

Cuantificación de fisetina y resveratrol en diferentes grados de madurez de fresa (*Fragaria ananassa*), arándano (*Vaccinium cyanococcu*) y uva (*Vitis vinífera*) en madurez comercial

Martín del Campo-Pérez V.M.^a, Sosa-Morales M.E.^b, Ozuna-López C.^b, Díaz-Cervantes E.^c, Abraham Juárez M.R.^{b*}

^aDivisión de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón, Blvd. del Valle 2301, Guardarrayas, 36425 San Francisco del Rincón, Guanajuato, México.

^bDepartamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, Ex-Hacienda El Copal, Carretera Irapuato-Silao km 9, 36500, Irapuato, Gto., México

^cDepartamento de Alimentos, Centro Interdisciplinario del Noreste (CINUG), Universidad de Guanajuato, km 28 Carretera San José Iturbide-Tierra Blanca, 37975, Tierra Blanca, Guanajuato, México.

*mabraham@ugto.mx

RESUMEN:

El consumo de frutos principalmente los conocidos como “rojos” se considera una alternativa para la prevención de diversas enfermedades, otorgando este beneficio sustancias nutraceuticas como polifenoles, fisetina y resveratrol. En este trabajo se determinaron éstos tres nutraceuticos usando frutos frescos de fresa (*Fragaria ananassa*), arándano (*Vaccinium oxycoccus*) y uva (*Vitis vinífera*). Estos fueron producidos localmente y cultivados bajo diferentes tecnologías ya que, puede variar la concentración de éstos nutraceuticos. Se realizó la extracción de polifenoles y se cuantificaron por la técnica de Folin-Ciocalteu, mediante una curva de calibración con ácido gálico y con comportamiento lineal, se midieron las absorbancias de los extractos por espectroscopia UV/VIS a 765 nm, y los resultados de las medias se analizaron mediante una comprobación de comportamiento por la prueba de Shapiro-Wilk y por la prueba T-Student. En 30 muestras se determinó la presencia de fisetina en fresa (FAR, FAM, FCR Y FCM). En el caso de la determinación de resveratrol solo fue detectado en uva red globe, blueberrie y fresa agroecológica rosa. La fresa agroecológica rosa fue la que mayor concentración de polifenoles mostró.

Palabras clave: fresa, arándano, uva roja, polifenoles totales, fisetina, resveratrol.

ABSTRACT:

The consumption of fruits mainly known as "red" is considered an alternative for the prevention of various diseases, granting this benefit nutraceutical substances such as polyphenols, fisetin and resveratrol. In this work, these three nutraceuticals were determined using fresh fruits of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch), blueberry (*Vaccinium oxycoccus*) and grape (*Vitis vinífera*). These were produced locally and grown under different technologies since the concentration of these nutraceuticals can vary. The polyphenols were extracted and quantified by the Folin-Ciocalteu technique, using a calibration curve with gallic acid and with linear behavior, the absorbances of the extracts were measured by UV / VIS spectroscopy at 765 nm, and the results of the means were analyzed by means of a behavioral check by the Shapiro-Wilk test and by the T-Student test. The presence of fisetin in strawberry (FAR, FAM, FCR and FCM) was determined in 30 samples. In the case of the determination of resveratrol, it was only detected in red globe grapes, blueberrie and pink agroecological strawberry. The pink agroecological strawberry was the one with the highest concentration of polyphenols.

Key words: strawberry, blueberry, red grape, total polyphenols, fisetin, resveratrol.

Área: Alimentos funcionales

INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria x ananassa Duch.*) es uno de los cultivos más importantes en el mundo, debido a su amplia distribución de siembra. El cultivo de fresa es redituable después del sexto mes de producción, y la demanda en producción y consumo aumenta anualmente en el mundo y en México. Se considera que es un fruto agregado y con importancia nutricional de relevancia por el aporte de Vitamina C de (40 – 120 mg/100 g), compuestos fenólicos, flavonoides, fósforo, calcio y hierro (Kumar et al., 2018).

El Arándano (*Vaccinium oxycoccus*) y la Uva (*Vitis vinifera*) son frutos con diversos compuestos bioactivos tales como metabolitos secundarios en los que se incluyen antioxidantes, antiinflamatorios y moléculas con propiedades antimicrobianas (Vattem et. al., 2005). Existen diversos antioxidantes presentes en el arándano como los flavonoides, antocianinas, ácidos fenólicos y vitamina C (Borowska et. al., 2009). Los metabolitos secundarios más importantes de la uva se localizan en las partes sólidas: cáscara, semilla y tejido vascular. En la pulpa, destaca la presencia de ácidos fenólicos y sus derivados. Los flavonoles y antocianos se encuentran localizados en las células de la cáscara de la uva, las procianidinas y flavanoles se localizan en las semillas de las uvas.

La Fisetina es un flavonoide con actividad antioxidante importante ya que juega un papel clave en la protección contra diferentes tipos de estrés en las células. Se ha identificado su papel como un compuesto anticancerígeno y antiproliferativo (Haddad, 2006).

Dentro de los polifenoles, el resveratrol es un compuesto que la planta produce cuando se encuentra amenazada por algunos tipos de estrés (biótico o abiótico) quienes a través de los elicitores (agentes de inducción de resistencia) tales como la radiación UV, ozono, acibenzolar-S-metil y fosfitos. La síntesis de resveratrol puede ser inducida dentro de las plantas y debido a sus calidad de metabolito secundario, como reporta Sauter y colaboradores, fue posible aumentar la vida de anaquel de manzanas, así mismo, se reporta actividad como anticancerígeno, antimutagénico, antineurodegenerativo y antiinflamatorio, tales como compuestos potenciales beneficios la salud (Cervantes, 2009).

La tendencia actual en alimentos, está enfocada en producirlos con la menor proporción de procesamiento pero con alto valor nutracéutico, lo que puede ser alcanzado por la presencia de polifenoles, por sus diversos efectos benéficos a la salud.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se utilizó fresa, arándano y uva, la fresa fue adquirida de un cultivo agroecológico variedad “Camino Real” del Huerto “Abraham’s Calidad” ubicado en el Ejido La Calera del municipio de Irapuato, Gto. y los frutos de fresa convencional, arándano y uvas se adquirieron de manera comercial en un supermercado en Irapuato, Gto.

Tratamiento de las muestras de frutos (fresa, blueberrie, uva roja)

Se realizaron muestras compuestas de cada fruto (fresa, blueberrie y uva) en cada tratamiento de los diferentes estados de madurez y por antioxidante (fisetina y resveratrol). Las muestras de cada grupo de frutos se nombran de acuerdo a la siguiente nomenclatura: Antioxidante, Fruto, Origen y Estado de Madurez.

Extracción de polifenoles totales en fresa agroecológica, fresa convencional, arándano y uva roja.

Se tomaron 3 frutos de cada grupo, y se maceraron con mortero y pistilo hasta obtener una muestra compuesta homogénea para cada grupo. La muestra compuesta se dividió en 3 porciones de 1 g cada una. Por cada muestra, se tomará 1 g y se colocaron en tubos falcón con aluminio alrededor con el fin de evitar la fotoxidación. Se agregarán 10 mL de la solución “Solvente de Extracción” con una proporción 40:60

de metanol:agua/acetona. Se incubarán en refrigeración (4°C) durante una noche, posteriormente se centrifugó a 3500 rpm en el equipo Solbat C-40, por 10 minutos. Finalmente, concentró el sobrenadante a baño maría, para reducirlo a 1 mL de volumen final.

Hidrólisis de polifenoles totales en fresa agroecológica, fresa convencional, arándano y uva roja.

En el tubo Falcón con sobrenadante concentrado, se agregó 2 mL de una solución 2N de HCl, se ebullició por 1 h. Posteriormente, las muestras se almacenaron en hielo por 15 minutos y se centrifugarán 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se colocará en otro tubo. Al sobrenadante recolectado se agregará 1 mL de Acetato de Etilo, se centrifugó 10 minutos en refrigeración, y se colocó el sobrenadante en un “Tubo de Recuperación de Lavados”. Al precipitado se agregó 1 mL de Acetato de Etilo, se realizaron 2 lavados más, donde el sobrenadante se colocará en el “Tubo de Recuperación”. Todos los sobrenadantes recuperados en el “Tubo de Recuperación”, se redujeron de volumen a baño maría, hasta obtener 0.5 mL de un “Extracto Final”, el cual se diluirá en 2 mL de Metanol grado HPLC. Se analizaron Compuestos Fenólicos Totales, así como la concentración de Fisetina y Resveratrol en cada una de las muestras.

Cuantificación de polifenoles totales en fresa agroecológica, fresa convencional, arándano y uva roja por método Folin-Ciocalteu

Se realizó una curva de calibración con Ácido Gálico para la cuantificación de polifenoles totales con diluciones de 0, 5, 10, 15 y 20 µg/mL y se obtuvo la absorbancia en un espectrofotómetro a 765 nm, con el equipo Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis. Para la determinación se tomaron 200 µL de cada extracto en tubos eppendorf de 2 mL y se agregó 1000 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, se mezcló por 5 min y se adicionó 800 µL de Na₂CO₃ al 7.5% (p/v), posteriormente se mezcló 10 segundos y se incubó por 90 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Para las lecturas espectrofotométricas, se preparó un “Blanco”, en el que en vez de “Extracto Final” se colocarán 200 µL de Metanol, junto con el resto del reactivo de Folin-Ciocalteu y 1N y Na₂CO₃ al 7.5%. Se realizaron las lecturas de absorbancias a 765 nm, y con una interpolación en la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración con Ácido Gálico, se obtuvo la concentración de Polifenoles Totales, resultados que se expresarán en µg de ácido gálico/100 g peso fresco.

Cuantificación de fisetina y resveratrol por HPLC en fresa agroecológica, fresa convencional, arándano maduro y uva roja madura.

Se preparó una solución del estándar de Fisetina 1 mg/mL disuelto en metanol puro y de Resveratrol 1 mg/mL en metanol puro. Se utilizó un Cromatógrafo Agilent Technologies 1200, acoplado a un detector DAD Agilent Technologies. A partir de los extractos metanólicos obtenidos se determinó la presencia y concentración de Fisetina y Resveratrol, para lo cual se utilizará una columna cromatográfica YMC-Pack ODS C18 (Phenomenex) de fase reversa de 5 µm de diámetro de partícula, 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno. Como fase móvil se utilizaron 2 solventes: A (Ácido acético grado HPLC pH 3.0) y B (Acetonitrilo grado HPLC). Los solventes y muestras fueron filtradas por membrana de 0.45 µm (Millipore, Durapore). Se utilizó una velocidad de flujo de 1mL min⁻¹, un detector de absorción en el UV a una longitud de onda de 360 nm para fisetina y 320 nm para Resveratrol a 30°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de fenoles totales en muestras de frutos

Las concentraciones de polifenoles totales determinadas en Fresa Rosa, Madura Agroecológica y Convencional por el método de Folin-Ciocalteu, mostraron una concentración media de aproximadamente 41.10 mg /100 g de fruto fresco. De acuerdo a Chordi en 2013, y al estudio realizado para determinar la concentración de fenoles totales, obtuvo concentraciones por encima de 120 mg de ácido gálico / 100 g de peso seco. Cabe resaltar que ésta diferencia puede ser determinada por el método de extracción fenoles, debido que el proceso de liofilización por el que Chordi declara en su investigación, tiene la propiedad de concentrar y mantener la integridad de los analitos. El estudio para determinación de fenoles totales en fresa agroecológica en los dos estadios de madurez (rosa y maduro), mostró la cuantificación de aproximadamente 51.11 mg de polifenoles totales / 100 g de peso fresco de FAR y de 35.25 mg /100g de

peso fresco de FAM, correspondiente a un 38% de diferencia de FAR sobre FAM. En la prueba T-Student, en análisis de las varianzas arrojó que ésta diferencia si es significativa, por lo que el estado FAR si influye en el resultado. Autores como Ayub y colaboradores en 2018, reportan sobre la cantidad de polifenoles totales determinados en frutos de fresa del estadio de madurez rosa alrededor de 120 mg/100 g de fruto fresco, a comparación de estadio rojo maduro con aproximadamente 65 mg/100 g de lo que implica una diferencia del 45% del estadio rosa sobre el maduro (Ayub y col. 2018). Así mismo, una investigación por Pineli y colaboradores en 2011, realizaron un estudio en la determinación de polifenoles totales en fresa de la variedad camino real, de la que obtuvieron aproximadamente una concentración de 185 mg/100 g peso fresco en el estadio rosa, y en el maduro una concentración de 174 mg/100 g de peso fresco, es decir, aproximadamente una diferencia de menos del 6% superior en concentración el estadio rosa. Zhang y colaboradores en 2011, a través de un estudio metabólico en el que determinaron la presencia de azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos relacionados con el proceso de transición del estado rosa al estado rojo maduro, los cuales están relacionados con el sabor y característica organolépticas. Así mismo, durante éste periodo, la ruta metabólica del Shikimato es afectado, debido a una reducción de la síntesis de aminoácidos como la Alanina, Fenilalanina y la Tirosina, implicados en la síntesis de polifenoles, lo que podría explicar la reducción de polifenoles en el estadio maduro (Zhang y col. 2011).

Tabla 1. Concentración de resultados: polifenoles totales en análisis de comparativos de diferentes tipo de cultivo (agroecológico, convencional) y estado de madurez (rosa y maduro).

Tipo de cultivo		Resultado de Significancia (T-Student)	% Diferencial (mayor sobre menor)
Polifenoles totales (mg/100 g de fruto)			
Fresa Agro Rosa 51.11	Fresa Agro Mad 35.27	P(T=t) 0.04978. El resultado es significativo en p < .05	30.1 %
Fresa Conv Rosa 39.44	Fresa Conv Mad 39.17	P(T=t) 0.81034. El resultado no es significativo en p < .05	0.68 %
Fresa Agro Rosa 51.11	Fresa Conv Rosa 39.44	P(T=t) 0.23014E El resultado no es significativo en p < .05	23.3 %
Fresa Agro Madura 35.27	Fresa Conv Madura 39.17	P(T=t) 0.53774. El resultado no es significativo en p < .05	9.9 %
Uva Mad Conv 31.27	Fresa Agro Madura 35.27	P(T=t) 0.328547. El resultado no es significativo en p < .05	11.3 %
Uva Mad Conv 31.27	Fresa Conv Madura 39.17	P(T=t) 0.165639. El resultado no es significativo en p < .05	20.1%
Blue Berry Mad Conv 43.43	Fresa Agro Madura 35.27	P(T=t) 0.058639. El resultado no es significativo en p < .05	18.7 %
Blue Berry Mad Conv 43.43	Fresa Conv Madura 39.17	P(T=t) 0.434298. El resultado no es significativo en p < .05	9.8 %
Blue Berry Mad Conv 43.43	Uva Mad Conv 31.27	P(T=t) 0.000319. El resultado es significativo en p < .05	28 %
Blue Berry Mad Conv 43.43	Fresa Agro Rosa 51.11	P(T=t) 0.254992. El resultado no es significativo en p < .05	15 %
Fresa Agro Rosa 51.11	Uva Mad Conv 31.27	P(T=t) 0.011253. El resultado es significativo en p < .05	38.8 %

Contraste de grupos para significancia de la concentración polifenoles totales en frutos:

Contraste uva vs fresa madura (agroecológica y comercial)

Se analizaron los 6 resultados (3 promedios) de Uva Red Globe en comparación con los promedios de las muestras de Fresa Agroecológica Madura (FAM) y posteriormente con los 6 respectivos de Fresa Convencional Madura (FCR). Las comparaciones de las dos medias a pesar de ser diferentes, según la prueba T-Student, no mostraron diferencias significativas entre ellas.



Figura 1. Concentración Total de Polifenoles en Uva Red Globe, FAM y FCM

Contraste de blueberrrie vs fresa madura (agroecológica y comercial)

Se analizaron los 6 resultados (3 promedios) de blueberrrie en comparación con los promedios de las muestras de Fresa Agroecológica Madura (FAM) y posteriormente con los 6 respectivos de Fresa Convencional Madura (FCR). Las comparaciones de las dos medias son diferentes entre ellos, sin embargo la prueba T-Student indicó que no existen diferencias significativas entre ellas.

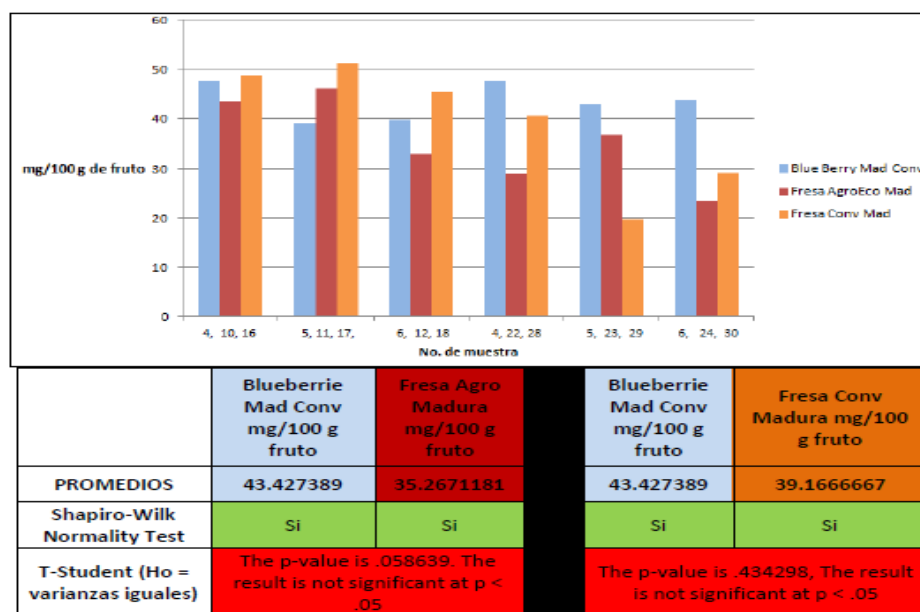


Figura 2. Concentración Total de Polifenoles en Blueberrrie, FAM y FCM

CONCLUSIÓN

Las características nutraceuticas de la fresa variedad Camino Real, tanto del tipo de cultivo agroecológico y convencional, quedó demostrada con la determinación de compuestos fenólicos en fruto fresco. Se realizó la extracción de polifenoles y se cuantificaron por la técnica de Folin-Ciocalteu, mediante una curva de calibración con ácido gálico y con comportamiento lineal, se midieron las absorbancias de los extractos de los diversos tipos de frutos por espectroscopia UV/VIS a 765 nm, y los resultados de las

medias se analizaron mediante una comprobación de comportamiento por la prueba de Shapiro-Wilk y posteriormente para determinación de la significancia de las diferencias por la prueba T-Student. En este estudio se determinó que la fresa agroecológica rosa, contienen un 30% más de polifenoles totales a comparación de las fresa agroecológica en madurez comercial. No se demostró diferencias significativas en las fresas convencionales rosas y maduras. Se tomó como medida de contraste, la concentración de polifenoles en blueberrie de madurez comercial, y la diferencia de las medias se encontró a favor de la fresa rosa agroecológica, sin embargo, dicha no fue significativa (51.11 mg / 100 g de fruto de FAR y 43.43 mg / 100 g fruto blueberrie). De todas las determinaciones de polifenoles realizadas en frutos (FAR, FAM, FCR, FCM, Uva y blueberrie), la fresa agroecológica rosa fue la que mayor concentración de los mismos mostró. La uva red globe de madurez comercial obtuvo la concentración más baja con 31.27 mg /100 g de fruto. Dicha diferencia correspondió a 39% a favor de la FAR. Se realizó el análisis para determinación de fisetina y resveratrol en las 30 muestras de frutos, y se determinó la presencia de fisetina en todos los tipos de fresa (FAR, FAM, FCR Y FCM). En el caso de la determinación de resveratrol solo fue detectado en uva red globe, blueberrie y fresa agroecológica rosa. Tanto blueberrie como uva red globe, mostraron presencia simultánea de los dos antioxidantes.

Por tanto, los resultados en ésta investigación dan soporte al potencial nutracéutico de la variedad de fresa Camino Real, tanto agroecológica y convencional. De cualquier manera es necesario realizar optimización al proceso de extracción de fenoles totales, evitando así la utilización de temperaturas altas para la evaporación de los solventes en los lavados y la hidrólisis ácida, por lo que se recomienda realizar extracciones líquido-líquido en rotavapores. Dicho favorecerá mantener la integridad de los polifenoles extraídos. Así mismo, para la determinación de éstos compuestos fenólicos, se recomienda realizar la técnica de Fast-Blue BB, para evitar la contaminación o bloqueos por otros metabolitos secundarios.

La fresa es uno de los principales cultivos en el Estado de Guanajuato, tanto a nivel nacional como internacional, por lo que éste tipo de investigaciones favorecen al pleno conocimiento de sus propiedades benéficas a la salud, los productores deben tener el compromiso de adoptar técnicas de agricultura protegida y estrategias agroecológicas para asegurar no solo la calidad visual del fruto, si no la integridad de la calidad con un aporte adecuado nutrimentos para la salud del consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

- Ayub, R., Reis, L., Zamboto, P., Bosseto, L. (2018). Ethylene and brassinosteroid effect on strawverry ripening after field spray. Rev. Bras. Frutic. vol.40 no.3 Jaboticabal 2018 Epub July 10, 2018.
- Borowska, E. J., Mazur, B., Kopciuch, R. G., & Buszewski, B. (2009). Polyphenol, Anthocyanin and Resveratrol Mass Fractions and Antioxidant Properties of Cranberry Cultivars. Food Technology & Biotechnology, 47(1), 56-61
- Cervantes, M. L. Paredes, O. (2009). Potencial Nutracéutico de Cultivos de Arándano (*Vaccinum sp*) Seleccionados en México. Tesis para obtener el Título de Maestro en Ciencias y Tecnología de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Chordi, S. (2013) Contenido fenólico y capacidad antioxidante de fresa mínimanete procesada sometida a tratamientos de conservación por pulsos de luz de alta intensidad. Tesis para obtener el grado de Nutrición Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Lleida.
- Haddad, A., Venkateswaran, V., Viswanathan, L., Teahan, S., Fleshner, N. and Klotz, L. 2006. "Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines". Prostate Cancer Prostatic Diseases 9: 68-76.
- Pineli, L., Moretti, C., Dos Santos, M., Campos, A., Brasileiro, A., Córdova, A., Chiarello. (2011). Antioxidants and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars at different ripeness stages. Journal of Food Composition and Analysis. 24: 11-16.
- Vattem, D., Ghaedian, R., Shetty, K. (2005) Enhancing health benefits of b erries through phenolic antioxidant enrichmen: focus on cranberry. Asia Pac J. Clin Nutr; 14 (2): 120-130.
- Zhang, J., Wang, X., Yu, O., Tang, J., Gu, X., Wan, X., Fang, C. (2011). Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) during fruit development and maturation. Journal of Experimental Botany, Vol. 62, No. 3, pp. 1103–1118.