



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



# DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PRODUCTOS UNTABLES DE FRESA (*vc. Camarosa*)

MASTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Autora: Villegas Castro, Nayeli

Directora: Escriche Roberto, Isabel

Codirectora: Doménech Antich, Eva

Centro: Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo  
(IUIAD)

# **DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PRODUCTOS UNTABLES DE FRESA (vc. *Camarosa*)**

<sup>1</sup> Villegas, N; Escriche, I; Doménech, E

## **RESUMEN**

El actual ritmo de vida, hace que cada vez más, el consumidor esté interesado en poder disponer de productos elaborados a base de fruta con azúcar que mantengan las propiedades beneficiosas de los productos frescos de los que proceden y que no provoquen los efectos indeseables como la caries y diabetes. En este sentido, los untables de fresa, elaborados con isomaltulosa (edulcorante de bajo índice glicérico) es un producto interesante que responde a estas exigencias. El presente trabajo tiene como principal objetivo evaluar en productos untables de fresa la influencia del tratamiento osmótico (vía húmeda o seca) con posterior tratamiento térmico (100°C durante 0, 10 ó 30 min) en la presencia de compuestos con actividad antioxidante. Se ha demostrado que el tipo de deshidratación osmótica aplicado en la obtención de estos productos untables influye significativamente en el nivel detectado de todos los compuestos analizados (ácido p-cumárico, ácido elágico, ácido gálico, kaempferol y pelargonidina) con excepción del ácido cafeico. Sin embargo no se observaron diferencias con relación al tiempo de tratamiento térmico aplicado. Un análisis multivariante (PCA) reflejó que todos los compuestos excepto la pelargonidina presentaron un comportamiento semejante, con valores más altos en los tratamientos por vía seca que en los de vía húmeda.

## **RESUM**

L'actual ritme de vida, fa que cada vegada més, el consumidor estigui interessat en poder disposar de productes elaborats a base de fruita amb sucre que mantinguin les propietats beneficioses dels productes frescos dels quals procedeixen i que no provoqui els efectes indesitjables com la càries i la diabetes. En aquest sentit, els untables de maduixa, elaborats amb isomaltulosa (edulcorant de baix índex glicèmic) és un producte interessant que respon a aquestes exigències. El present treball té com a principal objectiu avaluar en productes untables de maduixa, la influència del tractament osmòtic (via humida o seca) amb posterior tractament tèrmic (100°C durant 0, 10 ó 30 min) en la

---

<sup>1</sup> Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD).  
Camino de Vera s/n. 46022 – Valencia (Esapaña)

presència de composts amb activitat antioxidant. S'ha demostrat que el tipus de deshidratació osmòtica aplicada en l'obtenció d'aquests productes untables influeix significativament en el nivell detectat de tots els composts analitzats (àcid p-cumàric, àcid elàgic, àcid gàl·lic, kaempferol i pelargonidina) a excepció de l'àcid cafeic. Tanmateix no es van observar diferències amb relació al temps de tractament tèrmic aplicat. Una anàlisi multivariant (PCA) va reflectir que tots els composts excepte la pelargonidina van presentar un comportament semblant, amb valors més alts en els tractaments per via seca que en els de via humida.

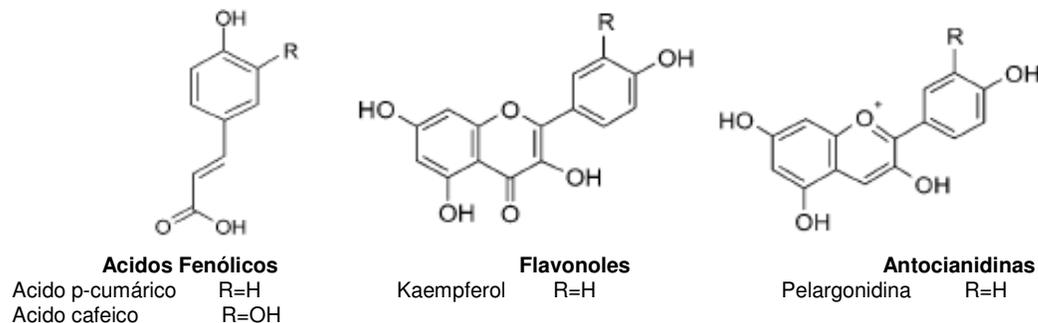
## **ABSTRACT**

The current style of life makes more and more, consumers are interested in accessibility of products made with fruit sugar to maintain the beneficial properties of fresh produce that was made, and doesn't generate undesirable effects such as caries and diabetes. In this sense, the strawberry spreads, made with isomaltulose (sweetener low glycemic index) is an interesting product that meets these requirements. The present work has as main objective to evaluate in strawberry spreads products the influence of osmotic treatment (wet or dry method) with subsequent heat treatment (100 °C for 0, 10 or 30 min) in the presence of compounds with antioxidant activity. It has been shown that the form of osmotic dehydration applied to obtain these products spreads significantly influence the level detected for all compounds studied (p-coumaric acid, ellagic acid, gallic acid, kaempferol and pelargonidin) except caffeic acid. However, no differences were observed in relation to time of heat treatment applied. A multivariate analysis (PCA) showed that all compounds except pelargonidin showed a similar behavior, with values more enormous in dry way than the wet way

Palabras clave: Antioxidantes, Fresa, Deshidratación, Isomaltulosa, HPLC.

## INTRODUCCION

La fresa es una fuente importante de fibra y compuestos bioactivos, en particular, es rica en vitamina C, folato (250 - 350 g de fresa aportan ~200µg de folato) (Carr, 1999, Bailey, 1999 y Tulipani, 2008) y compuestos con actividad antioxidante. Entre estos últimos se incluyen: Carotenoides, vitaminas, fenoles (*Ácidos fenólicos*), flavonoides (*antocianidinas* y *flavanoles*, etc.), y metabolitos endógenos (Abushita et al., 1997) (Figura1). Las antocianidinas son cuantitativamente los más importantes polifenoles en esta fruta y son los responsables de su color. De este grupo, el compuesto más abundante es la pelargonidina-3-glucosido (Hernanz et al., 2007, Tulipani et al., 2008). Entre los flavanoles destaca por su interés el *kaempferol* debido a su alta biodisponibilidad, a los mecanismos de absorción y a la bioactividad (Tulipani et al., 2008). Los ácidos fenólicos y sus derivados además pueden desempeñar un papel importante en la determinación de las diferencias genotípicas y en la composición fitoquímica de la fresa. Dentro de los ácidos fenólicos se encuentra el grupo de los hidroxycinnamatos entre los que cabe destacar el caffeoyl y los ésteres ferúlicos (Määttä et al., 2004; Hakkinen et al., 1999; Mattila et al., 2006). Entre los frutos rojos, las fresas, frambuesas y zarzamoras contienen cantidades significantes de ácido elágico (confiriendo >30% de fenoles totales en las fresas) (Koponen et al., 2007).



**FIGURA 1.** Compuestos fenólicos de mayor importancia en la fresa

Los antioxidantes derivados de plantas han mostrado tener actividad en moléculas simples o triples de oxígeno. Esta propiedad los convierte en agentes quelantes de radicales libres y en inhibidores de enzimas. Además, estudios epidemiológicos globales confirman que existe una relación inversa entre el consumo de frutas y la incidencia de enfermedades cardiovasculares, en la disminución de los índices de mortalidad, en enfermedades desarrolladas a partir de cáncer y en la actividad de enfermedades degenerativas (Halliwell, 1994; Ames et al., 1993; Dragsted et al., 1993; Willett, 1994; De Ruvo et al., 2000; Yi-Fang et al., 2002). El contenido de flavonoides y ácidos fenólicos parece que influye fuertemente la calidad de las frutas, dado que contribuyen en

sus atributos organolépticos y en su valor nutricional (Scalzo et al., 2005; Deighton et al., 2000). En la tabla 1 se muestran los compuestos antioxidantes de mayor importancia en la fresa,

**TABLA 1.** Contenido de antocianidinas, flavanoles y ácidos fenólicos expresado en µg/g de fresa fresca

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
<i>Antocianidinas</i>	
Pelargonidina-3-glucosido <sup>a, b y c</sup>	12 – 248
<i>Flavanoles</i>	
Kaempferol <sup>b, c, e y f</sup>	6 – 39
<i>Ácidos Fenólicos</i>	
Acido p-cumárico <sup>b, e y f</sup>	1.22 – 170
Acido elágico <sup>a, b y c</sup>	27 – 49
Acido gálico <sup>f</sup>	5 – 44
Acido cafeico <sup>b y f</sup>	0.5 - 14

Adaptado de: <sup>a</sup>Blanda et al., 2009; <sup>b</sup>Hernanz et al., 2007; <sup>c</sup>Määttä-Riihinen et al., 2004; <sup>d</sup>Kähkönen et al., 2001; <sup>e</sup>Häkkinen et al., 1999; <sup>f</sup>Häkkinen et al., 1999

La determinación de compuestos antioxidantes en fresa ha sido ampliamente estudiada. por distintos autores. La tabla 2 muestra de forma grafica y resumida las técnicas de extracción y análisis más comúnmente empleados en los diferentes trabajos.

La recolección de la fresa se centra en los meses de primavera, por lo que la posibilidad de comerla fresca se reduce a un periodo de 3 meses. La congelación es un método de conservación que permite su consumo durante todo el año, sin embargo este procedimiento provoca un importante deterioro físico y organoléptico (Martinez-Navarrete et al., 2001). Una alternativa para su procesado es la elaboración de mermeladas, jaleas, zumos y bebida. En los últimos años se ha visto incrementado el desarrollo de alimentos en los que la sacarosa se sustituye por edulcorantes de bajo índice glicémico como la isomaltulosa. Este tipo de productos puede ser atractivo para un núcleo de población que requiera aporte energético sin inconvenientes inherentes a la sacarosa. El desarrollo de alimentos a base de fruta como la fresa (rica en compuestos bioactivos, en particular, con actividad antioxidante) en los que la sacarosa se pueda sustituir por la isomaltulosa, puede ser de gran interés para la industria alimentaria.

En este sentido, el presente trabajo tiene como principal objetivo evaluar en productos untables de fresa la influencia del tratamiento osmótico (llevado a cabo con isomaltulosa por vía seca o húmeda) y con posterior tratamiento térmico en la presencia de compuestos con actividad antioxidante

**TABLA 2.** Resumen bibliográfico de las metodologías más relevantes empleadas en la determinación del contenido de compuestos fenólicos: Ácidos fenólicos, antocianos y flavonoles en fresa

Referencia bibliográfica	Análisis	Método y fases móviles	Extracción de la muestra			
			Muestra	1 <sup>era</sup> Extracción	Cartucho / Resina	2 <sup>da</sup> Extracción
<i>Blanda G. et al. 2009</i>	Antocianos	1.- HPLC-DAD/MS análisis de fenoles	5 g puré	15 mL de metanol al 95%	Cartucho Strata C <sub>18</sub> -E 55µm 70 <sup>a</sup>  (Antocianos y otros compuestos fenólicos son absorbidos en el cartucho)	10 mL agua acidificada 3% v/v ácido fórmico (compuestos hidrosolubles son eluidos)  1.8 mL Metanol con 3% de ácido fórmico (recuperación de antocianos y compuestos fenólicos)
	Ácidos fenólicos	Fases móviles: <b>A:</b> Agua acidificada ( 2.5% v/v acido fórmico)		Evaporación		
	Flavonoles	<b>B:</b> Metanol con 3%v/v acido fórmico		Resuspensión en 5 mL agua acidificada 3% v/v ácido fórmico		
<i>Häkkinen S. et al. 1998</i>	Flavonoides	1.- HPLC Fases móviles: <b>A:</b> 50 mM ammonium dihydrogen phosphate pH 2.6	0.5 g fresa 80 mg Vit C	25 mL metanol 10 mL de HCl 6M	Sonicado 2 min  Mezclar a baño maría 35°C por 16 h y en oscuridad	1.5 mL metanol
<i>Häkkinen S. et al. 1999</i>	Acido fenólicos	<b>B:</b> 0.2 mM o-phosphoric acid pH 1.5 <b>C:</b> 20% solvente A en 80% acetonitrile				
<i>Hernanz D. et al. 2007</i>	Antocianos	1.- HPLC Fases móviles: <i>Ácidos fenólicos y Flavonols</i> <b>A:</b> agua-metanol-acido acético 93:5:2 v/v/v <b>B:</b> metanol-ácido acético 98:2 v/v	Flavonoles y ácidos fenólicos 0.5 g fresa 80 mg Vit C	Flavonoles y ácidos fenólicos Solución acuosa Metanol 50% v/v Ácido clorhídrico 1.2 M	Flavonoles y ácidos fenólicos Sonicado 2 min	Flavonoles y ácidos fenólicos 1.5 mL metanol
	Ácidos fenólicos			Antocianos Metanol con HCl 0.1%	Mezclar a baño maría 35°C por 16 h y en oscuridad	Antocianos Agua-acidificada metanol 1:1
	Flavonoles	Fases móviles: <i>Antocianos</i> <b>A:</b> acetoniitrilo-acido formico-agua 3:10:87 v/v/v <b>B:</b> acetoniitrilo-acido formico-agua 50:10:40 v/v/v		Antocianos Metanol con HCl 0.1%	Antocianos	Sonicado 4 min

Määttä et al. 2004	Flavonoides	1.- HPLC LC-DAD/MS	5 g fresa 0.1 mL morin (1 mg/mL metanol)	Método 1 Acetato de etilo	Método 1 Secado rotavapor	Método 1 1 mL metanol
	Acido fenólicos			Método 2 20 mL de muestra 20 mL acetato de sodio pH 7 10 mL agua (remueve acidos fenólicos ionizables) Método 3 antocianos Acidificación de fresa HCl 2M		Método 2 Secado rotavapor Método 3 antocianos Flavylium cations Metanol Secado rotavapor
<i>Baltrusaityte et al, 2006</i>	Flavonoides	Método 1.- HPLC	25-50g en 250 H <sub>2</sub> O pH=2	Resina: Amberlita XAD-2 (60g)	Dietil éter (lavar 3 veces con 5mL)	250mL H <sub>2</sub> O pH=2 300mL H <sub>2</sub> O (dest) 250mL metanol
	Capacidad antioxidante total	Fases móviles: <b>A:</b> Agua acidificada ( 5% v/v acido fórmico) <b>B:</b> Metanol  2.- Decoloración radical ABTS+				

## MATERIALES Y METODOS

### Preparación de las Muestras

Fresa (*vc. Camarosa*) fue comprada en el Mercado local de la comunidad valenciana. Se lavó a temperatura ambiente con una disolución de hipoclorito sódico 1.15g (Amukina<sup>®</sup>) y posteriormente se cortó en cubos de 1cm x 1cm. Estos cubos (denominados en este trabajo “materia prima”) fueron tratados tal y como seguidamente se describe:

-Fresa fresca (**FF**): La materia prima se secó al aire ambiente unos minutos, se trituró y posteriormente se congeló a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

-Fresa deshidratada osmóticamente 30<sup>º</sup>Brix vía húmeda (**H**). La materia prima secada al aire fue sumergida en un recipiente que contenía el jarabe (disolución de isomaltulosa de 40<sup>º</sup>Brix), durante 24 h a temperatura ambiente manteniendo agitación constante (75 rpm). Transcurrido el tiempo y alcanzado el equilibrio, se escurrió la fresa para su posterior formulación la cual fue: (70% p/p de fruta Deshidratada + 28.45% p/p de la disolución osmótica + 1.5% p/p pectina de manzana de alto metoxilo + 0.05% p/p sorbáto potásico). Inmediatamente después se congeló a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

-Fresa deshidratada osmóticamente 30<sup>º</sup>Bx vía seca sin eliminar fase líquida (**S10**). La materia prima secada al aire fue sumergida en un recipiente que contenía isomaltulosa en una relación de fruta-isomaltulosa variable en función del contenido de sólidos solubles de la materia prima para alcanzar una concentración final en la fase líquida de 30Brix. La mezcla de fruta-isomaltulosa fue agitada de forma discontinua para evitar la formación de una película alrededor de la fruta. Una vez alcanzado el equilibrio (30 Brix), se formuló el producto unttable de la siguiente forma: (98.45% p/p de fruta deshidratada + 1.5% p/p pectina de manzana de alto metoxilo + 0.05% p/p sorbáto potásico). Inmediatamente después se congeló a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

-Fresa deshidratada osmóticamente 30<sup>º</sup>Bx vía seca eliminando fase líquida (**S7**). El procedimiento seguido coincide con el S10, hasta alcanzar el equilibrio de 30 Brix. Se escurrió la fresa durante 5 min para su posterior formulación: (70% p/p de fruta deshidratada y escurrida + 28.45% p/p de la disolución osmótica + 1.5% p/p pectina de manzana de alto metoxilo + 0.05% p/p sorbáto potásico). Inmediatamente después se congeló a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Las muestras H, S10 y S7 una vez formuladas se dividieron en tres partes cada una: una parte no se trató térmicamente (0 min) y las otras dos restantes fueron sometidas a tratamientos térmicos de pasteurización calentando el producto a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  en baño maría durante 10 ó 30 min. De esta forma resultó un total de 9 tratamientos: H0, H10, H30, S100, S1010; S1030; S70; S710 y S730.

En estos 9 tratamientos se realizó la extracción y posterior análisis de los compuestos antioxidante.

## Extracción de compuestos antioxidantes

Se ensayaron dos métodos de extracción con la finalidad de seleccionar el que diera mejor resultado.

### METODO 1 (*adaptado de Blanda et al, 2009*)

Se tomó una muestra de 30 g y se trituró en licuadora. Posteriormente se colocaron 5 g del puré en un vaso de precipitado de 80 mL de capacidad al que se le añadieron 15 mL de metanol 95% (v/v). La mezcla se homogenizó con la ayuda de Ultra Turrax a 15,000 rpm por 3 min, finalizado el tiempo la mezcla se pasó a un tubo de centrifuga para posteriormente ser centrifugado a 14000 rpm por 30 min a 10°C. El extracto metanólico obtenido fue evaporado en rotavapor a 40°C a presión reducida hasta completa sequedad.

La muestra concentrada fue disuelta con 5 mL de agua acidificada (3% v/v ácido fórmico) que posteriormente fueron filtrados a través de un cartucho Strata C18-E 55  $\mu$ m, 70A (Phenomenex). Este cartucho previamente había sido activado con 5 mL metanol grado HPLC, seguido de 5 mL agua destilada y por último 5 mL de agua acidificada (3% v/v ácido fórmico). Las antocianidinas, flavonoles y otros compuestos fenólicos fueron adsorbidos en el cartucho. Una vez retenidos estos compuestos, se realizó la elución de los componentes hidrosolubles con 10 mL de agua acidificada (3% v/v ácido fórmico). Antocianidinas y otros compuestos fenólicos fueron recuperados con 1.8 mL de metanol que contenía (3% v/v ácido fórmico). El extracto metanólico obtenido fue filtrado a través de un filtro 0.45  $\mu$ m (Whatman, Clifton, NJ) e inyectado en el HPLC para su posterior análisis (figura 2).

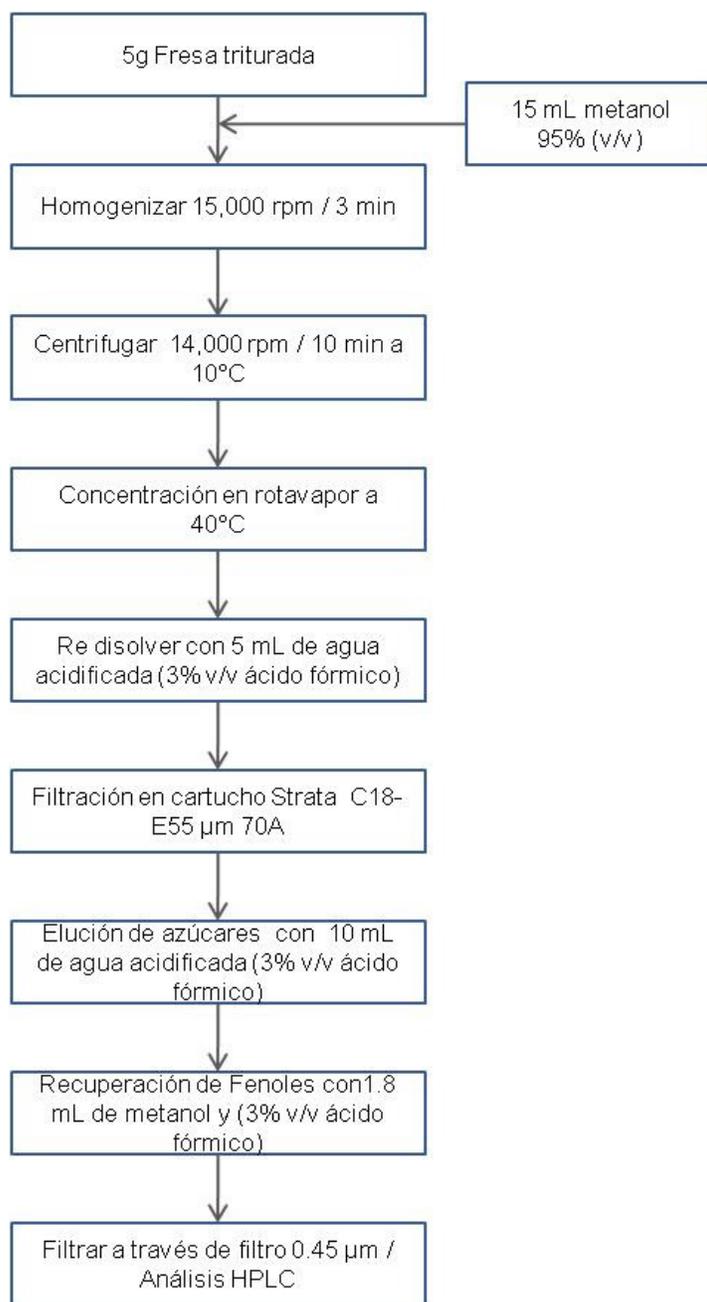
### METODO 2 (*adaptado de Baltrusaityte et al, 2006*)

Se pesaron 60 gramos de resina amberlita XAD-2 (tamaño de poro 9nm, tamaño de partícula 0,3-1,2 mm), que posteriormente se humedeció en un vaso de precipitado con metanol puro durante 10 minutos. Es importante mantener en movimiento la resina mientras se humecta, dado que este proceso mejora la capacidad de absorber las sustancias fenólicas. Posteriormente, se decantó hasta quedar la amberlita lo más seca posible, enseguida se añadió agua destilada dejándola en movimiento por 10 minutos.

La extracción de los compuestos fenólicos (*antocianos, flavanoles y ácidos fenólicos*) se realizó con una muestra de 5 g del puré de fresa, a la cual se le añadió agua destilada hasta alcanzar un aforo de 250 mL, posteriormente se ajustó a pH 2 con HCl concentrado.

La amberlita humectada se introdujo en una columna cromatográfica de cristal (25x2cm), por la que posteriormente se pasó la muestra ajustada a pH 2. Una vez que la muestra ha finalizado, se pasó 250 mL de agua acidificada (pH 2 con HCl concentrado), seguidamente 300 mL de agua destilada. En esta última se eluyen los compuestos hidrosolubles (azúcares y ácidos orgánicos). Por último,

con la finalidad de recuperar los compuestos fenólicos adsorbidos, por la resina se pasó 250 mL de metanol puro. Una vez obtenido el extracto metanólico se llevó a sequedad en rotavapor a 40 °C y presión reducida.



**FIGURA 2.** Método 1 (adaptado de Blanda et al, 2009)

Para conseguir una mayor purificación de los compuestos antioxidantes, el extracto concentrado fue redisoluto en 5 mL de agua destilada y posteriormente

se adicionó 5 mL de diethyl ether. Todo ello se mezcló durante 1 min, y posteriormente se separaron las fases mediante un embudo de decantación: a) la fase orgánica se recuperó, b) la otra fase acuosa se eliminó. Esto se realizó 2 veces más y los tres extractos se mezclaron y llevaron a sequedad en rotavapor a 40°C y presión reducida. La muestra para su posterior análisis fue resuspendida en 1 mL de metanol grado HPLC. Este extracto fue filtrando a través de un filtro 0.45 µm (Whatman, Clifton, NJ) y finalmente fue inyectado en el HPLC para su posterior análisis (figura 3).

## **Instrumentos**

El análisis de los compuestos antioxidantes fue desarrollado a través de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector diode array (HPLC-DAD). El equipo empleado fue un Water Alliance 2996, con una columna Sunfire C<sub>18</sub>, (5 µm, 4.6 x 150 mm) y con pre-columna Sunfire C<sub>18</sub>.

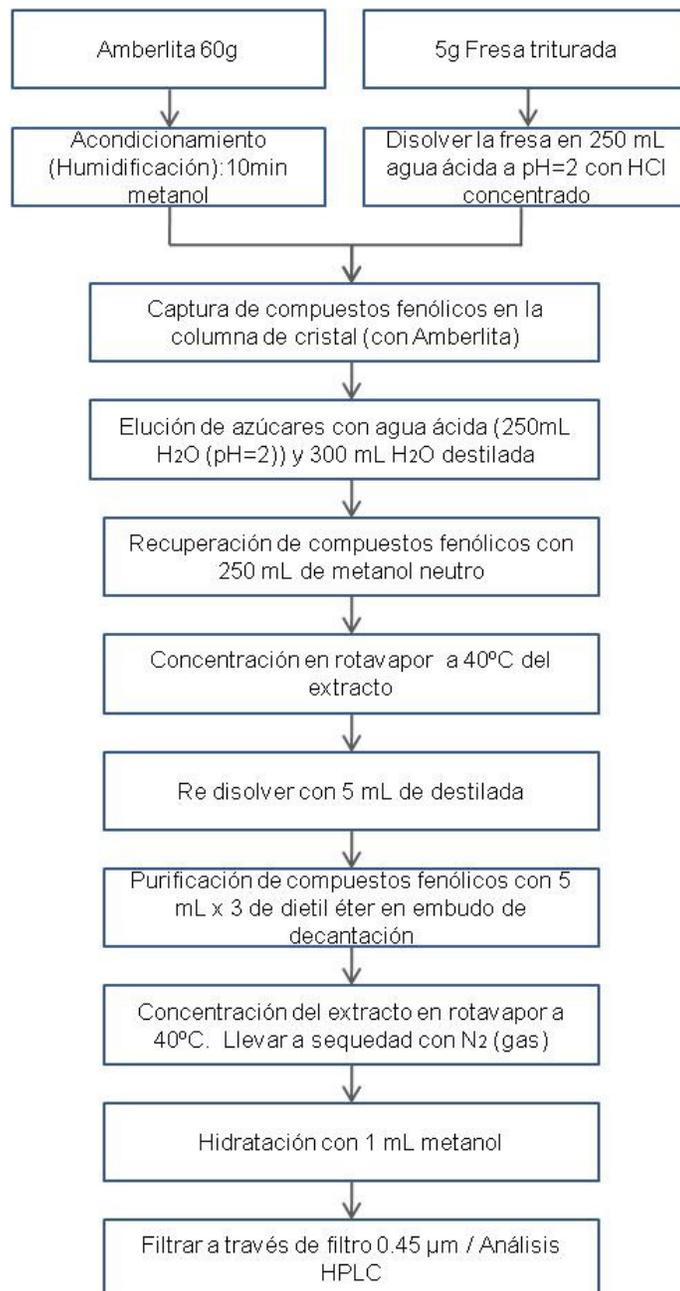
## **Patrones de referencia y Soluciones Stock**

Para llevar a cabo el ensayo se adquirió los siguientes patrones de referencia grado HPLC, los cuales fueron adquiridos a través de extrasynthese. Los estándares fueron: ácido p-cumárico, ácido elágico, ácido cafeico, ácido gálico, kaempferol y pelargonidina. Las soluciones stock se prepararon en metanol grado HPLC a las concentraciones de: 400 mg/L para ácido p-cumárico; 200 mg/L para ácido elágico; 200 mg/L para ácido cafeico; 400 mg/L para ácido gálico; 200 mg/L para kaempferol y 1000 mg/L para pelargonidina. Estas soluciones fueron empleadas en la construcción de las diferentes curvas patrón.

## **Análisis HPLC-DAD de fenoles**

El detector de longitud de onda del HPLC fue fijado a 190-800 nm. La identificación fue llevada a cabo operando bajo las condiciones: flujo de fase móvil, 1mL/min; temperatura de columna 35°C. Las fases móviles fueron: A, agua acidificada (5% v/v ácido fórmico); y B, metanol HPLC. El gradiente de elución fue lineal: a 0 min se tuvo 70% solvente A manteniéndolo por 20 min, del min 20 al 30 el 60% A fue alcanzado, del min 30 al 50 el 55% de A se mantuvo constante; del min 50 al 52 el 40% de A, del min 52 al 60 el 20% A se mantuvo, del min 60 al 70 se alcanzó el 10% A se alcanzó y finalmente al min 70 al 75 el 70% del solvente A fue restaurado. El equilibrio se alcanzó a los 10 min posteriores.

Para realizar la cuantificación de los compuestos estudiados, se construyeron curvas para cada compuesto (ácido p-cumárico, ácido elágico, ácido cafeico, ácido gálico, kaempferol y pelargonidina), utilizando concentraciones de: 5, 10, 20 y 50 mg/L. Los compuestos fueron detectados a: 300, 360 y 505 nm. Todos los análisis se hicieron por triplicado.



**FIGURA 3.** Método 2 (adaptado de Baltrusaityte et al, 2006)

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados por medio de un análisis de varianza multifactorial, con los factores: tratamiento y tiempo de pasterización, así como sus interacciones. Las variables respuesta fueron: las cantidades detectadas en el HPLC de los compuestos ácido p-cumárico, ácido elágico, ácido cafeico,

ácido gálico, kaempferol y pelargonidina. Para este análisis se empleó la herramienta Statgraphics plus Versión 5. Se ha realizado también un análisis de Componentes Principales (PCA) utilizando el programa Unscrambler version 9.6 (CAMO A/S, Oslo, Norway).

## **RESULTADOS**

El estudio se dividió en 2 etapas: la primera consistió en seleccionar el procedimiento más adecuado para la extracción de compuestos antioxidantes, de las muestras de fresa objeto de este estudio, en base a lo descrito en el apartado de Materiales y Métodos y la segunda en la evaluación de la influencia de los tratamientos osmóticos, llevados a cabo con isomaltulosa y posterior tratamiento térmico, en la presencia de dichos compuestos.

### **Selección del procedimiento para la extracción de compuestos antioxidantes en muestras de fresa**

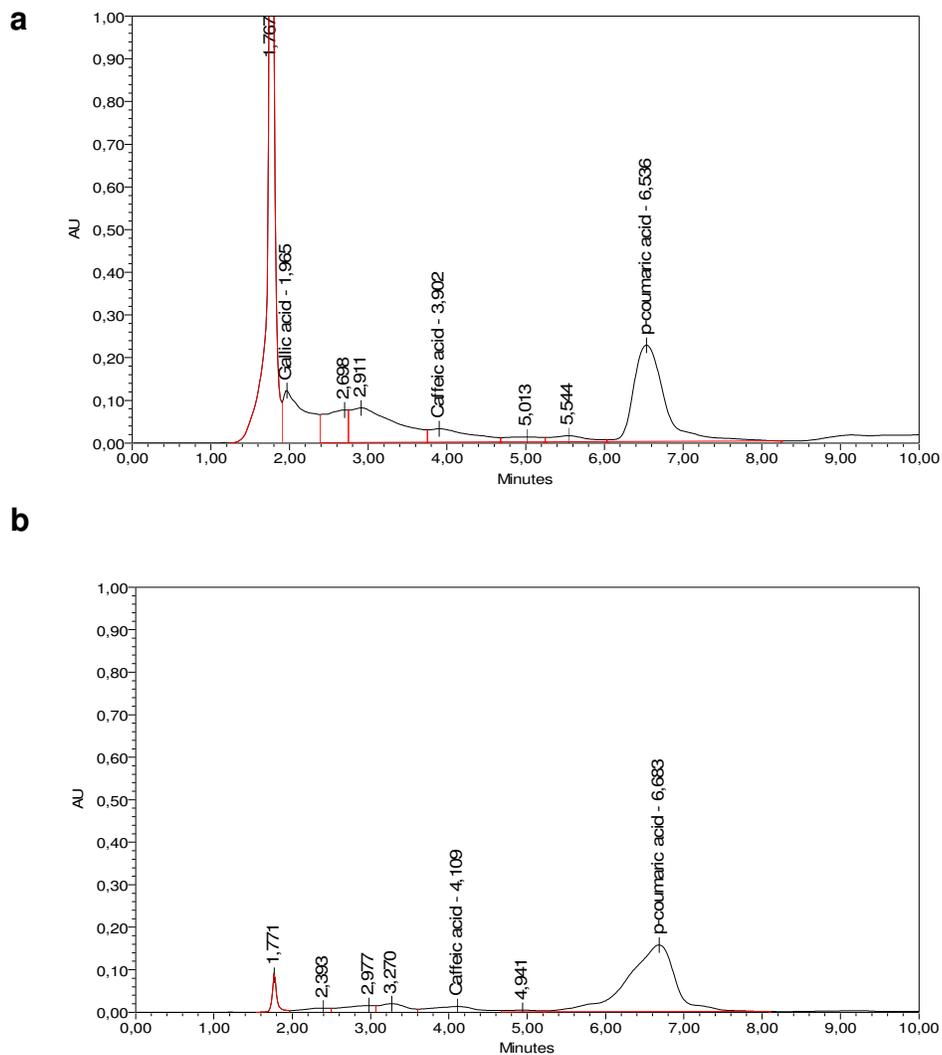
Se realizó un estudio comparativo de las técnicas de extracción de los compuestos antioxidantes, expuestas en el apartado de Materiales y Métodos, con la finalidad de seleccionar la más apropiada para el tipo de producto objeto de este estudio.

Se ha conseguido la identificación cromatográfica, tanto en las muestras frescas como procesadas, de los siguientes compuestos: ácido gálico ( $t_r=2,0$  min), ácido cafeico ( $t_r=4,0$  min), ácido p-cumárico ( $t_r=6,0$  min), pelargonidina ( $t_r=10,6$  min), ácido elágico ( $t_r=11,3$  min), y kaempferol ( $t_r=33,7$  min). La capacidad extractiva de ambos métodos (figura 4) es muy semejante para el ácido cafeico, la pelargonidina, el ácido elágico y el kaempferol, sin embargo, la extracción de los 6 compuestos solo ha sido posible por el método 1, ya que por el método 2 no se extrajo el ácido gálico. Además, es importante destacar que se obtiene una mejor recuperación del ácido p-cumárico utilizando el método 1.

A partir de estos resultados, se decidió trabajar aplicando el método extractivo 1

### **Estudio de la influencia de los tratamientos osmóticos con isomaltulosa-tratamiento térmico, en la presencia de compuestos antioxidantes.**

Los compuestos antioxidantes cuantificados en la fresa fresca y en la fresa deshidratada osmóticamente-tratada térmicamente se muestran en la tabla 3. Las concentraciones obtenidas para estos compuestos son del orden a las reportadas por otros autores en fresa, especialmente para: ácido p-cumárico, ácido elágico y ácido cafeico. Por el contrario los valores obtenidos para: pelargonidina, kaempferol y ácido gálico son algo inferiores a los encontrados en estos estudios (Blanda et al., 2009; Hernanz et al., 2007; Määttä-Riihinen et al., 2004; Kähkönen et al., 2001; Häkkinen et al., 1999; Häkkinen et al., 1999).



**FIGURA 4.** Cromatogramas HPLC de los compuestos antioxidantes, identificado en fresa fresca, extraídos aplicando: **a** método 1 y **b** método 2

Con la finalidad asegurar que los valores obtenidos fueran comparables, los resultados se han expresado en  $\mu\text{g}$  de compuesto por g de fresa fresca. Por otra parte, es importante destacar que fue necesario utilizar tres lotes diferentes de fresa fresca para la obtención de los tres tipos de muestras procesadas (H, S10, S7). En este sentido, considerando la variabilidad propia de la fruta fresca, se hizo un ANOVA para los compuestos identificados en los lotes de fresa fresca. Viendo que existían diferencias entre los lotes de fresa fresca para la mayoría de los compuestos antioxidantes estudiados, se decidió que el tratamiento de los datos se haría con las diferencias de los valores obtenidos de la resta de cada compuesto cuantificado en las muestras tratadas menos el obtenido en la correspondiente muestra fresca utilizada en dicho tratamiento.

Para evaluar la influencia del tratamiento osmótico y del tiempo de pasterización a que se someten la fresa fresca, se realizó un ANOVA multifactorial con los factores “tratamiento osmótico” y “tiempo de pasterización”, así como la interacción entre ambos. En la tabla 4 se muestran los valores de p-valor y del cociente-F para cada uno de los componentes así como el análisis de contraste múltiple de rangos (grupos homogéneos).

**TABLA 3.** Compuestos antioxidantes cuantificados en fresa fresca (FF) y en fresa deshidratada osmóticamente con isomaltulosa y tratada térmicamente. H= Deshidratación vía húmeda; S7= Deshidratación vía húmeda (70% de sólidos); S10= Deshidratación vía húmeda (100% de sólidos-disolución osmótica) ; tiempo de pasterización = 0, 10 ó 30 min.

Código	Compuestos antioxidantes ( $\mu$ g/g de fresa fresca)					
	Acido p-cumárico	Acido gálico	Ácido cafeico	Acido elágico	Pelargonidina	Kaempferol
FFH	6.883	12.306	0.840	2.202	0.488	0.075
FFS10	7.119	7.984	0.813	0.455	0.611	0.051
FFS7	5.849	8.177	0.509	1.205	0.617	0.046
H0	2.522	6.477	0.192	0.688	0.554	0.074
H10	1.490	6.674	0.168	0.658	0.703	0.047
H30	2.985	7.798	0.179	0.993	0.663	0.065
S10	6.917	6.098	0.814	0.773	0.644	0.080
S1010	11.511	10.109	0.237	1.559	0.812	0.086
S1030	9.287	12.475	0.687	2.399	0.729	0.115
S7	7.215	6.133	0.210	0.650	0.543	0.056
S710	7.862	7.206	0.381	2.372	0.452	0.078
S730	7.335	6.021	0.187	2.150	0.440	0.080

**TABLA 4.** Valores obtenidos del análisis ANOVA multifactorial con un nivel de confianza del 95%

Componente		Tratamiento osmótico	Tiempo past (min)
Acido p-cumárico	p-valor	* 0,0093	0,5474
	Cociente-F	18,71	0,7
	Grupos Homogéneos	S7 y S10	H , S10 y S7
Acido gálico	p-valor	* 0,0014	0,3418
	Cociente-F	50,79	1,42
	Grupos Homogéneos	S7 y S10	H , S10 y S7
Acido cafeico	p-valor	0,1109	0,719
	Cociente-F	4,01	0,36
	Grupos Homogéneos	H, S10 y S7	H , S10 y S7
Acido elágico	p-valor	* 0,0082	0,1121
	Cociente-F	20,12	3,97
	Grupos Homogéneos	S7 y S10	H , S10 y S7
Pelargonidina	p-valor	* 0,0181	0,5338
	Cociente-F	12,85	0,74
	Grupos Homogéneos	S10 y H	H , S10 y S7
Kaempferol	p-valor	* 0,0247	0,3975
	Cociente-F	10,73	1,17
	Grupos Homogéneos	S7 y S10	H , S10 y S7

\* Valores que presentan diferencia significativa  $p < 0.05$

El resultado del ANOVA muestra que existen diferencias significativas con relación al factor tratamiento para todos los compuestos con excepción del ácido cafeico. Los tratamientos S10 y S7 pertenecen al mismo grupo homogéneo para los compuestos: p-cumárico, ácido elágico, kaempferol y ácido gálico. Para los tres primeros compuestos se observa en general un incremento en la concentración con respecto a su fresa fresca (tabla 3). Con respecto al gálico, con excepción de los tratamientos S1010 y S1030, éste experimenta un descenso en la concentración, para todos los tratamientos, con respecto a su correspondiente fresa fresca.

Para el caso de la pelargonidina se observa que el tratamiento S7 se diferencia significativamente del H y S10, apreciándose en estos últimos tratamientos un incremento de este compuesto con respecto a la fresa fresca.

La interacción de los factores: tratamiento osmótico/tiempo de pasterización, no fue significativa.

Otros autores han observado que los tratamientos osmóticos llevados a cabo con sacarosa por vía húmeda (a 30<sup>o</sup>Brix) no provocan variaciones significativas (en relación a la fruta fresca) en los niveles detectados de compuestos semejantes a los identificados en este estudio (Blanda et al, 2009).

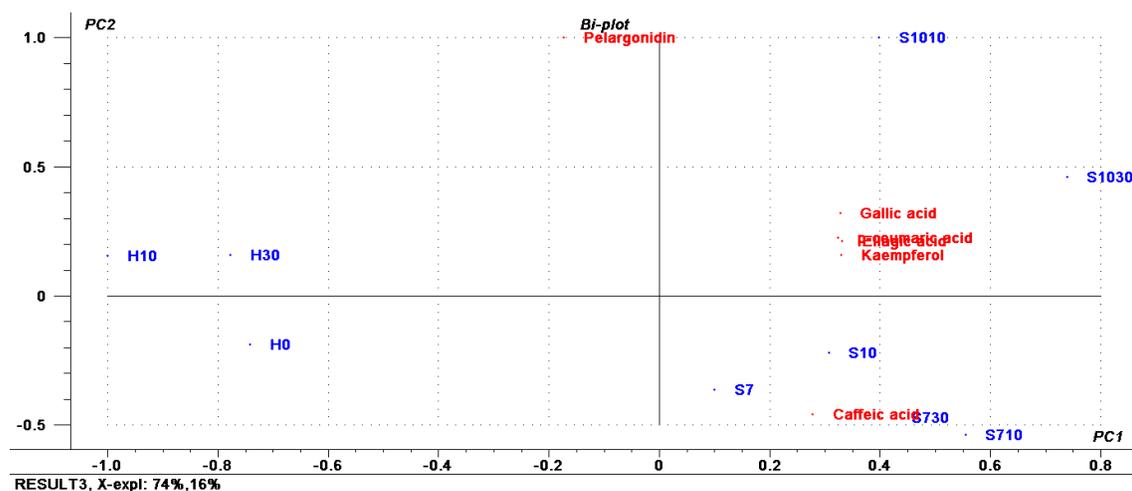
Con relación al factor “tiempo de pasterización” se observa que ninguno de los componentes se ve afectado por él. Además se observa que todos los tratamientos se comportan de forma semejante ya que no hay grupos homogéneos distintos.

Debido a la complejidad en la evaluación individual del comportamiento de los diferentes compuestos antioxidantes analizados en las diferentes condiciones de tratamiento osmótico/tiempo de pasterización, se ha estimado interesante analizar el efecto global considerando todos ellos. Para ello se ha realizado un análisis multivariable (PCA) con el propósito de describir el comportamiento de todos estos compuestos. En la figura 5 se observa el biplot correspondiente a los scores (condiciones de tratamiento osmótico/tiempo de pasterización) y loadings (compuestos antioxidantes analizados). Se observa que, dos de los componentes principales (PCs principal components) explican el 90% de la variabilidad de los datos. El PC1 explica el 74% de la variabilidad, mientras que el PC2 explica el 16%. En esta representación, la cercanía entre condiciones de tratamiento osmótico/tiempo de pasterización, indica un comportamiento similar entre ellos y la proximidad entre los compuestos indica un cierto grado de correlación (un comportamiento de variación similar).

En la figura 5 se observa que el PC1 Separa dos grupos de condiciones de tratamiento claramente diferenciadas; a la izquierda del semiplano se encuentran los tratamientos que corresponden a la deshidratación por vía húmeda. Por el contrario, todas las condiciones de tratamiento correspondientes a la deshidratación llevada a cabo por vía seca se ubican en semiplano derecho. El PC2 diferencia claramente los dos tipos de tratamiento llevados a cabo por vía seca. La distribución de los compuestos en el plano refleja que todos los compuestos excepto la pelargonidina presentan un comportamiento semejante, con valores más altos en los tratamientos por vía

seca y más bajos en los de vía húmeda. Es importante destacar que la contribución de la pelargonidina en la diferenciación de los tratamientos es menor que la del resto de compuestos, ya que está situada muy cerca del valor 0 del PC1.

El diferente comportamiento que presenta la pelargonidina, puede ser debido a que este compuesto puede reaccionar con ácidos fenólicos especialmente ácido cinámico y ácido ferulico, tal y como han observado otros autores en muestras de zumos de frutas rojas tratadas térmicamente (Rein y Heinonen, 2004).



**FIGURA 5.** Gráfico PCA Bi-Plot de las diferentes condiciones de tratamiento osmótico/tiempo de pasterización y compuestos antioxidantes evaluados

## CONCLUSIONES

En productos untables de fresa obtenidos mediante tratamiento osmótico (llevado a cabo con isomaltulosa por vía seca o húmeda) y con posterior tratamiento térmico, se han identificado y cuantificado 6 compuestos antioxidantes: 4 ácidos fenólicos (*ácido p-cumárico*, *ácido elágico*, *ácido cafeico* y *ácido gálico*), 1 flavanol (*kaempferol*) y 1 antocianidina (*pelargonidina*).

El procedimiento seleccionado para la extracción de los compuestos antioxidantes, ha sido aquel en el que se emplean cartuchos C18 en lugar de amberlita ya que con ellos se ha obtenido la extracción de los 6 compuestos analizados en este estudio, además de una mejor recuperación de los mismos.

Existen diferencias significativas con relación al factor tratamiento para todos los compuestos estudiados con excepción del ácido cafeico. Con relación al factor “tiempo de pasterización” se observa que ninguno de los componentes se ve afectado por él.

Un análisis multivariante (PCA) ha reflejado una gran diferenciación entre los tratamientos llevados a cabo por vía húmeda y los dos de vía seca, si bien entre estos últimos se aprecia también una cierta separación. La distribución de los compuestos en el plano refleja que todos ellos excepto la pelargonidina presentan un comportamiento semejante, con valores más altos en los tratamientos por vía seca que en los de vía húmeda.

En conclusión se puede afirmar que el tipo de deshidratación osmótica aplicado en la obtención de productos untados de fresas: (vía húmeda o seca) influye decisivamente en el nivel detectado de compuestos con actividad antioxidante.

## REFERENCIAS

- Abushita, A. A.; Hebshi, E. A.; Daood, H. G.; Biacs, P. A. 1997. Determination of Antioxidant Vitamins in Tomatoes. *Food Chem.* **60**:207-212.
- Ames, B. M.; Shigena, M. K.; Hagen, T. M. 1993. Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Diseases of Aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:7915-7922.
- Baltrusaityte, V.; Rimantas-Venskutonis, P.; Ceksteryte, V. 2006. Radical Scavenging Activity of Different Floral Origin Honey and Beebread Phenolic Extracts. *Food Chemistry.* **101**:502–514.
- Bailey, L. B.; Gregory, J. F. 1999. Folate Metabolism and Requirements. *J. Nutr.* **129**:779–782.
- Blanda, G.; Carretani, L.; Cardinali, A.; Barbieri, S.; Bendini, A.; Lercker, G. 2009. Osmotic Dehydrofreezing of Strawberries: Polyphenolic Content, Volatile Profile and Consumer Acceptance. *Food Science and Technology.* **42**:30-36.
- Carr, A. C.; Frei, B. 1999. Toward a New Recommended Dietary Allowance for Vitamin C Based on Antioxidant and Health Effects in Humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**:1086–1107.
- De Ruvo, C.; Amodio, R.; Algeri, S.; Martelli, N.; Intilangelo, A.; D'Ancona, G. M.; Esposito, E. 2000. Nutritional Antioxidants as Antidegenerative Agents. *Int. J. Dev. Neurosci.* **18**:359–366.
- Deighton, N.; Brennan, R.; Finn, C.; Davies, H. V. 2000. Antioxidant Properties of Domesticated and Wild *Rubus* species. *J. Sci. Food Agric.* **80**:1307–1313.
- Dragsted, L. O.; Strube, M.; Larsen, J. C. 1993. Cancer-protective Factors in Fruits and Vegetables: Biochemical and Biological Background. *Pharmacol. Toxicol.* **72** (1):116-135.
- Häkkinen, S. H.; Kärenlampi, S. O.; Heinonen, I. M.; Mykkänen, H. M.; Törrönen, A. R. 1998. HPLC Method for Screening of Flavonoids and Phenolic Acid in Berries. *J. Sci. Food Agric.* **77**:543-551.
- Häkkinen, S. H.; Heinonen, I. M.; Kärenlampi, S. O.; Mykkänen, H. M.; Ruuskanen, J.; Törrönen, A. R. 1999. Screening of Selected Flavonoids and Phenolic Acids in 19 Berries. *Food Research International.* **32**:345-353.
- Häkkinen, S. H.; Kärenlampi, S. O.; Heinonen, M.; Mykkänen, H. M.; Törrönen, A. R. 1999. Content of Flavonols Quercetin Myricetin and Kaempferol in 25 Edible Berries. *J. Agric. Food Chem.* **47**:2274–2279.
- Halliwell, B. 1994. Free Radical, Antioxidants and Human Disease: Curiosity, Cause or Consequence. *Lancet.* **344**:721-724.
- Hernanz, D.; Recamales, A. F.; Melendez-Martinez, A. J.; Gonzalez-Miret, M. L.; Heredia, F. J. 2007. Assessment of the Differences in the Phenolic Composition of Five Strawberry Cultivars (*fragaria x ananassa* Duch.) Grown in Two Different Soilless Systems. *J. Agric. Food Chem.* **55**:1846-1852.

- Hollman, P. C. H.; Devries, J. H. M.; Vanleeuwen, S. D.; Mengelers, M. J. B.; Katan, M. B. 1995. Absorption of Dietary Quercetin Glycosides and Quercetin in Healthy Ileostomy Volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**:1276–1282.
- Kähkönen, M. P.; Heinämäki, J.; Ollilainen, V.; Heinonen, M. 2003. Berry Anthocyanins: Isolation, Identification and Antioxidant Activities. *J. Sci. Food Agric.* **83**:1403–1411.
- Kähkönen, M. P.; Hopia, A. I.; Heinonen, M. 2001. Berry Phenolics and their Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **49(8)**:4076–4082.
- Koponen, J. M.; Happonen, A. M.; Mattila, P. H.; Törrönen, A. R. 2007. Contents of Anthocyanins and Ellagitannins in Selected Foods Consumed in Finland. *J. Agric. Food Chem.* **65**:1612–1619.
- Lopes-da-Silva, F.; de Pascual-Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santuos-Buelga, C. 2002. Identification of Anthocyanin Pigments in Strawberry (cv. Camarosa) by LC Using DAD and ESI-MS Detection. *Eur. Food Res. Technol.* **214**:248–253.
- Lopes-da-Silva, F.; Escribano-Bailón, M. T.; Pérez Alonso, J. J.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. 2007. Anthocyanin Pigments in Strawberry. *LWT.* **40**:374–382.
- Määttä, K. R.; Kamal-Eldin, A.; Mattila, P. H.; González-Paramás, A. M.; Törrönen, A. R. 2004. Distribution and Contents of Phenolic Compounds in Eighteen Scandinavian Berry Species. *J. Agric. Food Chem.* **52**:4477–4486.
- Määttä, K. R.; Kamal-Eldin, A.; Törrönen, A. R. 2004. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (family Rosaceae). *J. Agric. Food Chem.* **52**:6178–6187.
- Martínez-Navarrete, N., Moraga, G., Martínez-Monzó, J., Botella, F., Tirado, N., Chiralt, A. 2001. Mechanical and Color Changes Associated to Dehydrofreezing of Strawberry. In J. Welti-Chanes, G.V. Barbosa-Canvas, J.M. Aguilera (Eds.), Proceedings of the Eighth International Congress on Engineering and Food: ICEF-8. pag 793-797. Lancaster, PA, USA: Technomic Publishing Company, Inc.
- Mattila, P.; Hellstrom, J.; Törrönen, R. 2006. Phenolic Acids in Berries, Fruits, and Beverages. *J. Agric. Food Chem.* **54**:7193–7199.
- Rein, M.; Heinonen, M. 2004. Stability and Enhancement of Berry Juice Color. *J. Agric. Food Chem.* **52(10)**:3106-3114
- Scalzo, J.; Politi, A.; Pellegrini, N.; Mezzetti, B.; Battino, M. 2005. Plant Genotype Affects Total Antioxidant Capacity and Phenolic Contents in Fruit. *Nutrition.* **21**:207–13.
- Tulipani, S.; Mezzetti, B.; Capocasa, F.; Bompadre, S.; Beekwilder, J.; Ric de Vos, C. H.; Capanoglu, E.; Bovy, A.; Battino, M. 2008. Antioxidants, Phenolic Compounds, and Nutritional Quality of Different Strawberry Genotypes. *J. Agric. Food Chem.* **56(3)**:696-704.
- Willett, C. W. 1994. Micronutrients and Cancer Risk. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**:162S-165S.
- Yi-Fang, C.; Jie, S.; Xianzhong, W.; Rui, H. L. 2002. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **50**:6910–6916.