al., 2007b), but the responsible compounds of such effects still remain unclear. Some authors have attributed them to the anthocyanin group of compounds (Forbes-Hernández et al., 2016), or hydrolysable tannins (mainly ellagic acid; Chen et al., 2007); however, our results indicated that other antioxidant families must be also involved in the bioactivity, since the positive effects against the AAPH-induced stress were observed in 'Marquis' respect to 'Primoris' and the amount of polyphenols (specifically anthocyanins and hydrolysable tannins) were lower. In this sense, more efforts should be done in the future in order to identify the main antioxidant contributors of each genotype to their bioactivity.

6.4. Conclusions

The present study highlights that the genotype plays an important role in the composition of strawberry fruits, and thus, the varieties contain a different amount and profile of polyphenols. In addition, this diverse composition in antioxidants also results in a different antioxidant capacity among varieties. Since AC could be considered as an integrative parameter of the global antioxidant potential of a sample, it could reveal different healthy promoting properties. On the other hand, our data showed no correlation between AC and the anthocyanin or polyphenol content for the varieties, as indicated in the literature, possibly for a different contribution of each type of molecules to the AC in the varieties.

The assessment of the healthy potential of a given variety implies the use of *in vitro* digestion processes capable of mimicking the transformations of the antioxidants for the physiological conditions after the intake. In this sense, this process affected the varieties differently, so the antioxidant composition in the digested fractions and the raw fruits were not correlated. Besides, the different antioxidant groups were also affected by the digestion conditions to a different extent, as observed by the HPLC quantification, highlighting their transformation during this process.

In this situation, the AC_{BD} was not proportional to the AC_{RF} , and thus, this method becomes necessary for taking into account the transformations due to fruit digestion when assessing the healthy potential of a given variety. However, this AC_{BD} could not be assigned to any of the main polyphenols described for the strawberry, so that more studies are needed to be able to attribute certain antioxidant capacity to a specific compound, specially when the contribution of the specific polyphenols to this capacity may be variable among varieties.

When comparing the ability of the digested extracts in counteracting the oxidative damage in cells, varietal differences in their bioactivity were also found, which were more related to the AC_{BD} data than to the composition in specific compounds of the extracts. These results

corroborate the employ of this parameter as a feasible and more realistic indicator of bioactivity for assessing the potential health benefits of different strawberry varieties.

This study highlights that the diverse breeding programs ongoing are producing strawberry varieties with different quality attributes, and that those quality attributes result in different bioactivity and health-promoting benefits. In order to establish its putative health benefits, each strawberry variety should be separately analyzed, and for this purpose the *in vitro* digestion approach should be used for determining the AC_{BD} parameter, since it seems to be a reliable indicator for wholesome fruits.

7. Contribución de los achenios a la biodisponibilidad de los antioxidantes del fruto de fresa

Este capítulo corresponde al objetivo 2.4 de la Tesis Doctoral y ha sido publicado como:

Ariza, M.T., Reboredo-Rodríguez, P., Cervantes, L., Soria, C., Martínez-Ferri, E., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Battino, M. & Simal-Gándara, J. (2018). Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. *Food Chemistry*, 248, 155–165.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.105>

Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs

María Teresa Ariza, Patricia Reboredo-Rodríguez, Lucía Cervantes, Carmen Soria, Elsa Martínez-Ferri, Carmen González-Barreiro, Beatriz Cancho-Grande, Maurizio Battino, & Jesús Simal-Gándara

Abstract

Strawberry is a major natural source of bioactive compounds. Botanically, strawberry is an aggregate fruit consisting of a fleshy floral receptacle that bears a cluster of real dry fruits (achenes). Existing knowledge on the phenolic composition of achenes and their contribution to that of the whole fruit is limited. Also, the gastric and intestinal bioavailability of phenols is poorly understood. In this work, a combination of spectrophotometric and HPLC–DAD methods was used to analyse the phenolic composition of whole fruits and achenes before and after *in vitro* digestion. Five different phenol families were identified. Also, achenes were found to contribute a sizeable fraction of phenolic acids and hydrolysable tannins in the whole fruit. Because the mere presence of phenolic compounds in a food matrix does not ensure their ready absorption and bioavailability, *polyphenol potential bioavailability* could be an effective selection criterion for strawberry breeding programs aimed at improving dietary healthiness.

Keywords: berry, dry fruit, antioxidants, *in vitro* digestion, health.

8. Contribución de los akenios a la bioactividad de los antioxidantes del fruto de fresa

Este capítulo corresponde al objetivo 2.4 de la Tesis Doctoral y ha sido publicado como:

Ariza, M.T., Forbes-Hernández, T.Y., Reboredo-Rodríguez, P., Afrin, S., Gasparrini, M., Cervantes, L., Soria, C., Martínez-Ferri, E., Battino, M. & Giampieri, F. (2018). *Strawberry and achenes hydroalcoholic extracts and their digested fractions efficiently counteract the AAPH-induced oxidative damage in HepG2 cells. International Journal of Molecular Sciences, 19, 2180. <https://doi.org/10.3390/ijms19082180>*

Strawberry and achenes hydroalcoholic extracts and their digested fractions efficiently counteract the AAPH-induced oxidative damage in HepG2 cells

María Teresa Ariza, Tamara Y. Forbes-Hernández, Patricia Reboredo-Rodríguez, Sadia Afrin, Massimiliano Gasparri, Lucia Cervantes, Carmen Soria, Elsa Martínez-Ferri, Maurizio Battino
& Francesca Giampieri

Abstract

Strawberry fruits are very appreciated by consumers worldwide due to their bright red color, typical aroma and juicy texture. While the biological activity of the complete fruit has been widely studied, the potential beneficial effects of the achenes (commonly named seeds) remain unknown. In addition, when raw fruit and achenes are consumed, the digestion process could alter the release and absorption of their phytochemical compounds, compromising their bioactivity. In the present work we evaluated the protective effects against oxidative damage of non-digested and digested extracts from strawberry fruit and achenes in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. For that purpose, cells were treated with different concentration of the extracts, prior to incubation with the stressor agent, AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride). Subsequently, intracellular accumulation of reactive oxygen species (ROS) and the percentage of live, dead and apoptotic cells were determined. Our results demonstrated that all the evaluated fractions were able to counteract the AAPH-induced damage, suggesting that also the achenes present biological activity. The positive effects of both, raw fruit and achenes were maintained after the *in vitro* digestion process.

Keywords: Strawberry; achenes; *in vitro* digestion; reactive oxygen species; apoptosis; AAPH

9. Resumen de los resultados

Resumen de los resultados

Los principales resultados obtenidos en esta tesis doctoral se exponen de acuerdo con los objetivos planteados en la misma.

En relación al **primer objetivo**, se observó que los parámetros de calidad organoléptica y funcional de los frutos de distintas variedades de fresa se vieron afectados de forma distinta ante la variación inter- e intra- anuales de las condiciones ambientales (Cap. II), entre las que destacan la humedad relativa y las temperaturas medias y mínimas. Los parámetros organolépticos mostraron una mayor estabilidad inter-anual mientras que su variación a lo largo de la campaña fue mucho mayor, observándose lo contrario para los caracteres de calidad funcional. La variación ambiental no afectó a los parámetros de calidad de fruto por igual en todas las variedades. Así, 'Splendor' mostró una mayor estabilidad inter-anual en los parámetros organolépticos, mientras que 'Sabrina' y Candonga® mostraron gran estabilidad inter- e intra-anual para los parámetros de calidad funcional, respectivamente. En las dos últimas variedades, la capacidad antioxidante fue elevada y más estable a lo largo de la campaña.

A nivel micro-climático, la calidad de los frutos también se vio afectada por el nivel de exposición a la luz de los frutos individuales (Cap. III), que fue un 60% mayor en los frutos expuestos que en los no expuestos en todas las variedades evaluadas pese a su diferente arquitectura. La magnitud de la respuesta a las condiciones lumínicas, estimada como índice de plasticidad, fue dependiente del genotipo identificándose dos estrategias contrapuestas: un comportamiento plástico (i.e., calidad modulable por la luz) y un comportamiento conservador (i.e., calidad estable en distinto nivel de exposición a la luz), representado por 'Fortuna' y 'Sabrina', respectivamente.

En relación al **segundo objetivo**, cuya metodológica se fundamenta en aproximaciones a la digestión *in vitro*, se puso de manifiesto la interferencia de los reactivos y la influencia del método de depuración en la cuantificación de los compuestos antioxidantes de los extractos digeridos (Cap. IV). Los métodos de depuración ensayados presentaron diferencias en el nivel de interferencia y en la recuperación de los antioxidantes de la muestra, recomendándose el uso de algodón hidrofílico (HC) o algodón + centrifugación (HC+ C) para lograr una mayor recuperación de la muestra.

El análisis interespecífico de la biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes en distintas especies de frutos rojos (Cap. V) puso de manifiesto que, además de la composición, la digestibilidad, es decir, la liberación y absorción de los compuestos de las matrices alimentarias tras su ingestión y digestión, difiere entre los distintos berries, lo que parece estar asociado a su distinto contenido en fibra dietética. Así, la digestibilidad de la fresa fue mayor que en el resto de los frutos rojos evaluados, resultando en un mayor potencial biosaludable. La capacidad antioxidante biodisponible (AC_{bd}) se propone como un parámetro integrador para la estimación del potencial biosaludable, y como un indicador útil para comparar variedades de distintas especies de frutos rojos y para programas de mejora encaminados a la selección de variedades con propiedades beneficiosas para la salud.

El análisis intraespecífico de la biodisponibilidad y bioactividad de los compuestos antioxidantes en distintas variedades de fresa (Cap. VI) puso de manifiesto el papel decisivo del genotipo. Dentro de cada variedad, la composición y cantidad de antioxidantes y AC difirió entre los frutos frescos y digeridos, y entre variedades, dicha variación no fue proporcional e incluso mostró un patrón contrapuesto como en el caso de 'Primoris' y 'Marquis'. 'Marquis' presentó menor AC en fruto fresco y mayor AC_{bd} que 'Primoris', y exhibió mayor capacidad para contrarrestar el daño oxidativo en cultivos celulares (i.e., mayor bioactividad).

La contribución de los distintos tejidos del fruto, aquenios y receptáculo, a la cantidad y capacidad antioxidante de los frutos de fresa (Cap. VII y VIII) no es proporcional a su representación relativa en el conjunto del fruto. Si bien los aquenios representan menos de un 1% del peso fresco total, la contribución de los mismos a la AC total del fruto fresco fue >17% y tras la digestión, más del 14% de la AC_{bd} total del fruto estuvo asociada a los aquenios. La importancia de la contribución del aquenio a la AC y AC_{bd} total del fruto se reflejó en una elevada capacidad de los extractos frescos y digeridos de aquenios para contrarrestar el daño oxidativo (i.e., bioactividad).

10. Conclusiones

Conclusiones

Tras el análisis de los resultados expuestos en este manuscrito, las principales conclusiones de la presente Tesis Doctoral se recogen a continuación:

1. La variación en las condiciones climáticas durante el cultivo, especialmente humedad relativa y las temperaturas media y mínima, afecta a la estabilidad de los parámetros de calidad organoléptica y funcional de los frutos de fresa de un modo diferente en los genotipos considerados.
2. Los caracteres organolépticos y funcionales mostraron un patrón de variación inter e intra-anual opuesto.
3. Las variedades con mayor estabilidad inter- e intra-anual en caracteres funcionales fueron 'Sabrina' y Candonga®, destacando su elevada capacidad antioxidante (AC) y señalando a este parámetro como herramienta para la selección varietal, y a estos dos genotipos como parentales interesantes en programas de mejora.
4. El nivel de exposición de los frutos a la luz afecta a la calidad de los frutos de fresa de distinta manera en los genotipos estudiados, encontrándose dos tendencias contrapuestas: una tendencia “resiliente” o plástica representada por variedades cuya calidad varía dependiendo de la luz, como el caso de ‘Fortuna’, y otra tendencia “conservadora”, en la que la calidad de los frutos no varía ante diferentes niveles de exposición a la luz, representada por la variedad ‘Sabrina’.
5. Los distintos reactivos utilizados en la simulación *in vitro* del proceso de digestión y el método de depuración de las fracciones interfieren en la cuantificación de antioxidantes y en su recuperación.

6. Para una cuantificación fehaciente de los antioxidantes de una muestra digerida de fresa debe anteponerse la recuperación de la misma a la eliminación de la interferencia de los reactivos, ya que es posible corregir ésta última *a posteriori* si se calcula la interferencia basal con una muestra control. Con esta premisa se recomienda el uso de algodón hidrofílico (HC) o algodón + centrifugación (HC+ C) para lograr una mayor recuperación de la muestra.

7. El proceso de digestión *in vitro* afecta a la cantidad y tipo de compuestos antioxidantes biodisponibles, destacándose la capacidad antioxidante biodisponible (AC_{bd}) como un parámetro integrador para estimar el potencial biosaludable de los frutos, de utilidad como indicador para comparar distintos genotipos y para la selección de variedades con propiedades beneficiosas para la salud en programas de mejora.

8. La AC_{bd} de distintas especies de frutos rojos depende, además de la cantidad y composición en antioxidantes, de su digestibilidad, es decir, la liberación y absorción de los compuestos de las matrices alimentarias tras su ingesta y digestión, que parece estar relacionado con su distinto contenido en fibra dietética.

9. La cantidad y composición de antioxidantes de frutos frescos no se corresponde con su potencial biosaludable. En los berries estudiados, según la AC_{bd} , la especie con mayor potencial biosaludable sería la fresa, seguida de arándano y finalmente frambuesa.

10. A nivel intraespecífico, la diferente composición en antioxidantes y AC de los frutos frescos de las distintas variedades de fresa no se trasladaron necesariamente en diferencias proporcionales en su biodisponibilidad, señalando la necesidad de usar aproximaciones como la digestión *in vitro* para estimar el potencial biosaludable de las distintas variedades de fresa.

11. El parámetro AC_{bd} presentó una relación directa con la bioactividad *in vitro*, reforzándose su uso como indicador para la evaluación de las propiedades biosaludables de las variedades de fresa en programas de mejora.

12. La contribución de los aquenios, verdaderos frutos de la fresa, a la AC total del fruto tanto en fresco como tras la digestión es notable (>17 y 14%, respectivamente) considerando que representan menos del 1% del peso fresco total del fruto.

13. Los extractos frescos y digeridos de aquenios presentan propiedades bioactivas y disminuyen el daño oxidativo *in vitro* comparables a la del receptáculo.

14. Considerando el efecto beneficioso para la salud, se propone el empleo de los aquenios como un subproducto de la fresa interesante para la industria, encaminado a enriquecer alimentos en cuarta o quinta gama.

11. Bibliografía

- Aaby, K., Ekeberg, D., & Skrede, G. (2007a). Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 4395–4406.
- Aaby, K., Wrolstad, R.E., Ekeberg, D., & Skrede, G. (2007b). Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees; impact of achene level and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(13), 5156–5166.
- Aaby, K., Skrede, G. & Wrolstad, R.E. (2005). Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 4032–4040.
- Adalid, A.M., Roselló, S., & Nuez, F. (2010). Evaluation and selection of tomato accessions (*Solanum* section *Lycopersicon*) for content of lycopene, β -carotene and ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, *23*, 613-618.
- Afrin, S., Giampieri, F., Gasparini, M., Forbes-Hernandez, T., Varela-López, A., Quiles, J., Mezzetti, B., & Battino, M. (2016). Chemopreventive and therapeutic effects of edible berries: A focus on colon cancer prevention and treatment. *Molecules*, *21*(2), 169.
- Agüero, J.J., Salazar, S.M., Kirschbaum, D.S., & Jerez, E.F. (2015). Factors affecting fruit quality in strawberries grown in a subtropical environment. *International Journal of Fruit Science*, *15*(2), 223-234.
- Aharoni, A., Giri, A.P., Verstappen, F.W., Berteau, C.M., Sevenier, R., Sun, Z., Jongsma, M.A., Schwab, W., & Bouwmeester, H.J. (2004). Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *The Plant Cell*, *16*(11), 3110-3131.
- Akhatou, I., & Fernández-Recamales, A. (2014). Nutritional and nutraceutical quality of strawberries in relation to harvest time and crop conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(25), 5749-5760.
- Ali-Shah, S., Ullah, I., Lee, H.Y., & Kim, M.O. (2013). Anthocyanins protect against ethanol-induced neuronal apoptosis via GABAB1 receptors intracellular signaling in prenatal rat hippocampal neurons. *Molecular Neurobiology*, *48*, 257–269.
- Alvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F., González-Paramás, A.M., Damiani, E., Astolfi, P., Martínez-Sánchez, G., Bompadre, S., Quiles, J.L., Santos-Buelga, C., & Battino, M. (2012). Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, *50*, 1508–1516.
- Anderson, E.J., Lustig, M.E., Boyle, K.E., Woodlief, T.L., Kane, D.A., Lin, C.T., Price, J.W., Kang, L., Rabinovitch, P.S., & Szeto, H.H. (2009). Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *Journal of Clinical Investigation*, *119*, 573–581.
- Andrianjaka-Camps, Z.N., Heritier, J., Ançay, A., Andlauer, W., & Carlen, C. (2017). Evolution of the taste-related and bioactive compound profiles of the external and internal tissues of strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*) cv. 'Clery' during ripening. *Journal of Berry Research*, *7*, 11-22.
- Anthony, J.P., Fyfe, L., Stewart, D., & McDougall, G.J. (2011). Differential effectiveness of berry polyphenols as anti-giardial agents. *Parasitology*, *138*, 1110 – 1116.
- Anttonen, M.J., Hoppula, K.I., Nestby, R., Verheul, M.J., & Karjalainen, R.O. (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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(7), 2614-2620.
- Anttonen, M.J., & Karjalainen, R.O. (2005). Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis*, *18*(8):759–769.65.
- Ariza, M.T., Reboredo-Rodríguez, P., Cervantes, L., Soria, C., Martínez-Ferri, E., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Battino, M., & Simal-Gándara, J. (2018a). Bioaccessibility and potential

- bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. *Food Chemistry*, 248, 155–165.
- Ariza, M.T., Forbes-Hernández, T.Y., Reboredo-Rodríguez, P., Afrin, S., Gasparri, M., Cervantes, L., Soria, C., Martínez-Ferri, E., Battino, M., & Giampieri, F. (2018b). Strawberry and achenes hydroalcoholic extracts and their digested fractions efficiently counteract the AAPH-induced oxidative damage in HepG2 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2180.
- Ariza, M.T., Reboredo-Rodríguez, P., Mazzoni, L., Forbes-Hernández, T.Y., Giampieri, F., Afrin, S., Gasparri, M., Soria, C., Martínez-Ferri, E., Battino, M., & Mezzetti, B. (2016). Strawberry achenes are an important source of bioactive compounds for human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1-14.
- Ariza, M.T., Martínez-Ferri, E., Domínguez, P., Medina, J.J., Miranda, L., & Soria, C. (2015). Effects of harvest time on functional compounds and fruit antioxidant capacity in ten strawberry cultivars. *Journal of Berry Research*, 5(2), 71-80.
- Ariza, M.T., Soria, C., Medina-Mínguez, J.J., & Martínez-Ferri, E. (2012). Incidence of Misshapen Fruits in Strawberry Plants Grown under Tunnels Is Affected by Cultivar, Planting Date, Pollination, and Low Temperatures. *Hortscience*, 47(11), 1569–1573.
- Ariza, M.T., Soria, C., Medina, J.J., & Martínez-Ferri, E. (2011). Fruit misshapen in strawberry cultivars (*Fragaria* × *ananassa*) is related to achenes functionality. *Annals of Applied Biology*, 158(1), 130-138.
- Arts, I.C., van De Putte, B., & Hollman, P.C. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 1752–7.
- Atkinson, C.J., Nestby, R., Ford, Y.Y., & Dodds, P.A.A. (2005). Enhancing beneficial antioxidants in fruits: a plant physiological perspective. *BioFactors* 23, 229–234.
- Atmani, D., Chaher, N., Atmani, D., Berbouc, M., Debbache, N., & Boudaoud, H. (2009). Flavonoids in human health: From structure to biological activity. *Current Nutrition & Food Science*, 5(4), 225–237.
- Azodanlou, R., Darbellay, C., Luisier, J.L., Villettaz, J.C., & Amadó, R. (2003). Quality assessment of strawberries (*Fragaria* species). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 715–721.
- Azzini, E., Intorre, F., Vitaglione, P., Napolitano, A., Foddai, M. S., Durazzo, A., Fumagalli, A., Catasta, G., Rossi, L., Venneria, E., Testa, M.F., Raguzzini, A., Palomba, L., & Fogliano, V., (2010). Absorption of strawberry phytochemicals and antioxidant status changes in humans. *Journal of Berry Research*, 1(2), 81-89.
- Balaguer, L., Martínez-Ferri, E., Valladares, F., Pérez-Corona, M.E., Baquedano, J., Castillo, F.J., & Manrique, E. (2001). Population divergence in the plasticity of the response of *Quercus coccifera* to the light environment. *Functional Ecology*, 15, 124-135.
- Baskin, C.C., & Baskin, J.M. (2001). *Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press. USA.
- Bello, A., López-Pérez, J.A., Díaz-Viruliche, L., Sanz, R., & Arias, M. (1999). Bio-fumigation and local resources as methyl bromide alternatives. Abstracts 3 rd International Workshop "Alternatives to Methyl Bromide for the Southern European Countries, 7-10 December, Heraclion, Creta, Grecia, 17 p.
- Bermúdez-Soto, M.J., Tomás-Barberán, F.A., & García-Conesa, M.T. (2007a). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102(3), 865-874.
- Bermúdez-Soto, M.J., Larrosa, M., García-Cantalejo, J.M., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., & García-Conesa, M.T. (2007b). Up-regulation of tumour suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenol-rich chokeberry juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 259–271.

- Betteridge, D.J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, 49(2), 3-8.
- Bian, Z.H., Yang, Q.C., & Liu, W.K. (2015). Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 869-877.
- Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A., Leschik-Bonnet, E., Müller, M.J., Oberritter, H., Schulze, M., Stehle, P., & Watzl, B. (2012). Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition*, 51(6), 637-663.
- Bohn, T., Carriere, F., Day, L., Deglaire, A., Egger, L., Freitas, D., Golding, M., Le Feunteun, S., Macierzanka, A., Menard, O., Miralles, B., Moscovici, A., Portmann, R., Recio, I., Rémond, D., Santé-Lhoutelier, V., Wooster, T.J., Lesmes, U., Mackie, A.R., & Dupont, D. (2018). Correlation between *in vitro* and *in vivo* data on food digestion. What can we predict with static *in vitro* digestion models?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(13), 2239-2261.
- Boivin, D., Blanchette, M., Barrette, S., Moghrabi, A., & Beliveau, R. (2007). Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NF κ B by edible berry juice. *Anticancer Research*, 27, 937-948.
- BOJA 184, 25 septiembre 2017. Reglamento de producción integrada de frutos rojos
- BOJA 132, 9 julio 2013. Reglamento de producción integrada de fresa.
- Breaux, H.J. (1967). On stepwise multiple linear regression. Technical Report (No. BRL-1369). Aberdeen: Army Ballistic Research Lab Aberdeen Proving Ground MD.
- Brouillard, R., & Delaporte, B. (1977). Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *Journal of the American Chemical Society*, 99(26), 8461-8468.
- Brown, E.M., McDougall, G.J., Stewart, D., Pereira-Caro, G., González-Barrio, R., Allsopp, P., Magee, P., Crozier, A., Rowland, I., & Gill, C.I.R. (2012). Persistence of anticancer activity in berry extracts after simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *Plos One*, 7(11), e49740.
- Buendía, B., Gil, M.A.I., Tudela, J.A., Gady, A.L., Medina, J.J., Soria, C., López, J.M., & Tomás-Barberán, F.A. (2010). HPLC-MS Analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3916-3926.
- Bushman, B.S., Phillips, B., Isbell, T., Ou, B., Crane, J.M., & Knapp, S.J. (2004). Chemical composition of caneberry (*Rubus* spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7982-7987.
- CAPDR (2018). Observatorio de precios y mercados. Fichas de productos. Sector Frutos Rojos. <http://www.cap.junta-andalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/FrontController?action=List&table=11114&page=1#>. (Mayo 2019)
- Capocasa, F., Diamanti, J., Tulipani, S., Battino, M., & Mezzetti, B. (2008a). Breeding strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch) to increase fruit nutritional quality. *Biofactors*, 34(1), 67-72.
- Capocasa, F., Scalzo, J., Mezzetti, B., & Battino, M. (2008b). Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: The role of genotype. *Food Chemistry*, 111(4), 872-878.
- Carbone, F., Preuss, A., De Vos, R.C., D'Amico, E., Perrotta, G., Bovy, A.G., Martens, S., & Rosati, C. (2009). Developmental, genetic and environmental factors affect the expression of flavonoid genes, enzymes and metabolites in strawberry fruits. *Plant, Cell & Environment*, 32(8), 1117-1131.
- Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Barba, F.J., Esteve, M.J., & Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155-171.

- Cardeñosa, V., Girones-Vilaplana, A., Muriel, J.L., Moreno, D.A., & Moreno-Rojas, J.M. (2016). Influence of genotype, cultivation system and irrigation regime on antioxidant capacity and selected phenolics of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry*, 202, 276-283.
- Castro, A., Marrero, L.I., Valdivia, M., Gabel, M., & Steingass, H. (2002). Contenido de factores antinutricionales del grano de sorgo de cuatro variedades cultivadas en Cuba. *Revista Cubana Science Agricultura*, 36(1), 31-35.
- Castro, J.P., Grune, T., & Speckmann, B. (2016). The two faces of reactive oxygen species (ROS) in adipocyte function and dysfunction. *Biological Chemistry*, 397(8), 709-724.
- Cebeci, F., & Şahin-Yeşilçubuk, N. (2014). The matrix effect of blueberry, oat meal and milk on polyphenols, antioxidant activity and potential bioavailability. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(1), 69-78.
- Cerezo, A.B., Cuevas, E., Winterhalter, P., Garcia-Parrilla, M.C., & Troncoso, A.M. (2010). Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. *Food Chemistry*, 123, 574-582.
- Cervantes, L., Martínez-Ferri, E., Soria, C., & Ariza, M.T. (2020). Comparative assessment of bioavailability of phenolic compounds in strawberry, raspberry and blueberry: insights for breeding programs. *Food Bioscience*, 37, 100680.
- Cervantes, L., Ariza, M.T., Gómez-Mora, J.A., Miranda, L., Medina, J.J., Soria, C., & Martínez-Ferri, E. (2019a). Light exposure affects fruit quality in different strawberry cultivars under field conditions. *Scientia Horticulturae*, 252, 291-297.
- Cervantes, L., Martínez-Ferri, E., Carrera, M., Soria, C., & Ariza, M.T. (2019b). Effectiveness of different depuration procedures in removing reagents interference on *in vitro* digested strawberry extracts for reliable antioxidant determinations. *Journal of Berry Research*, 9, 473-481.
- Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., & Sengupta, P.K. (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins, antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 42-48.
- Cheel, J., Theoduloz, C., Rodríguez, J.A., Caligari, P.D.S., & Schmeda-Hirschmann, G. (2007). Free radical scavenging activity and phenolic content in achenes and thalamus from *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*, *F. vesca* and *F. x ananassa* cv. Chandler. *Food Chemistry*, 102(1), 36-44.
- Chen, C.H., Liu, T.Z., Chen, C.H., Wong, C.H., Chen, C.H., Lu, F.J., & Chen, S.C. (2007). The efficacy of protective effects of tannic acid, gallic acid, ellagic acid, and propyl gallate against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damages in IMR-90 cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 962-968
- Chen, L., Xin, X., Zhang, H., & Yuan, Q. (2013). Phytochemical properties and antioxidant capacities of commercial raspberry varieties. *Journal of Functional Foods*, 5, 508-515.
- Chen, W., Su, H., Xu, Y., Bao, T., & Zheng, X. (2016). Protective effect of wild raspberry (*Rubus hirsutus* Thunb.) extract against acrylamide-induced oxidative damage is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 196, 943-952.
- Cieslik, E., Greda, A., & Adamus, W. (2006). Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chemistry*, 94, 135-42.
- Clifford, M.N., & Scalbert, A. (2000a). Ellagitannins-occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1118-25.
- Clifford, M.N. (2000b). Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063-1072.
- Coles, L.T., Moughan, P.J., & Darragh, A.J. (2005). *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Food Science and Technology* 123-124, 421-444.

- Connor, A.M., McGhie, T.K., Stephens, M.J., Hall, H.K., & Alspach, P.A. (2005). Variation and heritability estimates of anthocyanins and their relationship to antioxidant activity in a red raspberry factorial mating design. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(4), 534-542.
- Connor, A.M., Luby, J.J., & Tong, C.B. (2002). Variation and heritability estimates for antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content in blueberry progenies. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(1), 82-88.
- Cordenusi, B.R., Nascimento, J.O.R., Genovese, M.I., & Lajolo, F.M. (2002). Influence of cultivar quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2581-2586.
- Correa-Betanzo, J. (2013). Evaluation of food matrix interactions and *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioefficacy of polyphenols from blueberries (*Vaccinium* sp.). *Tesis Doctoral*. Guelph, Ontario, Canada
- Correia, J., Pestana, M., Martinez, F., Ribeiro, E., Gama, F., Saavedra, T., & Palencia, P. (2011). Relationships between strawberry fruit quality attributes and crop load. *Scientia Horticulturae*, 130, 398-40.
- Crespo, P., Bordonana, J.G., Terry, L.A., & Carlen, C. (2010). Characterisation of major taste and health-related compounds of four strawberry genotypes grown at different Swiss production sites. *Food Chemistry*, 122, 16-24.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Sczzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321-1342.
- Dai, J., & Mumper, R.J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.
- Dang, Y., Lin, G., Xie, Y., Duan, J., Ma, P., Li, G., & Ji, G. (2014). Quantitative determination of myricetin in rat plasma by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry and its absolute bioavailability. *Drug Research*, 64(10), 516-522.
- Darnell, R.L., Cantliffe, D.J., Kirschbaum, D.S., & Chandler, C.K. (2003). The physiology of flowering in strawberry. In: Janick, J. (Ed), *Horticultural Reviews*, vol. 28. (pp 325-349). John Wiley & Sons.
- Darrow, G.M. (1966). The strawberry. History, breeding and physiology. Holt, Rinehart & Winston, New York.
- Davik, J., Kjersti Bakken, A., Holte, K., & Blomhoff, R. (2006). Effects of genotype and environment on total anti-oxidant capacity and the content of sugars and acids in strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81(6), 1057-1063.
- De Ancos, B., González, 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4565-4570.
- de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J.C. (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5331-5337.
- de Souza, V.R., Pereira, P.A., da Silva, T.L., de Oliveira Lima, L.C., Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362-368.
- Deighton, N., Brennan, R., Finn, C., & Davies, H.V. (2000). Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1307-1313.
- Del Río, D., Rodríguez-Mateos, A., Spencer, J.P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18, 1818-1892.

- De Lange, R.J., & Glazer, A.N. (1990). Bile acids: antioxidants or enhancers of peroxidation depending on lipid concentration. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 276, 19-25.
- Desboulets, L.D.D. (2018). A review on variable selection in regression analysis. *Econometrics*, 6(4), 45.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., & Liu, R.H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010–3014.
- Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Agati, G., & Tattini, M. (2014). Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environmental and experimental botany*, 103, 107-116.
- Dia, M., Wehner, T.C., Perkins-Veazie, P., Hassell, R., Price, D.S., Boyhan, G.E., Olson, S.M., King, S.R., Davis, A.R., Tolla, G.E., Bernier, J., & Juarez, B. (2016). Stability of fruit quality traits in diverse watermelon cultivars tested in multiple environments. *Horticulture research*, 3, 16066.
- Diamanti, D., Capocasa, F., Denoyes, B., Petit, A., Chartier, P., Faedi, W., Maltoni, M.L., Battino, M., & Mezzetti, B. (2012). Standardized method for evaluation of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) germplasm collections as a genetic resource for fruit nutritional compounds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 28, 170–178.
- Domínguez, P., Miranda, L., Soria, C., De los Santos, B., Chamorro, M., Romero, F., Daugovish, O., López-Aranda, J.M., & Medina, J.J. (2014). Soil biosolarization for sustainable strawberry production. *Agronomy for Sustainable Development*, 34, 821-829.
- Domínguez, P. (2012). Evaluación agronómica de selecciones avanzadas del Programa Nacional de Mejora Genética de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), en diferentes sistemas de cultivo y valoración de parámetros de calidad del fruto. *Tesis Doctoral*. Universidad de Córdoba.
- Duchnowicz, P., Broncel, M., Podsedek, A., & Koter-Michalak., M. (2012). Hypolipidemic and antioxidant effects of hydroxycinnamic acids, quercetin, and cyanidin 3-glucoside in hypercholesterolemic erythrocytes (*in vitro* study). *European Journal of Nutrition*, 51(4), 435–443.
- Dudley, S.A. (2004). The functional ecology of phenotypic plasticity in plants. In: De Witt, T.J., Scheiner, S.M. (Eds.), *Phenotypic Plasticity Functional and Conceptual Approaches*. Oxford University Press, Oxford.
- Dussi, M.C. (2007). Intercepción y distribución lumínica en agro-ecosistemas frutícolas. In: Sozzi, G. (Ed.), *Árboles frutales: ecofisiología, cultivo y aprovechamiento*. Editorial Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. pp., 200-241.
- Duthie, G.G., Gardner, P.T., & Kyle, J.A. (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet?. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(3), 599-603.
- Duthie, G., & Crozier, A. (2000). Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Lipidology*, 11, 43-47.
- Ehrlenfeldt, M.K., & Prior, R.L. (2001). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2222-2227.
- Eurostat database (2018). Crops production in the EU. <http://ec.europa.eu/eurostat/web/agriculture/data/database>. Accessed 13 August 2018.
- Faedi, W., Mourgues, F., & Rosati, C. (2002). Strawberry breeding and varieties: Situation and perspectives. *Acta Horticulturae*, 567, 51-59.
- Fait, A., Hanhineva, K., Beleggia, R., Dai, N., Rogachev, I., Nikiforova, V.J., Fernie, A.R., & Aharoni, A. (2008). Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. *Plant Physiology*, 148, 730–750.
- Fang, J. (2015). Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. *Nutrition*, 31(11-12), 1301-1306.
- Fang, J. (2014). Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metabolism Reviews*, 46(4), 508–520.
- FAOSTAT (2019). Agricultural data. <http://www.fao.org/faostat/es/?#data/QC> (Mayo 2019)

- Feng, F., Li, M., Ma, F., & Cheng, L. (2013). Phenylpropanoid metabolites and expression of key genes involved in anthocyanin biosynthesis in the shaded peel of apple fruit in response to sun exposure. *Plant Physiology and Biochemistry*, 69, 54–61.
- Forbes-Hernández, T.Y., Afrin, S., Cianciosi, D., Manna, P.P., Zhang, J., Gasparrini, M., & Reboredo-Rodríguez, P. (2018). Strawberry extract attenuates oxidative stress in 3T3-L1 cells. *Journal of Berry Research*, 8(3), 193–203.
- Forbes-Hernández, T.Y., Gasparrini, M., Afrin, S., Bompadre, S., Mezzetti, B., Quiles, J.L., Giampieri, F., & Battino, M. (2016). The healthy effects of strawberry polyphenols: which strategy behind antioxidant capacity? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, S46–S59.
- García-Alonso, F.J., Periago, M.J., Vidal-Guevara, M.L., Cantos, E., Ros, G., Ferreres, F., & Abellán, P. (2003). Assessment of the antioxidant properties during storage of a dessert made from grape, cherry, and berries. *Journal of Food Science*, 68(4), 1525–1530.
- Gasparrini, M., Giampieri, F., Forbes-Hernandez, T.Y., Afrin, S., Cianciosi, D., Reboredo-Rodríguez, P., Varela-López, A., Zhang, J., Quiles, J.L., Mezzetti, B., Bompadre, S., & Battino, M. (2018). Strawberry extracts efficiently counteract inflammatory stress induced by the endotoxin lipopolysaccharide in Human Dermal Fibroblast. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 128-140.
- Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T.Y., Afrin, S., Reboredo-Rodríguez, P., Cianciosi, D., Mezzetti, B., Quiles, J.L., Bompadre, S., Battino, M., & Giampieri, F. (2017a) Strawberry-based cosmetic formulations protect human dermal fibroblasts against UVA-induced. *Nutrients*, 9(6), 605.
- Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T.Y., Giampieri, F., Afrin, S., Alvarez-Suarez, J.M., Mazzoni, L., Mezzetti, B., Quiles, J.L., & Battino, M. (2017b). Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 102, 1-10.
- Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T.Y., Giampieri, F., Afrin, S., Mezzetti, B., Quiles, J.L., Bompadre, S., & Battino, M. (2017c). Protective effect of strawberry extract against inflammatory stress induced in human dermal fibroblasts. *Molecules*, 22, 164.
- Gasperotti, M., Masuero, D., Guella, G., Palmieri, L., Martinatti, P., Pojer, E., Mattivi, F., & Vrhovsek, U. (2013). Evolution of ellagitannin content and profile during fruit ripening in *Fragaria* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8597–8607.
- Gavilán, P., Ruiz, N., & Lozano, D. (2015). Daily forecasting of reference and strawberry crop evapotranspiration in greenhouses in a Mediterranean climate based on solar radiation estimates. *Agricultural Water Management*, 159, 307–317.
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J.M., Cordero, M.D., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T.Y., Afrin, S., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M., Astolfi, P., Rubini, C., Zizzi, A., Tulipani, S., Quiles, J.L., Mezzetti, B., & Battino M. (2017). Strawberry consumption improves aging-associated impairments, mitochondrial biogenesis and functionality through the AMP-activated protein kinase signaling cascade. *Food Chemistry*, 234, 464-471.
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J.M., Mazzoni, L., Forbes-Hernandez, T.Y., Gasparrini, M., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Quiles, J.L., Bompadre, S., Mezzetti, B., & Battino M. (2014a). An anthocyanin-rich strawberry extract protects against oxidative stress damage and improves mitochondrial functionality in human dermal fibroblasts exposed to an oxidizing agent. *Food & Function*, 5(8),1939-48.
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J.M., Mazzoni, L., Forbes-Hernandez, T.Y., Gasparrini, M., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Quiles, J.L., Bompadre, S., Mezzetti, B., & Battino, M. (2014b). Polyphenol-rich strawberry extract protects human dermal fibroblasts against hydrogen peroxide oxidative damage and improves mitochondrial functionality. *Molecules*, 19, 7798-7816.
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J.M., Mazzoni, L., Romandini, S., Bompadre, S., Diamanti, J., Capocasa, F., Mezzetti, B., Quiles, J.L., Ferreira, M.S., Tulipani, S., & Battino, M. (2013). The potential impact of strawberry on human health. *Natural Product Research*, 27(4-5), 448-455.

- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J.M., Quiles, J.L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28(1), 9-19.
- Gil-Ariza, D.J., Amaya, I., López-Aranda, J.M., Sánchez-Sevilla, J.F., Botella, M.Á., & Valpuesta, V. (2009). Impact of plant breeding on the genetic diversity of cultivated strawberry as revealed by expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(3), 337-347.
- Gil-Izquierdo, A., Zafrilla, P., & Tomás-Barberán, F.A. (2002). An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*, 214(2), 155-9.
- Gill, S.S., & Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- Giuntini, D., Lazzeri, V., Calvenzani, V., Dall'Asta, C., Galaverna, G., & Tonelli, C. (2008). Flavonoid profiling and biosynthetic gene expression in flesh and peel of two tomato genotypes grown under UV-B-depleted conditions during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5905-5915.
- Giusti, M.M., & Wrolstad, R.E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In: R.E. Wrolstad (Ed.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: Wiley.
- Giusti, M.M., Rodríguez-Saona, L.E., & Wrolstad, R.E. (1999). Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4631-4637.
- Gómez-Mora, J.A., Miranda, L., Medina-Mínguez, J.J., Soria, C., & Domínguez, P. (2015). Panorama varietal en el cultivo de la fresa en Huelva. Periodo 2012-2015. SERVIFAPA. Junta de Andalucía. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.
- González-Aguilar, G.A., Blancas-Benítez, F.J., & Sáyago-Ayerdi, S.G. (2017). Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: Molecular interactions and bioaccessibility. *Current Opinion in Food Science*, 13, 84-88.
- Granese, T., Cardinale, F., Cozzolino, A., Pepe, S., Ombra, M.N., Nazzaro, F., Coppola, R., & Fratianni, F. (2014). Variation of polyphenols, anthocyanins and antioxidant power in the strawberry grape (*Vitis labrusca*) after simulated gastro-intestinal transit and evaluation of *in vitro* antimicrobial activity. *Food and Nutrition Sciences*, 5(1), 41719.
- Grisebach, H. (1982). Biosynthesis of anthocyanins. In: Markakis, P. (Ed.), *Anthocyanins as Food Colors*. New York: Academic Press; pp 67-92.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94, 651-715.
- Gulcin İ. (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345-391.
- Gündüz, K.; Ozdemir, E. (2014). The effects of genotype and growing conditions on antioxidant capacity, phenolic compounds, organic acid and individual sugars of strawberry. *Food Chemistry*, 155, 298-303.
- Hackman, R.M., Polagruto, J.A., Yan Zhu, Q., Sun, B., Fujii, H., & Keen, C.L. (2008). Flavonols: digestion, absorption and bioactivity. *Phytochemistry Reviews*, 7, 195-208.
- Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., & Riechel, T.L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1887-1892.
- Häkkinen, S.H., & Törrönen, A.R. (2000). Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food research international*, 33(6), 517-524.

- Häkkinen, S.H., Kärenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkänen, H.M., & Törrönen, A.R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2274-2279.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*, 142(2), 231-255.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 91, 14-22.
- Hancock J., Sjulín T., & Lobos G. (2008). Strawberries. In: Hancock J.F. (eds), Temperate Fruit Crop Breeding. Springer, Dordrecht.
- Hancock, J. F. (1999). Strawberries. CAB International, Wallingford, UK.
- Hannum, S.M. (2004). Potential Impact of Strawberries on Human Health: A Review of the Science, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(1), 1-17.
- Hardman, W.E. (2014). Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutrition Research and Practice*, 8(3), 233-240.
- Heide, O.M. (1977). Photoperiod and temperature interactions in growth and flowering of strawberry. *Physiologia Plantarum*, 40(1), 21-26.
- Henning, S.M., Zhang, Y., Rontoyanni, V.G., Huang, J., Lee, R.P., Trang, A., Nuernberger, G., & Heber, D. (2014). Variability in the antioxidant activity of dietary supplements from pomegranate, milk thistle, green tea, grape seed, Goji, and Acai: Effects of *in vitro* digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4313-4321.
- Hertog, M., Hollman, P., & Katan, M. (1992) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2379-2383
- Hornbuckle, W.E., Simpson, K.W., & Tennant, B.C. (2008). Gastrointestinal Function. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editors. Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Sixth Edition), Elsevier, Boston. p. 413-458.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Huang, W.Y., Zhang, H.C., Liu, W.X. & Li, C.Y. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing, *Journal of Zhejiang University: Science B*, 13(2), 94-102.
- Hung, H. C., Joshipura, K. J., Jiang, R., Hu, F. B., Hunter, D., Smith-Warner, S. A., Colditz, G.A., Rosner, B., Spiegelman, D., & Willett, W. C. (2004). Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(21), 1577-1584.
- Hurtado, M., Vilanova, S., Plazas, M., Gramazio, P., Andújar, I., Herraiz, F.J., Castro, A., & Prohens, J. (2014). Enhancing conservation and use of local vegetable landraces: the Almagro eggplant (*Solanum melongena* L.) case study. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61, 787-795.
- ISO (1988). Norma Internacional para la Determinación de Taninos. No. 9648.
- Ito, H., & Saito, T. (1962). Studies on the flower formation in the strawberry plants. *Tohoku Journal of agricultural research*, 13(3), 191-203.
- Jansen, M.A., Gaba, V., & Greenberg, B.M. (1998). Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage repair and acclimation. *Trends in Plant Science*, 3, 131-135.
- Jian-Ming, L., Lin, P.H., Yao, Q., & Chenet, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14, 840-860.

- Jiao, X., Li, B., Zhang, Q., Gao, N., Zhang, X., & Meng, X. (2018). Effect of *in vitro*-simulated gastrointestinal digestion on the stability and antioxidant activity of blueberry polyphenols and their cellular antioxidant activity towards HepG2 cells. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(1), 61-71.
- Jiménez, A., Selga, A., Torres, J.L., & Julià, L. (2004). Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3-ols. *Organic letters*, 6(24), 4583-4586.
- Joseph, S.V., Edirisinghe, I., & Burton-Freeman, B.M. (2014). Berries: Anti-inflammatory effects in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 3886–903.
- Jouquand, C., Chandler, C., Plotto, A., & Goodner, K. (2008). A sensory and chemical analysis of fresh strawberries over harvest dates and seasons reveals factors that affect eating quality. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(6), 859–867.
- Kader, A. (2001). Importance of fruits, nuts, and vegetables in human nutrition and health. *Perishables handling quarterly*, 106(4), 6.
- Kader, A.A. (1991). Quality and its maintenance in relation to the postharvest physiology of strawberry. In: Luby, J.J., Dale, A. (Eds.), *The strawberry into the twenty-first century*. Timber Press. Portland, OR, pp. 145–152.
- Kadir, S., Sidhu, G., & Al-Khatib, K. (2006). Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) growth and productivity as affected by temperature. *HortScience*, 41(6), 1423-1430.
- Kadomura-Ishikawa, Y., Miyawaki, K., Noji, S., & Takahashi, A. (2013). Phototropin 2 is involved in blue light-induced anthocyanin accumulation in *Fragaria x ananassa* fruits. *Journal of Plant Research*, 126(6), 847-857.
- Kahlon, T.S., & Smith, G.E. (2007). *In vitro* binding of bile acids by blueberries (*Vaccinium* spp.), plums (*Prunus* spp.), prunes (*Prunus* spp.), strawberries (*Fragaria X ananassa*), cherries (*Malpighia puniceifolia*), cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and apples (*Malus sylvestris*). *Food Chemistry*, 100, 1182-1187.
- Kalt, W., Forney, C.F., Martin, A., & Prior, R.L. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4638–4644.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41–60.
- Kataoka, I., Beppu, K., & Sugiyama, A. (2005). Involvement of UV rays in sweet cherry fruit coloration during maturation. *Acta Horticulturae*. 667, 461–466.
- Kerler, J., Jagers, P., Bouter, N., Weenen, H., Bruijnje, A., Glasius, M., Duineveld, K., Heij, H., & Meulenbroek, B. (1999). Strawberry derived flavor via plant breeding (pp 370-374). In: Schieberle, P., Engel, K.H., (Eds), *Frontiers of Flavour Science, Proceedings of the Weurman Flavour Research Symposium, 9th, Freising, Germany*. Deutsche Forschung. Lebensmittel: Garching, Germany, 2000.
- Keutgen, A., & Pawelzik, E. (2007). Modifications of taste-relevant compounds in strawberry fruit under NaCl salinity. *Food Chemistry*, 105(4), 1487–1494.
- Kim, J.S. (2018). Antioxidant activities of selected berries and their free, esterified, and insoluble-bound phenolic acid contents. *Preventive Nutrition and Food Science*, 23(1), 35–45.
- Koca, I., & Karadeniz, B. (2009). Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the black sea region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 121, 447–450.
- Kosińska-Cagnazzo, A., Diering, S., Prim, D., & Andlauer, W. (2015). Identification of bioaccessible and uptaken phenolic compounds from strawberry fruits in *in vitro* digestion/Caco-2 absorption model. *Food Chemistry*, 170, 288-294.
- Kosińska, A., Diering, S., Prim, D., Héritier, J., & Andlauer, W. (2013). Phenolic compounds profile of strawberry fruits of Charlotte cultivar. *Journal of Berry Research*, 3, 15–23.

- Krüger, E., Dietrich, H., Hey, M., & Patz, C.D. (2011). Effects of cultivar, yield, berry weight, temperature and ripening stage on bioactive compounds of black currants. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 84(1), 40-46.
- Kumaran, A., & Karunakaran, R.J. (2007). Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 100, 356–361.
- Lafitte R. (2003). Managing water for controlled drought in breeding plots. (2003). In: Fischer, K.S., Lafitte, R., Fukai, S., Atlin, G., Hardy, B., (eds), *Breeding rice for drought-prone environments*. (pp 23-27). International Rice Research Institute, Los Baños (Philippines).
- Lambert, J.D., & Elias, R.J. (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 65-72.
- Landete, J.M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44(5), 1150-1160.
- Laparra, J.M., & Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*, 61(3), 219–225.
- Larrosa, M., Tomas-Barberan, F.A., & Espin, J.C. (2006). The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 611–625.
- Lattanzio, V., Kroon, P.A., Quideau, S., & Treutter, D. (2008). Plant phenolics-secondary metabolites with diverse functions. *Recent Advances in Polyphenol Research*, 1, 1-35.
- Lee, K.W., & Lee, H.J. (2006). Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress-mediated carcinogenesis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127(5), 424-431.
- Lee, S., & Kader, A.A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207–220.
- Lee, Y. (2017). Cancer chemopreventive potential of procyanidin. *Toxicology Research*, 33(4), 273–282.
- Leonardi, C., Guichard, S., & Bertin, N. (2000). High vapour pressure deficit influences growth, transpiration and quality of tomato fruits. *Scientia Horticulturae*, 84(3-4), 285-296.
- Li, K., Ma, C., Jian, T., Sun, H., Wang, L., Xu, H., Li, W., Su, H., & Cheng, X. (2017). Making good use of the byproducts of cultivation: Green synthesis and antibacterial effects of silver nanoparticles using the leaf extract of blueberry. *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3569–3576.
- Li, P., Jia, J., Zhang, D., Xie, J., Xu, X., & Wei, D. (2013). *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of a flavonoid isolated from celery (*Apium graveolens* L. var. dulce). *Food & Function*, 5, 50 – 56.
- Li, P., Ma, F., & Cheng, L. (2013). Primary and secondary metabolism in the sun exposed peel and the shaded peel of apple fruit. *Physiologia Plantarum*, 148, 9–24.
- Liang, D., Wang, B., Song, S., Wang, J., Wang, L., Wang, Q., Ren, X. & Zhao, X. (2019). Analysis of genetic effects on a complete diallel cross test of *Pinus koraiensis*. *Euphytica*, 215(5), 92.
- Lopes-da-Silva, F., de Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J., & Santos-Buelga, C. (2002). Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv. Camarosa) by LC using DAD and ESI–MS detection. *European Food Research and Technology*, 214, 248–253.
- López-Aranda, J.M. (2008). El cultivo de la fresa en Huelva, La Fresa de Huelva. Junta de Andalucía (ed). Ideas, Exclusivas y Publicidad S.L., Sevilla (Spain), pp.101-174.
- López-Aranda, J.M., Medina, J.J., Marsal, J.I., & Bartual, R. (2003). Strawberry production in Spain, (p. 230–237). In: Childers, N.F. (ed.). The strawberry. A book for growers. University of Florida, Gainesville, FL.
- Loughrin, J.H., & Kasperbauer, M.J. (2002). Aroma of fresh strawberries is enhanced by ripening over red versus black mulch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 161-165.
- Løvdaal, T., Olsen, K.M., Slimestad, R., Verheul, M., & Lillo, C. (2010). Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry* 71, 605-613.

- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J.A., & Fernández-López, J. (2018). *In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, 107, 423-436.
- Luthria, D.L. (2006). Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(14), 2266-2272.
- Määttä, K.R., Kamal-Eldin, A., & Torronen, A.R. (2004). Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6178-6187.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., & Garg, M.L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2046-2056.
- Mackenzie, S.J., Chandler, C.K., Hasing, T., & Whitaker, V.M. (2011). The role of temperature in the late-season decline in soluble solids content of strawberry fruit in a subtropical production system. *Horticultural Science*, 46(11), 1562-1566.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans I: review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 230S-42S.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- Manganaris, G.A., Goulas, V., Vicente, A.R., & Terry, L.A. (2013). Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 825-833.
- Marhuenda, J., Alemán, M.D., Gironés-Vilaplana, A., Pérez, A., Caravaca, G., Figueroa, F., Mulero, J., & Zafrilla, P. (2016). Phenolic composition, antioxidant activity, and *in vitro* availability of four different berries. *Journal of Chemistry*, 2016, 5194901
- Marmon, S.K., & Undeland, I. (2013). Effect of alkaline pH-shift processing on *in vitro* gastrointestinal digestion of herring (*Clupea harengus*) fillets. *Food Chemistry*, 138(1), 214-219.
- Martin, K.R., & Appel, C.L. (2010). Polyphenols as dietary supplements: a double-edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements*, 2, 1-12.
- Martínez-Ferri, E., Ariza, M.T., Domínguez, P., Medina, J. J., Miranda, L., Muriel, J. L., Montesinos, P., Rodríguez-Díaz, J. A., & Soria, C. (2014). Cropping strawberry for improving productivity and environmental sustainability. In: *Strawberry*. Ed. Nathan Malone. Nova Science Publishers.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M.J., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos en la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50, 5-18.
- Martini, S., Conte, A., & Tagliacuzzi, A. (2018). Bioaccessibility, bioactivity and cell metabolism of dark chocolate phenolic compounds after *in vitro* gastro-intestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 49, 424-436.
- Mattheis, J.P., & Fellman, J.K. (1999). Preharvest factors influencing flavor of fresh fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 227-232.
- Mazzoni, L., Pérez-López, P., Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J.M., Gasparri, M., Forbes-Hernandez, T.Y., Quiles, J.L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2015). The genetic aspects of berries: from field to health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 365-71.
- McDougall, G.J., Allwood, J.W., Pereira-Caro, G., Brown, E.M., Latimer, C., Dobson, G., Stewart, D., Ternan, N.G., Lawther, R., O'Connor, G., Rowland, I., Crozier, A., & Gill, C.I.R. (2017). The composition of potentially bioactive triterpenoid glycosides in red raspberry is influenced by tissue, extraction procedure and genotype. *Food & Function*, 8(10), 3469-3479.
- McDougall, G., Dobson, P., Shpiro, F., Smith, P., Stewart, D., & Fyffe, S. (2007). Assessing bioavailability of soft fruit polyphenols *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 744, 135-148.

- McDougall, G.J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005a). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5896–5904.
- McDougall, G., Dobson, P., Shpiro, F., Smith, P., Stewart, D., & Fyffe, S. (2005b). Assessing bioavailability of soft fruit polyphenols *in vitro*. In I International Symposium on Human Health Effects of Fruits and Vegetables 744 (pp. 135-148).
- McGhie, T.K., & Walton, M.C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 702–713.
- Medina-Mínguez, J.J., Miranda, L., Gómez-Mora, J.A., & Soria, C. (2018). Evaluación de Variedades de Fresa: Resultados Obtenidos en Cultivo Convencional con Suelo Desinfectado Químicamente. Campaña 2017/2018. SERVIFAPA. Junta de Andalucía. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.
- Medina, J.J., Miranda, L., Soria, C., Palencia, P., & López-Aranda, J.M. (2009). Non-chemical alternatives to methyl bromide for strawberry: biosolarization as a case-study in Huelva. *Acta Horticulturae*. 842, 961-964.
- Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P., & Carvalho, M. (2011). Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2285 – 2291.
- Meyers, K.J., Watkins, C.B., Pritts, M.P., & Liu, R.H. (2003) Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6887-92.
- Mezzetti, B., Giampieri, F., Zhang, Y.T., & Zhong, C.F. (2018). Status of strawberry breeding programs and cultivation systems in Europe and the rest of the world. *Journal of Berry Research*, 8(3), 205-221.
- Mezzetti, B., Balducci, F., Capocasa, F., Zhong, C.-F., Cappelletti, R., Di Vittori, L., Mazzoni, L., Giampieri, F., & Battino, M. (2016). Breeding strawberry for higher phytochemicals content and claim it: is it possible?, *International Journal of Fruit Science*, 16(1), 194-206.
- Mezzetti, B. (2013). Breeding and biotechnology for improving the nutritional quality of strawberry. *Journal of Berry Research*, 3(3), 127-133.
- Milivojević, J., Rakonjac, V., Pristov, J.B., & Maksimović, V. (2013). Classification and fingerprinting of different berries based on biochemical profiling and antioxidant capacity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(9), 1285-1294.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., & Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124.
- Miranda, L., Gómez-Mora, J.A., Medina, J.J., Ariza, M.T., Domínguez, P., Martínez-Ferri, E., & Soria, C. (2015). Estudio comparativo de diez variedades de fresa. *Vida Rural* 405, 34-38.
- Mitcham, B., Cantwell, M., & Kader, A. (1996). Methods for determining quality of fresh commodities. *Perishables handling newsletter*, 85, 1-5.
- Moongkarndi, P., Srivattana, A., Bunyaphatsara, N., Puthong, S., & Laohathai, K. (1991). Cytotoxicity assay of hispidulin and quercetin using colorimetric technique. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18, 25–31.
- Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B., & Wrolstad, R.E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits, Vaccinium, Rubus, and Ribes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 519–25.

- Mullen, W., Lean, M.E., & Crozier, A. (2002). Rapid characterization of anthocyanins in red raspberry fruit by high-performance liquid chromatography coupled to single quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 966, 63–70.
- Muratalla, A., Jaen, D., & Arévalo, L. (2013). La producción de frambuesa y zarzamora en México. *Revista Agroproductividad*, 6, 6(5), 3-13.
- Murray, X.J., Holcroft, D.M., Cook, N.C., & Wand, S.J.E. (2005). Postharvest quality of “Laetitia” and “Songold” (*Prunus salicina* Lindell) plums as affected by preharvest shading treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 37, 81–92.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., & Scaccini, C. (2002). Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5735–5741.
- Nestby, R., & Trandem, N. (2013). Supplemental LED growth light in remontant strawberry at high latitudes. *Journal of Berry Research*, 3, 217–226.
- Nile, S.H., & Park, S.W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134-144.
- Nowicka, A., Kucharska, A.Z., Sokół-Łętowska, A., & Fecka, I. (2019). Comparison of polyphenol content and antioxidant capacity of strawberry fruit from 90 cultivars of *Fragaria* × *ananassa* Duch. *Food Chemistry*, 270, 32-46.
- Ordidge, M., García-Macías, P., Battey, N.H., Gordon, M.H., Hadley, P., John, P., Lovegrove, J.A., Vysini, E., & Wagstaffe, A. (2010). Phenolic contents of lettuce, strawberry, raspberry, and blueberry crops cultivated under plastic films varying in ultraviolet transparency. *Food Chemistry* 119(3), 1224–1227.
- Paixao, J., Dinis, T.C., & Almeida, L.M. (2011). Dietary anthocyanins protect endothelial cells against peroxynitrite-induced mitochondrial apoptosis pathway and Bax nuclear translocation: an *in vitro* approach. *Apoptosis*, 16, 976–989.
- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J.F., & González-Aguilar, G.A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 76(1), R6–R15.
- Palmieri, L., Masuero, D., Martinatti, P., Baratto, G., Martens, S., & Vrhovsek, U. (2017). Genotype-by-environment effect on bioactive compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(12), 4180-4189.
- Pan, P., Skaer, C., Yu, J., Zhao, H., Ren, H., Oshima, K., & Wang, L.S. (2017). Berries and other natural products in the pancreatic cancer chemoprevention in human clinical trials. *Journal of Berry Research*, 7, 147-161.
- Pantelidis, G.E., Vasilakakis, M., Manganaris, G.A., & Diamantidis, G.R. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102(3), 777-783.
- Parada, J., & Aguilera, J.M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), R21-R32.
- Pardossi, A., Giacomet, P., Malorgio, F., Albin, F.M., Murelli, C., Serra, G., & Vernieri, P. (2000). The influence of growing season on fruit yield and quality of greenhouse melon (*Cucumis melo* L.) grown in nutrient film technique in a Mediterranean climate. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(4), 488-493.
- Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M.L., Vigna-Pérez, M., & Hernández-Pérez, T. (2010). Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life—a review. *Plant foods for human nutrition*, 65(3), 299-308.
- Pavlica, S., & Gebhardt, R. (2005). Protective effects of ellagic and chlorogenic acids against oxidative stress in PC12 cells. *Free Radical Research*, 39(12), 1377-90.

- Pék, Z., Szuvandzsiev, P., Nemenyi, A., Helyes, L., & Lugasi, A. (2011). The effect of natural light on changes in antioxidant content and color parameters of vine-ripened tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits. *HortScience* 46, 583-585.
- Perez, A.G., Olias, R., Espada, J., Olias, J.M., & Sanz, C. (1997). Rapid determination of sugars, nonvolatile acids, and ascorbic acid in strawberry and other fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3545–3549.
- Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., & García-Viguera, C. (2002). *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2308-2312.
- Pinelo, M., Laurie, F., & Waterhouse, A. (2006). A simple method to separate red wine nonpolymeric and polymeric phenols by solid-phase extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2839–2844.
- Podswdek, A., Redzynia, M., Klewicka, E., & Koziokiewicz, M. (2014). Matrix effects on the stability and antioxidant activity of red cabbage anthocyanins under simulated gastrointestinal digestion. *BioMed Research International*, 2014, 1–11.
- Porrini, M., & Riso, P. (2008). Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(10), 647 – 650.
- Prior, R.L. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 570S-578S.
- Puchau, B., Zulet, M.Á., de Echávarri, A.G., Hermsdorff, H.H.M., & Martínez, J.A. (2009). Dietary total antioxidant capacity: a novel indicator of diet quality in healthy young adults. *Journal of the American College of Nutrition*, 28(6), 648-656.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Alakomi, H. L., & Oksman-Caldentey, K.M. (2005). Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1), 8-18.
- Pyrotis, S., Abayomi, L., Rees, D., & Orchard, J. (2010). Effect of temperature and humidity on strawberry firmness at two different sites in the Huelva region of Spain. In: XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on 926 (pp. 567-570).
- Qian, M., Zhang, D., Yue, X., Wang, S., Li, X., & Teng, Y. (2013). Analysis of different pigmentation patterns in “Mantianhong” (*Pyrus pyrifolia* Nakai) and “Cascade” (*Pyrus communis* L.) under bagging treatment and postharvest UV-B/visible irradiation conditions. *Scientia Horticulturae*. 151, 75–82.
- Qin, Y., Wang, L., Liu, Y., Zhang, Q., Li, Y., & Wu, Z. (2018). Release of phenolics compounds from *Rubus idaeus* L. dried fruits and seeds during simulated *in vitro* digestion and their bio-activities. *Journal of Functional Foods*, 46, 57–65.
- Quan, W., Tao, Y., Lu, M., Yuan, B., Chen, J., Zeng, M., Guo, F. & He, Z. (2018). Stability of the phenolic compounds and antioxidant capacity of five fruit (apple, orange, grape, pomelo and kiwi) juices during *in vitro*-simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(5), 1131-1139.
- Rajan, V.K., Hasna, C.K., & Muraleedharan, K. (2018). The natural food colorant peonidin from cranberries as a potential radical scavenger – A DFT based mechanistic analysis. *Food Chemistry*, 262, 184–190.
- Ramadan, M.F., Sitohy, M.Z., & Morsel, J.T. (2008). Solvent and enzyme-aided aqueous extraction of goldenberry (*Physalis peruviana* L) pomace oil impact of processing on composition and quality of oil and meal. *European Food Research and Technology*, 226, 1445–8.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

- Record, I.R., & Lane, J.M. (2001). Simulated intestinal digestion of green and black teas. *Food Chemistry*, 73(4), 481-486.
- Remberg, S.F., Sønsteby, A., Aaby, K., & Heide, O.M. (2010). Influence of postflowering temperature on fruit size and chemical composition of Glen Ample raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9120-9128.
- RIA, red información agroclimática de Andalucía. <https://ifapa.junta-andalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/ria/servlet/FrontController>. Acceso 20-10-2019
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.
- Riehle, P., Vollmer, M. & Rohn, S. (2013). Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions, antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Research International*, 53(2), 891–899.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 66(4), 401-436.
- Ruan, J., Lee, Y.H., Hong, S.J., & Yeung, Y.R. (2013). Sugar and organic acid contents of day-neutral and ever-bearing strawberry cultivars in high-elevation for summer and autumn fruit production in Korea. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 54(3), 214-222.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M.L., & Vanella, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biology and Toxicology*, 16(2), 91–98.
- Ryan, L., & Prescott, S.L. (2010). Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an *in vitro* digestion. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 1191-1197.
- Saha, S.K., Lee, S.B., Won, J., Choi, H.Y., Kim, K., Yang, G-M., Dayem, A.A., & Cho S-G. (2017). Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1544.
- Salentijn, E.M., Aharoni, A., Schaart, J.G., Boone, M.J., & Krens, F. A. (2003). Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. *Physiologia Plantarum*, 118(4), 571-578.
- Sams, C.E. (1999). Preharvest factors affecting postharvest texture. *Postharvest Biology. Technology*, 15, 249–254.
- Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D., & Drilleau, J.F. (1999). Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 4847–53.
- Santos-Buelga, C., & Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1094–1117.
- Sanz, C., & Pérez, A.G. (2010). Plant Metabolic Pathways and Flavor Biosynthesis (129-157). In: Hui, Y.H. (ed), *Handbook of fruit and vegetable flavors*. John Wiley & Sons, Inc.
- Sasidharan, R., Chinnappa, C.C., Staal, M., Elzenga, J.T., Yokoyama, R., Nishitani, K., Voeselek, L.A., & Pierik, R. (2010). Light quality-mediated petiole elongation in Arabidopsis during shade avoidance involves cell wall modification by xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases. *Plant Physiology*, 154, 978-90.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306.
- Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., & Battino, M. (2005). Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, 21(2), 207-213.
- Sebastià, N., Montoro, A., León, Z., & Soriano, J.M. (2017). Searching trans-resveratrol in fruits and vegetables: a preliminary screening. *Journal of food science and technology*, 54(3), 842-845.

- Seeram, N.P., Adams, L.S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H.S., & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9329–9339.
- Seeram, N.P., Zhang, Y., & Nair, M.G. (2003). Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and Catechins. *Nutrition and Cancer*, 46, 101–6.
- Seeram, N.P., Momin, R.A., Bourquin, L.D., & Nair, M.G. (2001). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides from cherries and berries. *Phytomedicine*, 8, 362–9.
- Sengul, H., Surek, E., & Nilufer-Erdil, D. (2014). Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an in-vitro gastrointestinal digestion model. *Food Research International*, 62, 1069-1079.
- Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2007). Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Research International*, 40, 15–21.
- Shahidi, F., & Peng, H. (2018). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives*, 4, 11-68.
- Shahzad, S., Aoyagi, K., Winter, A., Koyama, A., & Bitsch, I. (2001). Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *The Journal of Nutrition*, 131(4), 1207-1210.
- Shamaila, M., Powrie, W.D., & Skura, B.J. (1992). Sensory evaluation of strawberry fruit stored under modified atmosphere packaging (MAP) by quantitative descriptive analysis. *Journal of Food Science*, 57(5), 1168-1184.
- Shashirekha, M.N., Mallikarjuna, S.E., & Rajarathnam, S. (2015). Status of bioactive compounds in foods, with focus on fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(10), 1324-1339.
- Shaw, D.V., & Larson, K.D. (2008). Performance of early-generation and modern strawberry cultivars from the University of California breeding programme in growing systems simulating traditional and modern horticulture. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83, 648-652.
- Shaw, D.V. (1988). Genotypic variation and genotypic correlations for sugars and organic acids of strawberries. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113, 770–774.
- Shin, Y., Liu, R.H., Nock, J.F., Holliday, D., & Watkins, C.B. (2007). Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 45(3), 349-357.
- Shinohara, Y. (1987). Growing conditions and quality of vegetables: effect of light and fertilizer conditions on the ascorbic acid content of vegetables. *Memoirs of Institute of Agriculture and Forestry-University of Tsukuba. Agricultural and Forestry Science (Japan)*, 3, 61–156.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 24673-24706.
- Smart, R.E., Smith, S.M., & Winchester, R.V. (1988). Light Quality and Quantity Effects on Fruit Ripening for Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 250-258.
- Solari-Godiño, A., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Borderías, A.J., & Moreno, H.M. (2017). Anchovy mince (*Engraulis ringens*) enriched with polyphenol-rich grape pomace dietary fibre: *In vitro* polyphenols bioaccessibility, antioxidant and physico-chemical properties. *Food Research International*, 102, 639-646.

- Song, H.L., Zhang, X., Wang, W.Z., Liu, R.H., Zhao, K., Liu, M.Y., Gong, W.M., & Ning, B. (2018). Neuroprotective mechanisms of rutin for spinal cord injury through anti-oxidation and anti-inflammation and inhibition of p38 mitogen activated protein kinase pathway. *Neural Regeneration Research*, 13(1), 128.
- Soria, C., Miranda, L., Ariza, M.T., Gómez-Mora, J.A., Martínez-Ferri, E., Cervantes, L., & Medina-Mínguez, J.J. (2017). Evaluación de Variedades de Fresa: Resultados obtenidos en Cultivo Convencional con Suelo Biosolarizado. Campaña 2016/2017. SERVIFAPA. Junta de Andalucía. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.
- Soria, C., Medina, J.J., Domínguez, P., Ariza, M.T., Miranda, L., Villalba, R., Gálvez, J., Sánchez-Sevilla, J.F., Amaya, I., Sesmero, R., & López-Aranda J.M. (2010). 'Fuentepina' strawberry. *HortScience*, 45(3), 448–450.
- Stack, D., & Wray, V. (1993). Anthocyanins. In: Harborne, J.B., editor. *Methods in Plant Biochemistry, Plant Phenolics*. Academic Press, London. Vol. 1:pp. 325–356.
- Stoner, G.D., & Seeram, N.P. (2011). *Berries and cancer prevention*. New York, Springer.
- Stoupi, S., Williamson, G., Viton, F., Barron, D., King, L.J., Brown, J.E., & Clifford, M.N. (2010). *In vivo* bioavailability, absorption, excretion, and pharmacokinetics of [14C] procyanidin B2 in male rats. *Drug Metabolism Disposition*, 38(2), 287–291.
- Studzinski, G.P. (1995). *Cell Growth and apoptosis a practical approach*; Oxford University Press: Oxford, UK.
- Szajdek, A., & Borowska, E.J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63, 147.
- Taghavi, T., Siddiqui, R., & Rutto, L.K. (2019). The effect of preharvest factors on fruit and nutritional quality in strawberry. In: *Strawberry-Pre-and post-harvest management techniques for higher fruit quality*. IntechOpen.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599–606.
- Talcott, S.T. (2007). Chemical components of berry fruits. In: Zhao, Y. *Berry fruit: value-added products for health promotion* (pp.51-68). CRC Press.
- Tarazona-Díaz, M.P., Viegas, J., Moldao-Martins, M., & Aguayo, E. (2011). Bioactive compounds from flesh and by-product of fresh-cut watermelon cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(5), 805-812.
- Tavares, L., Figueira, I., Macedo, D., McDougall, G.J., Leitão, M.C., Vieira, H.L., Stewart, D., Alvesa, P.M., Ferreira, R.B., & Santos, C.N. (2012). Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 131(4), 1443-1452.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S.D., & Gerós, H. (2013). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18711–18739.
- Terry, L. (2011). *Health-promoting properties of fruit and vegetables*, CABI, Wallingford, UK.
- Thilakarathna, S.H., & Rupasinghe, H.P.V. (2013). Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, 5, 3367–3387.
- Thomas-Valdés, S., Theoduloz, C., Jiménez-Aspee, F., Burgos-Edwards, A., & Schmeda-Hirschmann, G. (2018). Changes in polyphenol composition and bioactivity of the native Chilean white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* f. *chiloensis*) after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 105, 10-18.
- Thompson, P.A. (1971). Environmental effects on pollination and receptacle development in the strawberry. *Journal of Horticultural Science*, 46(1), 1-12.
- Tomás-Barberán, F.A., & Clifford, M.N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1024-1032.

- Tulipani, S., Mezzetti, B., Capocasa, F., Bompadre, S., Beekwilder, J., & De Vos, C.H.R. (2008). Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 696–704.
- Tustin, D.S., Hirst, P.M., & Warrington, I.J. (1988). Influence of orientation and position of fruiting laterals on canopy light penetration, yield, and fruit quality of 'Granny Smith' apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113, 693–699.
- Uleberg, E., Rohloff, J., Jaakola, L., Tröst, K., Junttila, O., Häggman, H., & Martinussen, I. (2012). Effects of temperature and photoperiod on yield and chemical composition of northern and southern clones of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(42), 10406–10414.
- USDA, 2018. Food Composition Database. URL <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/> Accessed 18.11.2018.
- Valladares, F., Sánchez-Gómez, D., & Zavala, M.A. (2006). Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology*, 94, 1103–1116.
- Valladares, F., Arrieta, S., Aranda, I., Lorenzo, D., Tena, D., Sánchez-Gómez, D., Suarez, F., & Pardos, J.A. (2005). Shade tolerance, photoinhibition sensitivity and phenotypic plasticity of *Ilex aquifolium* in continental-Mediterranean sites. *Tree Physiology*, 25, 1041–1052.
- Valladares, F., Martínez-Ferri, E., Balaguer, L., Pérez-Corona, M.E., & Manrique, E. (2000). Low leaf-level response to light and nutrients in Mediterranean evergreen oaks: a conservative resource-use strategy? *New Phytologist*, 148, 79–91.
- Van De Velde, F., Tarola, A.M., Güemes, D., & Pirovani, M.E. (2013). Bioactive compounds and antioxidant capacity of Camarosa and Selva strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Foods*, 2, 120–131.
- Van Dijk, C., Boeriu, C., Peter, F., Stolle-Smits, T. & Tijskens, L.M.M. (2006). The firmness of stored tomatoes (cv. Tradiro). 1. Kinetic and near infrared models to describe firmness and moisture loss. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 575–584.
- Vicente, E., Giménez, G., Manzoni, A., Vilaró, F., González, M., & Cabot, M. (2009). Strawberry Breeding in Uruguay. *Acta Horticulturae*, 842, 411–414.
- Viuda-Martos, M., Lucas-Gonzalez, R., Ballester-Costa, C., Pérez-Álvarez, J.A., Muñoz, L.A., & Fernández-López, J. (2018). Evaluation of protective effect of different dietary fibers on polyphenolic profile stability of maqui berry (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food & Function*, 9(1), 573–584.
- Walle, T., Browning, A.M., Steed, L.L., Reed, S.G., & Walle, U.K. (2005). Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *The Journal of Nutrition*, 135(1), 48–52.
- Wang, P., Mu, X., Du, J., Gao, Y.G., Bai, D., Jia, L., Zhang, J., Ren, H. & Xue, X. (2018). Flavonoid content and radical scavenging activity in fruits of Chinese dwarf cherry (*Cerasus humilis*) genotypes. *Journal of Forestry Research*, 29(1), 55–63.
- Wang, S.Y. (2011). Correlation of antioxidants and antioxidant enzymes to oxygen radical scavenging activities in berries. In G.D. Stoner, N.P. Seeram (Eds.), *Berries and Cancer Prevention*. New York: Springer-Verlag.
- Wang, S.Y., Chen, C.T., & Wang, C.Y. (2009). The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food Chemistry*, 112, 676–684.
- Wang, S.Y., & Stretch, A.W. (2001). Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 969–974.
- Wang, S.Y., & Zheng, W. (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4977–4982.
- Wang, S., & Camp M. (2000). Temperatures after bloom affect plant growth and fruit quality of strawberry. *Scientia Horticulturae*, 85(3), 183–99.

- Watson, R., Wright, C. J., McBurney, T., Taylor, A.J., & Linforth, R.S.T. (2002). Influence of harvest date and light integral on the development of strawberry flavour compounds. *Journal of Experimental Botany*, 53, 2121–2129.
- Weatherspoon, D.D., Oehmke, J.F., Coleman, M.A., & Weatherspoon, L.J. (2014). Understanding consumer preferences for nutritious foods: Retailing strategies in a food desert. *International Food and Agribusiness Management Review*, 17, 61-82.
- Weh, K.M., Aiyer, H.S., Howell, A.B., & Kresty, L.A. (2016). Cranberry proanthocyanidins modulate reactive oxygen species in Barrett's and esophageal adenocarcinoma cell lines. *Journal of Berry Research*, 6, 125-136.
- Weijsschedé, J., Martínková, J., Kroon, H.D., & Huber, H. (2006). Shade avoidance in *Trifolium repens*: costs and benefits of plasticity in petiole length and leaf size. *New Phytologist*, 172, 655-666.
- Willcox, J.K., Ash, S.L., & Catignani, G.L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 275-295.
- Williner, M.R., Pirovani, M.E., & Güemes, D.R. (2003). Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(8), 842-845.
- Wolfe, K.L., & Liu, R.H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(22), 8896-8907.
- Wootton-Beard, P.C., Moran, A. & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217–224.
- Xue, H., Aziz, R.M., Sun, N., Cassady, J.M., Kamendulis, L.M., & Xu, Y. (2002). Inhibition of cellular transformation by berry extracts. *Carcinogenesis*, 22, 351–6.
- Yang, M., Hardin, R., Ogutu, S., Verghese, M., & Boateng, J. (2016). Preliminary analysis of *in vitro* digestion and bioactivity assessment of basil and ginger in human liver cancer cell line. *Journal of Biological Sciences*, 16, 202-214.
- Yoshida, Y., Koyama, N., & Tamura, H. (2002). Color and anthocyanin composition of strawberry fruit: Changes during fruit development and differences among cultivars, with special reference to the occurrence of pelargonidin 3-malonylglucoside. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 71(3), 355–361.
- Yuliana, N.D., Khatib, A., Choi, Y.H., & Verpoorte, R. (2011). Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phytotherapy Research*, 25(2), 157–169.
- Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J.A., & Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6), 675-683.
- Zeng, Z., Liu, C., Luo, S., Chen, J., & Gong, E. (2016). The profile and bioaccessibility of phenolic compounds in cereals influenced by improved extrusion cooking treatment. *PLoS One*, 11(8), e0161086.
- Zhang, N., Lan, W., Wang, Q., Sun, X. & Xie, J. (2018). Antibacterial mechanism of *Ginkgo biloba* leaf extract when applied to *Shewanella putrefaciens* and *Saprophytic staphylococcus*. *Aquaculture and Fisheries*, 3(4), 163–169.
- Zhang, X., Allan, A.C., Yi, Q., Chen, L., Li, K., & Shu, Q. (2011). Differential gene expression analysis of Yunnan red pear, *Pyrus pyrifolia*, during fruit skin coloration. *Plant Molecular Biology* 29, 305–314.
- Zoratti, L., Jaakola, L., Häggman, H., & Giongo, L. (2015a). Modification of sunlight radiation through colored photo-selective nets affects anthocyanin profile in *Vaccinium* spp. berries. *PLoS one*, 10(8), e0135935.

Zoratti, L., Jaakola, L., Häggman, H., & Giongo, L. (2015b). Anthocyanin profile in berries of wild and cultivated *Vaccinium* spp. along altitudinal gradients in the Alps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(39), 8641-8650.

12. Anexos

En la presente Tesis Doctoral se destacan las propiedades presentes en la fresa y otros frutos rojos responsables de la calidad del fruto, que les aporta un valor añadido y los hace muy deseables para el consumidor, cada vez más interesado en productos con cualidades saludables.

No obstante, la incidencia de factores externos e internos hace que sea complicado evaluar la calidad de una variedad, y por otro lado, la determinación de su potencial saludable requiere tener en cuenta las transformaciones que ocurren durante la digestión cuando se consumen los frutos.

Los resultados destacan la necesidad de seleccionar un indicador que ponga de manifiesto el potencial saludable, y una vez establecida su relación con la bioactividad de los frutos digeridos, se ha señalado a la capacidad antioxidante biodisponible como posible parámetro indicador interesante para caracterizar variedades de frutos rojos saludables en los programas de mejora.

