



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

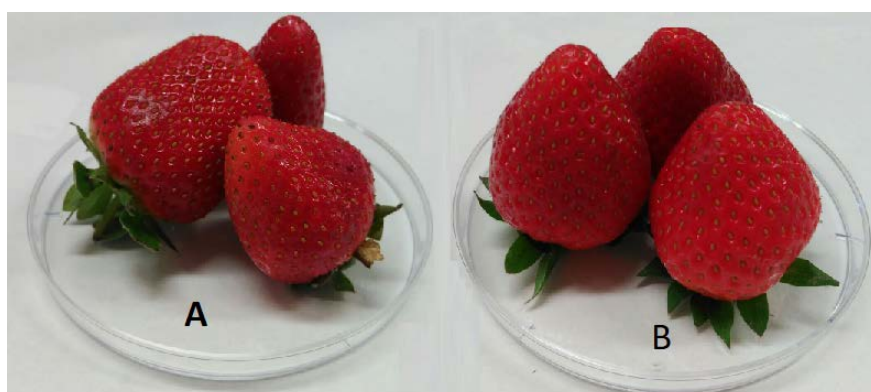
Grado en Biología

## Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Estudio comparativo de la actividad antioxidante en fresas de cultivos de origen tradicional versus ecológico.**

**Comparative study of antioxidant activity in strawberries from traditional versus ecological crops.**

**Estudo comparativo da actividade antioxidante en fresas de cultivos de orixe tradicional versus ecolóxico.**



**Javier López do Campo**

Julio, 2017

*Tutora Académica: Dra. Ángeles Bernal Pita da Veiga*



**TRABALLO FIN DE GRAO**

Dña. Maria de los Angeles Bernal Pita da Veiga, autoriza a presentación do Traballo de Fin de Grao "Estudo comparativo da actividade antioxidante en fresas de cultivos de orixe tradicional versus ecolóxico", presentado por Javier López do Campo para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña a 12 de Xullo do 2017.

Fdo.: Angeles Bernal Pita da Veiga

## ÍNDICE

1	Introducción.....	1
1.1	La fresa.....	1
1.2	Tipos de cultivos agrícolas: tradicionales/convencionales y ecológicos....	2
1.3	Compuestos fenólicos.....	2
1.4	Capacidad antioxidante.....	3
2	Objetivos .....	6
3	Material y métodos .....	7
3.1	Material vegetal.....	7
3.2	Determinación de las características físico-químicas de <i>Fragaria x ananassa</i> .....	7
3.3	Preparación y extracción de las muestras de fresa.....	8
3.4	Determinación del contenido en fenoles totales.....	8
3.5	Determinación de la capacidad antioxidante: Ensayo DPPH.....	9
3.5.1	Recta patrón de Trolox .....	9
3.5.2	Recta patrón de Quercetina.....	9
3.6	Determinación de la capacidad antioxidante: Ensayo ABTS .....	10
3.6.1	Recta patrón de Trolox .....	10
3.6.2	Recta patrón de Quercetina.....	10
3.7	Análisis estadístico.....	11
4	Resultados y Discusión .....	12
4.1	Características físico-químicas de los frutos de <i>Fragaria x ananassa</i> . ...	12
4.2	Determinación del contenido en compuestos fenólicos totales.....	14
4.3	Determinación de la capacidad antioxidante.....	15
4.3.1	Ensayo con DPPH .....	15
4.3.2	Ensayo con ABTS.....	16
5	Conclusiones/Conclusions .....	19
6	Bibliografía .....	20

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Planta y fruto de la fresa .....	1
Figura 2: Principio del ensayo de capacidad antioxidante con DPPH.....	4
Figura 3: Principio del ensayo de capacidad antioxidante mediante ABTS.....	4
Figura 4: Molécula de Trolox.....	5
Figura 5: Molécula de Quercetina .....	5
Figura 6: Comparación de fresas de cultivos ecológicos (A) frente a fresas de cultivos tradicionales (B) .....	12
Figura 7: Comparación de fresas secas de cultivos ecológicos (A) frente a fresas de cultivos tradicionales (B).....	13
Figura 8: Contenido en fenoles totales según el estado de conservación de la fresa .....	14
Figura 9: Resultados del ensayo de DPPH, en equivalencias de Trolox.....	15
Figura 10: Resultados del ensayo de DPPH, en equivalencias de Quercetina	16
Figura 11: Resultados del ensayo de ABTS, en equivalencias de Trolox .....	17
Figura 12: Resultados del ensayo de ABTS, en equivalencias de Quercetina.	17

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características físico-químicas de las fresas ecológicas.....	12
Tabla 2: Características físico-químicas de las fresas tradicionales. ....	13
Tabla 3: Contenido de fenoles totales en fresas ecológicas y tradicionales.....	14
Tabla 4: Capacidad antioxidante, ensayo DPPH.....	15
Tabla 5: Capacidad antioxidante, ensayo ABTS. ....	16

## Resumen

En el presente trabajo se realiza un estudio de la actividad antioxidante en frutos de fresa de la especie *Fragaria x ananassa* Duch. en diferentes estados de conservación, con la intención de comparar el cultivo tradicional y el ecológico. Para ello, se tomaron fresas de ambos cultivos y se analizaron las características físico-químicas, el contenido fenólico mediante el método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante mediante los ensayos de DPPH y ABTS. Los resultados no arrojaron diferencias entre ambos tipos de cultivos, pero muestran que en el proceso de deshidratación del fruto se produce la degradación de compuestos fenólicos y, por lo tanto, el descenso de la actividad antioxidante.

## Abstract

The present paper deals with the study of the antioxidant activity in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* Duch.) in different conservation conditions with the purpose of comparing traditional and organic cultivation. Various analysis were performed in strawberries from both cultivars so as to determine their physical-chemical characteristics, phenolic content through the Folin-Ciocalteu method and antioxidant activity assessed by the DPPH and ABTS assays. Obtained results do not show differences between the two types of cultivars. Nevertheless, they reveal a degradation of phenolic compounds, which takes place during the dehydration process of the fruit, along with the subsequent decrease of the antioxidant activity.

## Resumo

No presente traballo realízase un estudo da actividade antioxidante en froitos de amorodo da especie *Fragaria x ananassa* Duch. en diferentes estados de conservación, coa intención de comparar o cultivo tradicional e o ecológico. Para iso tomáronse amorodos de ambos cultivos e analizáronse as características físico-químicas, o contido fenólico mediante o método Folin-Ciocalteu e a actividade antioxidante mediante os ensaios de DPPH e ABTS. Os resultados non arroxaron diferenzas entre ambos tipos de cultivos pero mostran que no proceso de deshidratación do froito prodúcese a degradación de compostos fenólicos e por tanto o descenso da actividade antioxidante.

## Palabras clave

*Fragaria x ananassa*, fresa, cultivo tradicional, cultivo ecológico, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, DPPH, ABTS.

## Key words

*Fragaria x ananassa*, strawberry, traditional cultivation, organic cultivation, phenolic compounds, antioxidant activity, DPPH, ABTS.

## 1 Introducción

### 1.1 La fresa

La fresa es un fruto rojo y carnoso, de tipo eterio, característico de las especies del género *Fragaria*, perteneciente a la familia Rosaceae. La fresa que comúnmente se comercializa corresponde con el híbrido *Fragaria x ananassa* Duch., resultante de la hibridación de caracteres intermedios de *Fragaria chiloensis* L. y *Fragaria virginiana* Mill. (Muñoz Garmendia and Navarro, 1998).



Figura 1: Planta y fruto de la fresa (Delange.org, 2017; Mygardenlife.com, 2017)

*Fragaria x ananassa* es una planta herbácea que mide entre 10 y 20 cm, que presenta unos rizomas muy ramificados, con estolones cortos o sin ellos. Las hojas son de color verde oscuro, de haz glabra o subglabra y envés piloso. Presenta entre 6 y 8 sépalos, 6 y 8 piezas del cálculo, 6 y 8 pétalos blancos y un receptáculo con la zona axial más o menos pilosa. El eterio mide entre 20 y 40 mm, es ovoide, globoso, de color rojo intenso y brillante (Muñoz Garmendia and Navarro, 1998).

Las bayas, incluida la fresa, tienen una gran importancia dentro del resto de frutas debido a su alto contenido en compuestos nutritivos, incluyendo minerales, vitaminas, fibra y compuestos fenólicos. La fresa tiene un destacable valor nutricional por sus altos niveles de vitamina C y componentes fenólicos que le confieren una relevante capacidad antioxidante (Giampieri et al., 2012).

Este valor nutricional junto a su importancia comercial son las razones que han hecho que esta investigación esté enfocada en la cuantificación de compuestos fenólicos y de la capacidad antioxidante de la fresa.

## **1.2 Tipos de cultivos agrícolas: tradicionales/convencionales y ecológicos**

La agricultura representa uno de los métodos más exitosos a la hora de provisionar de alimento a la creciente población humana. Actualmente se pueden distinguir dos modelos de cultivos, un primer modelo basado en la maximización de la producción y las ganancias, la agricultura tradicional o convencional y un segundo modelo más sostenible para el medio ambiente pero de menor producción, la agricultura ecológica (Gliessman, 2002).

La agricultura tradicional se basa, principalmente en seis prácticas básicas: la labranza intensiva, el monocultivo, la irrigación, la aplicación de fertilizantes inorgánicos, el control químico de plagas y la manipulación genética de los cultivos. Estas prácticas están enfocadas al aumento de la productividad a corto plazo pero provocan problemas en el medio, como la degradación del suelo, el uso excesivo de agua y la contaminación del ambiente (Gliessman, 2002).

La agricultura ecológica se basa en la aplicación de principios ecológicos para el diseño y manejo de agroecosistemas sostenibles, siendo por un lado adecuada ambientalmente y por otro productiva y económicamente viable. La agricultura sostenible debe cumplir los siguientes criterios: tener el mínimo efecto negativo en el ambiente, preservar y reconstruir la fertilidad del suelo, un uso del agua sin alterar la recarga de acuíferos y su uso por parte de todos los elementos del ecosistema, valorar y conservar la diversidad biológica y garantizar la equidad en el acceso a las prácticas agrícolas apropiadas (Gliessman, 2002).

## **1.3 Compuestos fenólicos**

Las plantas destinan una cantidad significativa de carbono y energía en la síntesis de una gran variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener función directa en el metabolismo (respiración, fotosíntesis...). Estas moléculas reciben el nombre de metabolitos secundarios y tienen una gran variedad de funciones ecológicas para las plantas y un significativo valor medicinal y económico para el ser humano. Se agrupan principalmente en cuatro grupos: terpenos, glicósidos, alcaloides y compuestos fenólicos, objeto de esta investigación (Ávalos García and Pérez-Urria Carril, 2009).

Los compuestos fenólicos son productos secundarios que se caracterizan por tener un grupo fenol, es decir, un anillo aromático que posee al menos un radical hidroxilo. Son un grupo químicamente heterogéneo formado por casi 10.000 compuestos, que pueden ser solubles en agua, en solventes orgánicos o insolubles cuando forman polímeros de gran tamaño (Taiz and Zeiger, 2006).



Estos compuestos desempeñan diversas funciones en la planta, sirviendo como defensa frente a herbívoros o patógenos, funcionando como soporte mecánico, atrayendo polinizadores y dispersadores de frutos, absorbiendo las radiaciones ultravioleta o reduciendo el crecimiento de plantas competidoras (Taiz and Zeiger, 2006).

Los compuestos fenólicos son objeto de múltiples estudios debido a que son una parte esencial de la dieta humana y el foco de un considerable interés por sus propiedades antioxidantes. Estas propiedades antioxidantes previenen el daño tisular por radicales libres, evitando su formación, eliminándolos y promoviendo su descomposición (Peña-Cerda et al., 2017).

En el caso particular de este trabajo, se conoce que las fresas son ricas en una gran variedad de compuestos fenólicos, poseen como media un 41% de antocianinas, un 28% de flavan-3-oles, un 14% de elagitaninos, un 13% de ácidos cinámicos, un 3% de flavonoles y un 1% de ácido elágico (Park et al., 2017).

#### **1.4 Capacidad antioxidante**

Como resultado del metabolismo de las plantas se produce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los distintos compartimentos celulares, principalmente en los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas. Algunos ejemplos de ROS son el ion superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroperoxil ( $HO_2^-$ ) o el ion hidroxilo ( $OH^-$ ). Todas estas moléculas provocan daños en el ADN, la modificación de proteínas, la inactivación de enzimas y la oxidación de lípidos (Kasote et al., 2015).

Las plantas para prevenir estos daños celulares poseen un sistema enzimático formado por la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa y unos sistemas no enzimáticos constituidos por moléculas de bajo peso molecular como el ácido ascórbico, el glutatión, la prolina, los compuestos fenólicos o los flavonoides, generalmente denominados como antioxidantes (Kasote et al., 2015).

La capacidad antioxidante juega un papel importante en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas causadas por el daño oxidativo, por lo que el consumo de frutas y vegetales se asocia a un menor riesgo de padecer enfermedades degenerativas, cardiovasculares y cáncer (Méndez-Lagunas et al., 2017). Las fresas poseen unos altos niveles de capacidad antioxidante asociados al contenido en compuestos fenólicos, incluyendo ácidos fenólicos y flavonoides (Panico et al., 2009).

La detección de la capacidad antioxidante de los frutos de fresa se va a llevar a cabo a partir de los ensayos de DPPH y ABTS, basados en la determinación espectrofotométrica de la decoloración de la solución de un compuesto cromógeno oxidado en presencia de antioxidantes.

El ensayo de DPPH consiste en la cuantificación de la actividad antioxidante determinada por el descenso de la absorbancia a 515 nm de una solución metanólica de radical difenil 1-picrilhidrazil (DPPH) en presencia de extracto de fresa, usando la solución del radical DPPH como blanco. A mayor capacidad antioxidante del extracto, habrá una mayor pérdida de color, proporcional al grado de captura del radical oxidado (Teixeira et al., 2013).

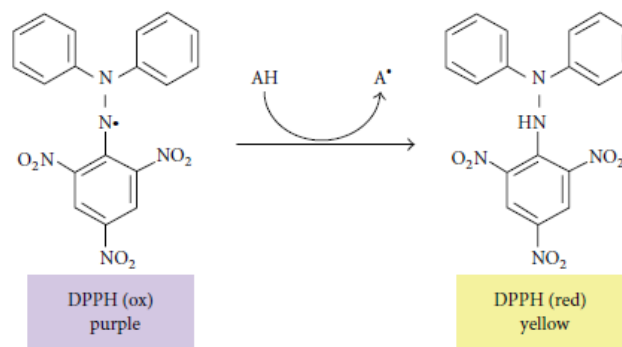


Figura 2: Principio del ensayo de capacidad antioxidante con DPPH (Teixeira et al., 2013)

El ensayo de ABTS consiste en la cuantificación de la actividad antioxidante determinada por el descenso de la absorbancia a 734 nm de una solución de ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>) en presencia de extracto de fresa, usando la solución del radical ABTS como blanco. A mayor capacidad antioxidante del extracto, habrá una mayor pérdida de color, proporcional al grado de captura del radical oxidado (Boligon et al., 2014).

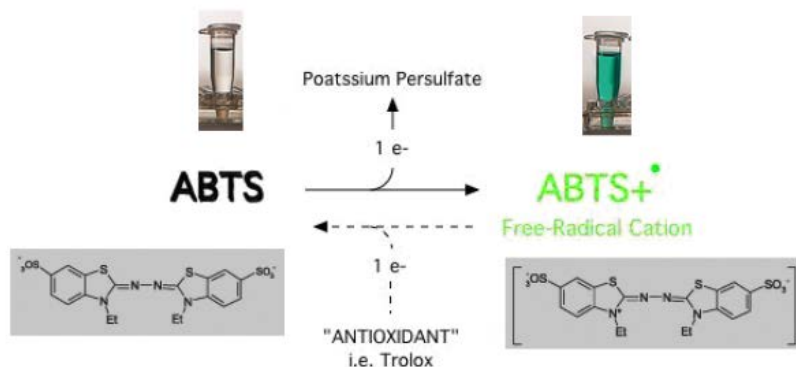


Figura 3: Principio del ensayo de capacidad antioxidante mediante ABTS (Boligon et al., 2014)

Para ambos ensayos se han utilizado dos estándares antioxidantes, el Trolox, que es un fenol simple análogo de la vitamina E, y la quercetina que es flavonoide (fenol compuesto).

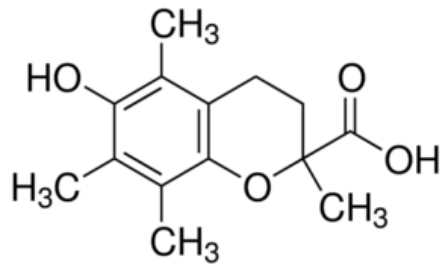


Figura 4: Molécula de Trolox (Sigma-Aldrich, 2017)

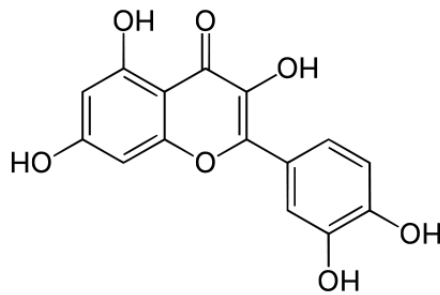


Figura 5: Molécula de Quercetina (Sigma-Aldrich, 2017)

## **2 Objetivos**

A partir de fresas de distinta procedencia (cultivo tradicional y ecológico) y de distintos estados de conservación (frescas, congeladas y deshidratadas) se pretende:

1. Determinar las características físico-químicas de frutos de fresa fresca procedentes del cultivo tradicional y ecológico.
2. Realizar un estudio comparativo del contenido en fenoles totales.
3. Determinar la actividad antioxidante mediante los métodos espectrofotométricos de DPPH y ABTS, utilizando el Trolox y la quercetina como compuestos patrón.

### 3 Material y métodos

#### 3.1 Material vegetal

Las fresas empleadas en los distintos ensayos fueron adquiridas en un establecimiento local. Las fresas ecológicas proceden de la empresa Bionest (Bionest.es, 2017) mientras que las fresas tradicionales son de la marca Doñarosa, perteneciente a la empresa Surexport (Surexport.es, 2017).

#### 3.2 Determinación de las características físico-químicas de *Fragaria × ananassa*

La determinación de las características físico-químicas de los frutos comerciales de fresa, se llevó a cabo por igual para las dos variedades de cultivo, mediante la determinación del peso fresco, peso seco, tamaño, contenido en sólidos solubles y acidez titulable (Prior et al., 1998).

Los valores de peso fresco se determinaron pesando 10 fresas individualmente y realizando sus respectivos promedios. El peso seco se determinó por triplicado tras introducir las fresas en una estufa a 70°C durante 72 h.

El tamaño medio se determinó midiendo con un calibre tanto la altura como el diámetro de 10 fresas de cada tipo de cultivo y hallando sus respectivos valores medios. La medida de la altura se tomó como la distancia desde el punto de intersección al tallo hasta el extremo del fruto y la medida del diámetro como la distancia perpendicular a la anterior que mide el ancho de la fresa.

El contenido en sólidos solubles se determinó por triplicado midiendo en un refractómetro Shibuye modelo 15287(0 – 32%) el zumo obtenido tras exprimir las fresas a través de 2 capas de gasas y filtrar con papel de filtro. Los resultados fueron expresados en grados Brix (°Bx).

La determinación de la acidez titulable se realizó en alícuotas de 5 ml tomadas de disoluciones formadas por 20 g de fresa y 100 ml de agua destilada. La titulación se realizó con hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N y se utilizaron 2 gotas de fenolftaleína como indicador en la alícuota (Martínez-Bolaños et al., 2008).

El porcentaje de acidez se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{\text{Volumen NaOH} * \text{Normalidad NaOH} * \text{meq ácido cítrico} * 100}{\text{Volumen alícuota}}$$

Este porcentaje se determinó en relación a miliequivalentes de ácido cítrico (meq= 0,064), por ser el ácido que se encuentra en mayor proporción en las fresas (Martínez-Bolaños et al., 2008). Los resultados se expresan en % Acidez reflejados en peso fresco (g ácido cítrico/ PF).

### 3.3 Preparación y extracción de las muestras de fresa

Para determinar el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante con distintos tipos de conservación del fruto, se trabajó con fresas frescas, fresas congeladas y fresas deshidratadas, descartando las hojas del cáliz. La congelación se llevó a cabo por triplicado, en un congelador a - 4°C hasta el momento de su utilización. La deshidratación se realizó por triplicado en una estufa a 70°C durante 72 h y posteriormente las fresas secas se conservaron en sobres cerrados.

La preparación del extracto de fresas frescas y congeladas se realizó homogenizando cada fresa en 12 ml de agua destilada en una batidora, mientras que las fresas secas se cortaron y homogeneizaron en 12 ml con un homogeneizador Micra D-I (Art moderne Labortechnik). Se tomó 1 ml de cada extracto homogéneo y se centrifugó a 10.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. Finalmente se realizó una dilución 1:5 del sobrenadante, obteniendo una disolución diluida a partir de la cual se realizaron todas las mediciones posteriores.

### 3.4 Determinación del contenido en fenoles totales

#### Método de Folin-Ciocalteu y recta de calibrado de ácido gálico

La determinación del contenido de fenoles totales se realiza con el reactivo de Folin-Ciocalteu, según el método modificado que reduce el consumo de reactivos (Kraujalyté et al., 2015).

La recta de calibrado se realizó con 5 concentraciones distintas de ácido gálico (0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,10 mg/ml y 0,20 mg/ml) a partir de las cuales se tomaron 100 µl por triplicado y se añadió 1 ml de reactivo Folin-Ciocalteu diluido 10 veces. Tras 4 minutos de incubación en oscuridad, le añadimos a cada tubo 1 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7% y 400 µl de agua destilada, volviendo a incubar los tubos durante 90 minutos en oscuridad. Tras la incubación, se procede a la lectura de la absorbancia a 760 nm, utilizando como blanco un tubo con 100 µl de agua destilada en lugar de ácido gálico.

$$\text{Absorbancia}_{760\text{nm}} = 4,4143 \cdot [\text{equivalentes de ácido gálico}] + 0,0034$$
$$R^2 = 0,9978$$

La cuantificación del contenido fenólico de las muestras de fresa se realizó con el mismo procedimiento que el empleado en la elaboración de la recta de calibrado, con la sustitución del ácido gálico por 100 µl de cada muestra correspondiente. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco de la muestra (mg GAE/ g PF).

### 3.5 Determinación de la capacidad antioxidante: Ensayo DPPH

La actividad antioxidante se determinó por el descenso de la absorbancia a 515 nm de una solución metanólica de radical difenil 1-picrilhidrazil (DPPH) en presencia de las distintas muestras de fresa, en donde la solución del radical DPPH es la absorbancia inicial ( $A_0$ ) (Thaipong et al., 2006).

El DPPH con el radical oxidado presenta un color inicial morado que a medida que se va reduciendo se torna amarillo. Esta diferencia de color permite cuantificar el porcentaje de DPPH reducido mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{reducido}} = ((A_0 - A_m)/A_0) \cdot 100, \text{ siendo } A_m \text{ la absorbancia de la muestra}$$

Preparamos una solución de DPPH 1mM (40 mg de DPPH en 100 ml de metanol absoluto), que se diluye con metanol hasta llegar a valores de absorbancia cercanos a 0,800.

Las medidas de absorbancia se realizaron a 515 nm, utilizando metanol absoluto como blanco y haciendo reaccionar, directamente en la cubeta y sin tiempo de incubación, 50  $\mu\text{l}$  del estándar antioxidante con 950  $\mu\text{l}$  de DPPH. Los valores serán expresados comparándolos con equivalentes de dos compuestos patrón.

#### 3.5.1 Recta patrón de Trolox

Preparamos una solución madre de Trolox 1 mM en etanol absoluto (25 mg de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico en 100 ml de etanol) y a partir de ella preparamos 5 disoluciones a diferentes concentraciones (100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$ ). Medimos la absorbancia inicial ( $A_0$ ) y las absorbancias de las 5 concentraciones por triplicado a 515 nm, tomando 50  $\mu\text{l}$  de cada concentración y 950  $\mu\text{l}$  de DPPH.

$$\% \text{ DPPH}_{\text{reducido}} = 0,0922 \cdot [\text{equivalentes de Trolox}] - 1,1270$$
$$R^2 = 0,9848$$

#### 3.5.2 Recta patrón de Quercetina

Preparamos una solución madre de quercetina 1 mM en etanol absoluto (30 mg de quercetina en 100 ml de etanol) y a partir de ella preparamos 5 disoluciones a diferentes concentraciones (100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$ ). Medimos la absorbancia inicial ( $A_0$ ) y las absorbancias de las 5 concentraciones por triplicado a 515 nm, tomando 50  $\mu\text{l}$  de cada concentración y 950  $\mu\text{l}$  de DPPH.

$$\% \text{ DPPH}_{\text{reducido}} = 0,1028 \cdot [\text{equivalentes de quercetina}] - 0,4290$$
$$R^2 = 0,9507$$

### 3.6 Determinación de la capacidad antioxidante: Ensayo ABTS

La capacidad antioxidante se determinó por el descenso en la absorbancia a 734 nm de una solución de ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS·+) con distintas muestras de fresa, tomando dicha solución de ABTS como la absorbancia inicial ( $A_0$ ).

El ABTS con el radical oxidado presenta un color inicial azul verdoso que a medida que se va reduciendo se vuelve incoloro. Esta diferencia de color permite cuantificar el porcentaje de ABTS reducido mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ABTS}_{\text{reducido}} = ((A_0 - A_m)/A_0) \cdot 100, \text{ siendo } A_m \text{ la absorbancia de la muestra}$$

Preparamos una solución de ABTS 7 mM en agua destilada y la hacemos reaccionar con persulfato de potasio 2,45 mM, dejándose durante 12-16 h en oscuridad. Finalmente esta disolución se disuelve con etanol absoluto hasta obtener una absorbancia próxima a 0,700 (Re et al., 1999).

Las medidas de absorbancia se realizaron a 734 nm, utilizando etanol absoluto como blanco y haciendo reaccionar, directamente en la cubeta y sin tiempo de incubación, 10  $\mu$ l del estándar antioxidante con 990  $\mu$ l de ABTS. Los valores serán expresados comparándolos con equivalentes de dos compuestos patrón.

#### 3.6.1 Recta patrón de Trolox

Preparamos una solución madre de Trolox 1 mM en etanol absoluto (25 mg de Trolox en 100 ml de etanol) y a partir de ella preparamos 5 disoluciones a diferentes concentraciones (100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 400  $\mu$ M y 500  $\mu$ M). Medimos la absorbancia inicial ( $A_0$ ) y las absorbancias de las 5 concentraciones por triplicado a 734 nm, tomando 10  $\mu$ l de cada concentración y 990  $\mu$ l de ABTS.

$$\% \text{ ABTS}_{\text{reducido}} = 0,0302 \cdot [\text{equivalentes de Trolox}] - 0,1581$$
$$R^2 = 0,9926$$

#### 3.6.2 Recta patrón de Quercetina

Preparamos una solución madre de quercetina 1 mM en etanol absoluto (30 mg de quercetina en 100 ml de etanol) y a partir de ella preparamos 5 disoluciones a diferentes concentraciones (100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 400  $\mu$ M y 500  $\mu$ M). Medimos la absorbancia inicial ( $A_0$ ) y las absorbancias de las 5 concentraciones por triplicado a 734 nm, tomando 10  $\mu$ l de cada concentración y 990  $\mu$ l de ABTS.

$$\% \text{ ABTS}_{\text{reducido}} = 0,0413 \cdot [\text{equivalentes de quercetina}] - 0,8017$$
$$R^2 = 0,9877$$



### **3.7 Análisis estadístico**

El estudio de las características físico-químicas se realizó por triplicado a excepción del peso fresco y el tamaño donde se tomaron 10 muestras. Los ensayos del contenido fenólico y la actividad antioxidante se realizaron por triplicado tanto para los dos tipos de cultivo, como para los diferentes estados de conservación del fruto. Los datos se expresaron con su respectivo error típico de la media, que se halló mediante un análisis de la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con el programa R, mediante un ANOVA (Análisis de la Varianza) y considerando que hay diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ . Las regresiones lineales se llevaron a cabo mediante el programa Microsoft Excel 2013.

## 4 Resultados y Discusión

### 4.1 Características físico-químicas de los frutos de *Fragaria × ananassa*.

En la figura 6 se pueden observar los dos tipos de fresas según el cultivo utilizado. No hay diferencias considerables en el aspecto y en el color, salvo que las fresas tradicionales presentan una mayor firmeza y un aspecto más homogéneo entre ellas.

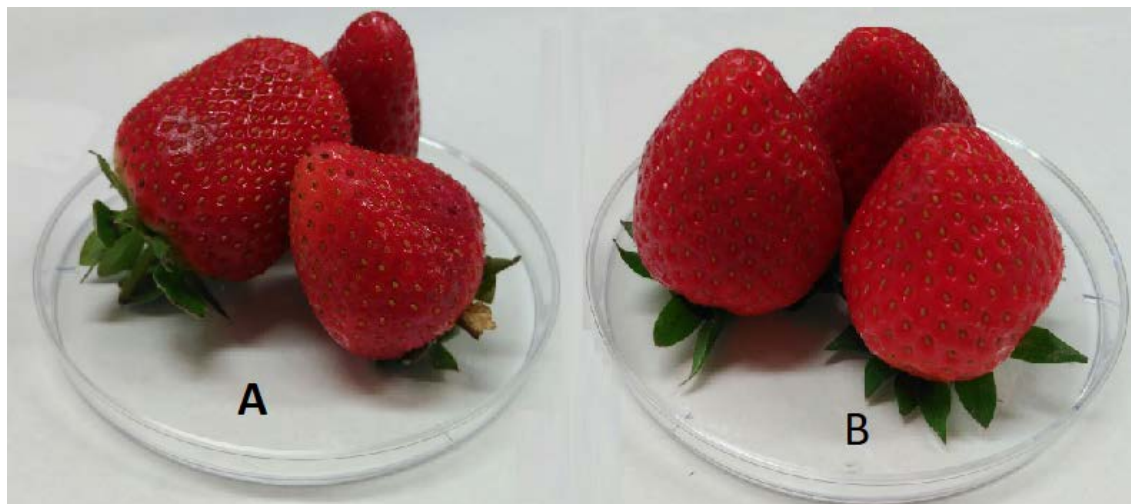


Figura 6: Comparación de fresas de cultivos ecológicos (A) frente a fresas de cultivos tradicionales (B)

Desde el punto de vista organoléptico, se valoraron las diferencias entre el color, aroma, sabor, dureza y aspecto, mediante una cata a ciegas. Se determinó que las fresas ecológicas presentaban un mejor aroma y sabor (9 personas de un total de 10 optaron por las fresas ecológicas) y que no se apreciaban diferencias entre el resto de características.

Las fresas ecológicas presentaron un peso fresco medio de  $17,52 \text{ g} \pm 0,63$  y un peso seco de  $1,77 \text{ g} \pm 0,13$ . Tienen un diámetro de  $32,69 \text{ mm} \pm 0,50$  y una altura de  $40,65 \text{ mm} \pm 0,79$ . El análisis de sólidos solubles reveló un resultado de  $5,40 \text{ }^\circ\text{Bx} \pm 0,31$  y el porcentaje de acidez fue de un  $0,90\% \pm 0,04$  (Tabla 1).

Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Diámetro (mm)	Altura (mm)	Sólidos solubles ( $^\circ\text{Bx}$ )	% Acidez
$17,52 \pm 0,63$	$1,77 \pm 0,13$	$32,69 \pm 0,50$	$40,65 \pm 0,79$	$5,40 \pm 0,31$	$0,90 \pm 0,04$

Tabla 1: Características físico-químicas de las fresas ecológicas.

Las fresas tradicionales presentaron un peso fresco medio de 18,64 g  $\pm$  0,69 y un peso seco de 1,22 g  $\pm$  0,09. Tienen un diámetro de 34,73 mm  $\pm$  0,49 y una altura de 41,01 mm  $\pm$  1,43. El análisis de sólidos solubles reveló un resultado de 5,53 °Bx  $\pm$  0,32 y el porcentaje de acidez fue de un 0,67%  $\pm$  0,03 (Tabla 2).

Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Diámetro (mm)	Altura (mm)	Sólidos solubles (°Bx)	% Acidez
18,64 $\pm$ 0,69	1,22 $\pm$ 0,09	34,73 $\pm$ 0,49	41,01 $\pm$ 1,43	5,53 $\pm$ 0,32	0,67 $\pm$ 0,03

Tabla 2: Características físico-químicas de las fresas tradicionales.

Al analizar los resultados nos encontramos con unos valores similares en el peso fresco, en el tamaño de las fresas y en el contenido en sólidos solubles, siendo mayores en las fresas tradicionales sin llegar a ser significativos.

Hay diferencias significativas en el peso seco, que concuerdan con investigaciones donde se obtuvieron mayores resultados en las fresas ecológicas que en las tradicionales (Conti et al., 2014). Estas diferencias se pueden explicar por la pérdida de peso seco debido a la formación de caramelo. Como se puede ver en la figura 7, en el proceso de deshidratación las fresas tradicionales han formado una capa de caramelo que no aparece en las fresas ecológicas.

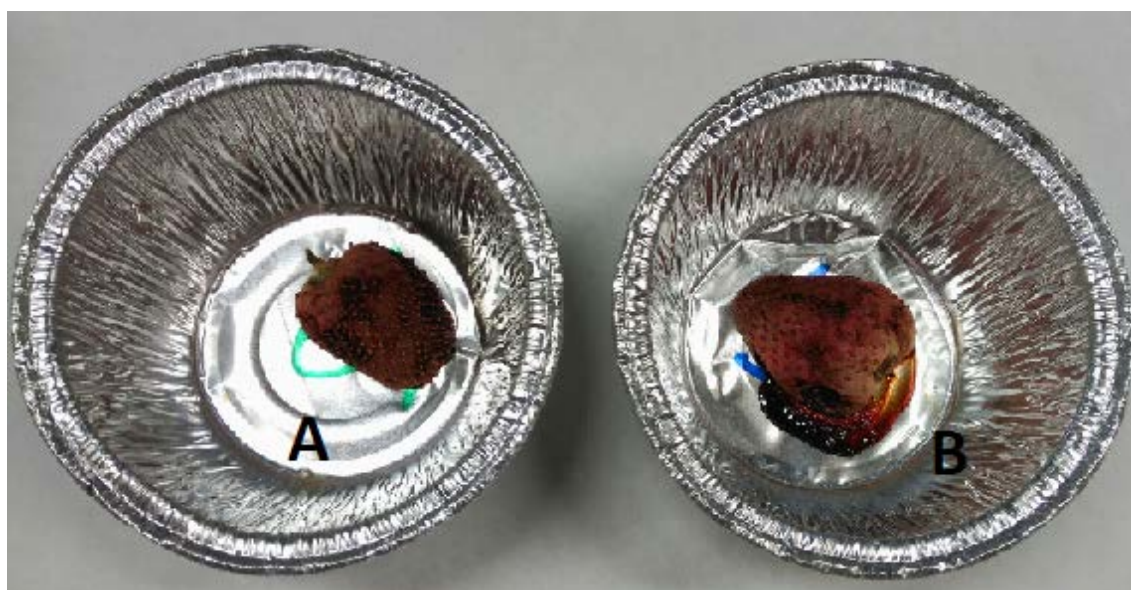


Figura 7: Comparación de fresas secas de cultivos ecológicos (A) frente a fresas de cultivos tradicionales (B)

En cuanto al porcentaje de acidez obtenemos unos resultados significativamente mayores en las fresas ecológicas que en las tradicionales, que concuerdan con los obtenidos en investigaciones anteriores, donde fresas procedentes del cultivo tradicional presentaban pHs superiores a las ecológicas (Barbieri et al., 2015).

## 4.2 Determinación del contenido en compuestos fenólicos totales

Al determinar el contenido en fenoles totales de los distintos tipos de conservación del fruto, observamos que las fresas frescas son las que poseen una mayor cantidad de compuestos fenólicos, seguidas de las fresas congeladas y por último las fresas secas. Estos resultados se mantienen en ambos tipos de cultivos y divergen significativamente (Tabla 3).

	<b>Cultivo Ecológico</b>	<b>Cultivo Tradicional</b>
<b>Estado de la fresa</b>	mg GAE/ g PF	mg GAE/ g PF
Frescas	1,868 ± 0,101	1,852 ± 0,097
Congeladas	1,036 ± 0,071	0,880 ± 0,049
Deshidratadas/Secas	0,618 ± 0,051	0,624 ± 0,102

Tabla 3: Contenido de fenoles totales en fresas ecológicas y tradicionales.

Al analizar los resultados en los dos cultivos no encontramos diferencias significativas. Los valores de ambos cultivos en fresas frescas y deshidratadas son muy similares mientras que en las congeladas se obtuvo una mayor cantidad de fenoles en el cultivo ecológico, sin llegar a ser significativo.

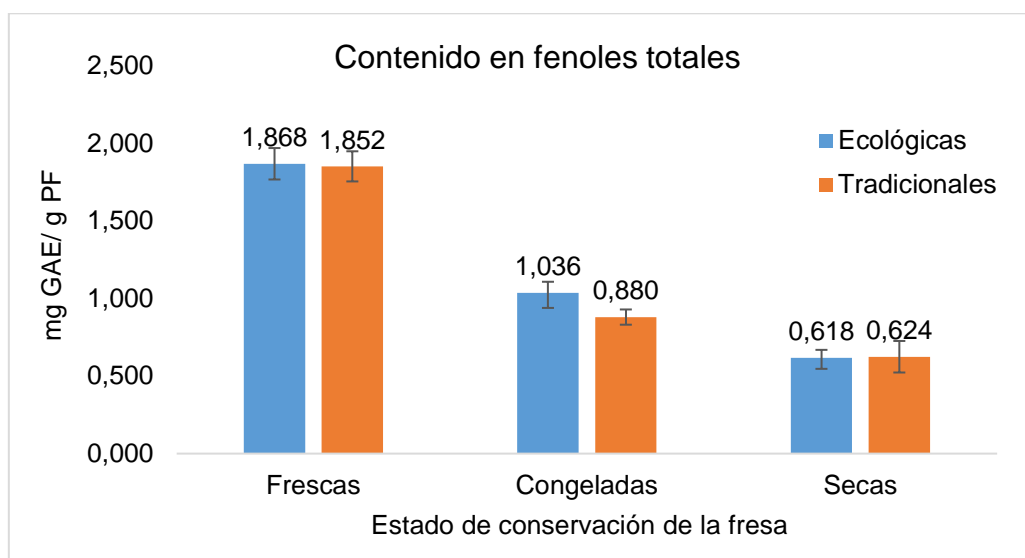


Figura 8: Contenido en fenoles totales según el estado de conservación de la fresa

La pérdida de fenoles totales en el proceso de deshidratación está asociada a las altas temperaturas que provocan la liberación y degradación térmica de los compuestos fenólicos y la pérdida parcial de la lignina. Este descenso concuerda con resultados anteriores (Méndez-Lagunas et al., 2017; Wojdyło et al., 2009).

### 4.3 Determinación de la capacidad antioxidante

#### 4.3.1 Ensayo con DPPH

Los resultados obtenidos mediante el ensayo con DPPH muestran una mayor capacidad antioxidante en las fresas frescas, seguidas de cerca por las fresas congeladas y por último de las fresas secas (Tabla 4).

En cuanto a los diferentes cultivos, obtenemos resultados variados. En las fresas frescas se aprecia una mayor capacidad antioxidante en el cultivo ecológico mientras que en las fresas congeladas es mayor en el tradicional, repitiéndose este patrón en las fresas deshidratadas pero con valores significativamente inferiores.

	Cultivo ecológico		Cultivo tradicional	
	$\mu\text{mol TE/g PF}$	$\mu\text{mol QE/g PF}$	$\mu\text{mol TE/g PF}$	$\mu\text{mol QE/g PF}$
<b>Frescas</b>	$4,047 \pm 0,339$	$3,579 \pm 0,303$	$3,246 \pm 0,225$	$2,857 \pm 0,201$
<b>Congeladas</b>	$3,471 \pm 0,034$	$3,064 \pm 0,031$	$3,735 \pm 0,249$	$3,300 \pm 0,224$
<b>Secas</b>	$1,319 \pm 0,140$	$1,150 \pm 0,248$	$1,530 \pm 0,283$	$1,336 \pm 0,248$

Tabla 4: Capacidad antioxidante, ensayo DPPH.

Si bien no se aprecian diferencias significativas entre la capacidad antioxidante de las fresas frescas y congeladas, estas divergen de las fresas deshidratadas, donde hay un descenso significativo de la capacidad antioxidante que concuerda con el menor contenido fenólico (Tabla 3) y la bibliografía expuesta anteriormente (Méndez-Lagunas et al., 2017; Wojdyło et al., 2009).

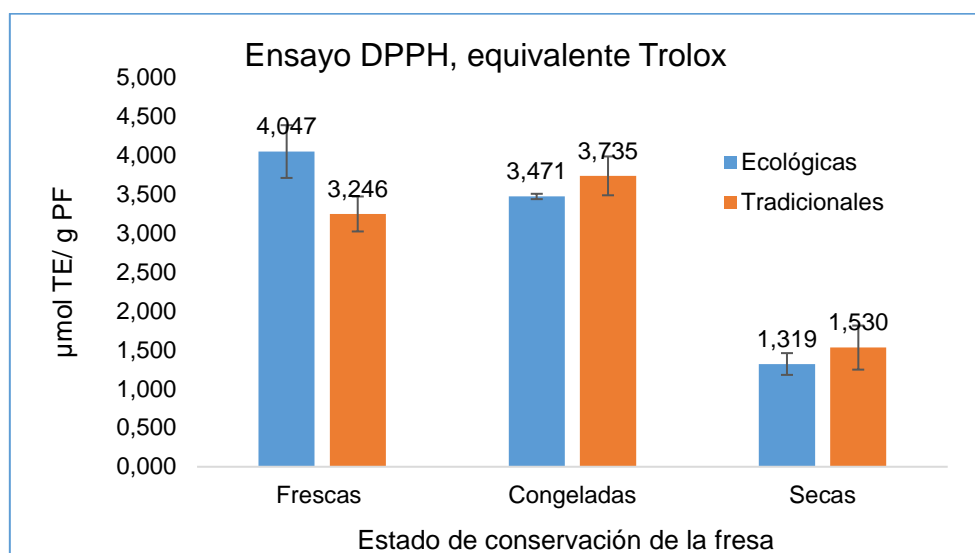


Figura 9: Resultados del ensayo de DPPH, en equivalencias de Trolox

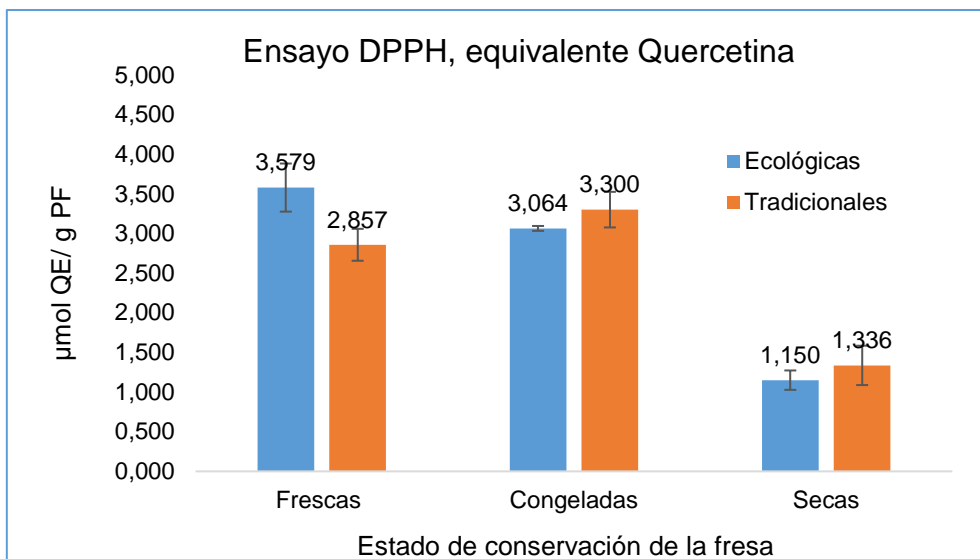


Figura 10: Resultados del ensayo de DPPH, en equivalencias de Quercetina

La capacidad antioxidante fue medida en base a dos estándares antioxidantes. Los valores obtenidos en equivalentes de Trolox (TE) y en equivalentes de Quercetina (QE) son similares, siendo algo menores en estos segundos, lo que está relacionado con un menor número de polifenoles que de fenoles simples (Figuras 9 y 10).

#### 4.3.2 Ensayo con ABTS

Los resultados obtenidos en este ensayo alternativo de la capacidad antioxidante ratifican lo mostrado anteriormente en el ensayo de DPPH. Al realizar el ensayo con ABTS, obtenemos una mayor capacidad antioxidante en las fresas frescas, seguidas de las fresas congeladas y por último, de las fresas secas (Tabla 5).

En cuanto a los diferentes cultivos, obtenemos resultados diferentes. En las fresas frescas se detecta una mayor capacidad antioxidante en el cultivo tradicional mientras que en las fresas congeladas y en las deshidratadas es mayor en el ecológico.

	Cultivo ecológico		Cultivo tradicional	
	μmol TE/g PF	μmol QE/g PF	μmol TE/g PF	μmol QE/g PF
<b>Frescas</b>	7,890 ± 0,384	5,575 ± 0,283	8,604 ± 0,769	6,105 ± 0,564
<b>Congeladas</b>	7,266 ± 1,192	5,106 ± 0,874	6,439 ± 0,315	4,493 ± 0,231
<b>Secas</b>	0,941 ± 0,318	0,575 ± 0,227	0,660 ± 0,252	0,389 ± 0,169

Tabla 5: Capacidad antioxidante, ensayo ABTS.

En ninguno de los tres estados de conservación estas diferencias son significativas, por lo que no se aprecian diferencias en la capacidad antioxidante entre los dos métodos de cultivo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo con DPPH (Tabla 4).

Al igual que en el ensayo con DPPH, no se detectan diferencias significativas entre la capacidad antioxidante de las fresas frescas y congeladas, coincidiendo con la bibliografía (Gonçalves et al., 2017). Por el contrario si hay un descenso significativo de la capacidad antioxidante de las fresas deshidratadas en comparación a los estados anteriores. Este descenso está relacionado con el menor número de fenoles totales (Tabla 3) y concuerda con lo obtenido en el ensayo con DPPH (Tabla 4) y con los resultados mostrados por otros autores (Méndez-Lagunas et al., 2017; Wojdyło et al., 2009).

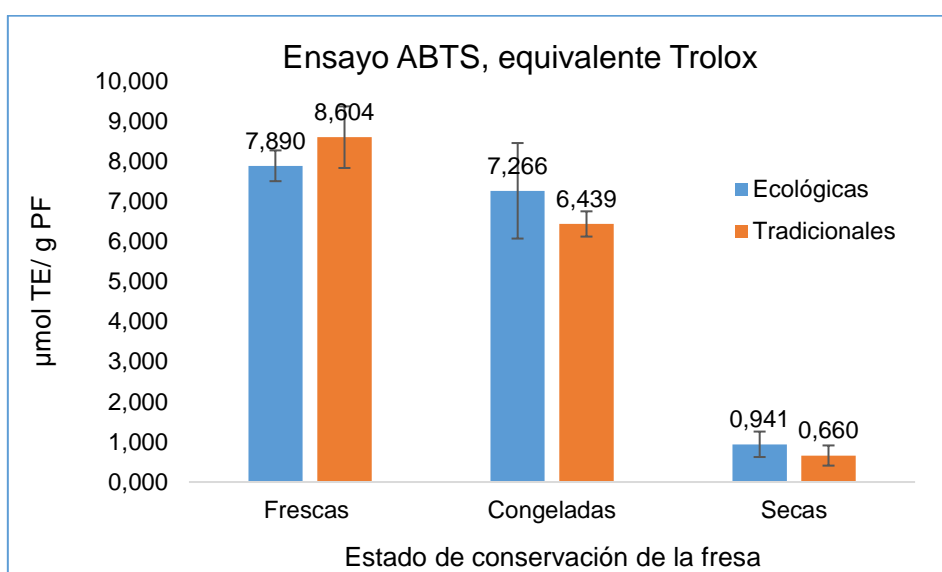


Figura 11: Resultados del ensayo de ABTS, en equivalencias de Trolox

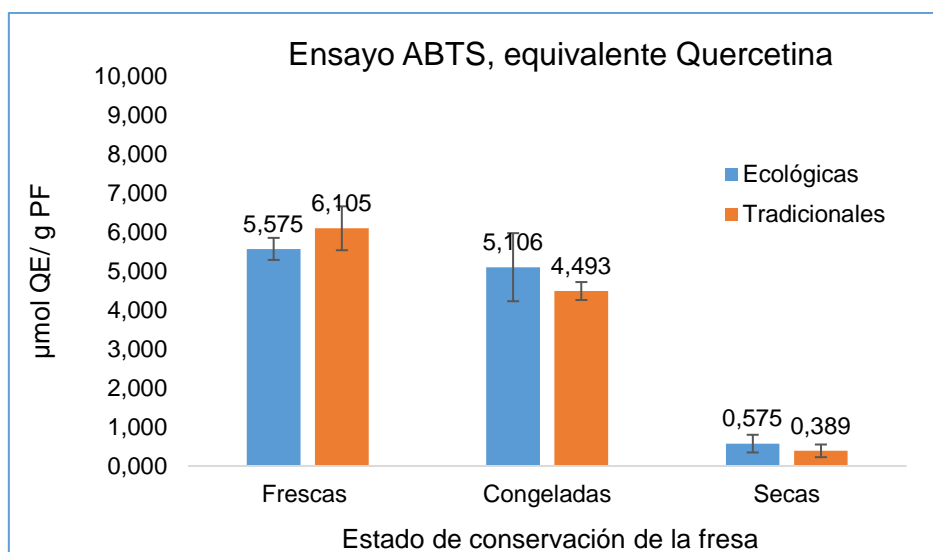


Figura 12: Resultados del ensayo de ABTS, en equivalencias de Quercetina

Al igual que en el ensayo con DPPH la capacidad antioxidante fue medida en base a dos estándares antioxidantes. Los valores obtenidos en equivalentes de Trolox (TE) y en equivalentes de Quercetina (QE) son similares, siendo algo menores en estos segundos, lo que está relacionado con un menor número de polifenoles que de fenoles simples (Figuras 11 y 12).

Los resultados de equivalentes de Trolox (TE) y equivalentes de Quercetina (QE) pertenecientes al ensayo de ABTS son mayores a los obtenidos en el ensayo con DPPH, con excepción de las fresas secas. Esto confirma la mayor sensibilidad del ensayo ABTS respecto al DPPH y coincide con otras investigaciones donde la actividad antioxidante obtenida en el ensayo ABTS es mayor que en el de DPPH (Thaipong et al., 2006).



## 5 Conclusiones/Conclusions

### Conclusiones

- El estudio de las características físico-químicas de las fresas procedentes de diferentes cultivos no arroja diferencias significativas en relación al peso fresco, tamaño y contenido en sólidos solubles. Las fresas ecológicas presentan un mayor peso seco y porcentaje de acidez que las fresas tradicionales, además de mejores características organolépticas.
- En cuanto al contenido en fenoles totales, no existen diferencias significativas entre ambos tipos de cultivo pero sí entre los estados de conservación. Los procesos de congelación y deshidratación provocan un descenso significativo en el contenido fenólico.
- El análisis de la actividad antioxidante fue equivalente para los dos ensayos utilizados. No se encontraron diferencias significativas entre las fresas procedentes del cultivo ecológico y el tradicional. El proceso de congelación no provoca pérdidas significativas en la capacidad antioxidante del fruto, a diferencia de la deshidratación donde existe un descenso significativo, por lo que la congelación es un mejor método de conservación.

### Conclusions

- The study of the physical-chemical characteristics of strawberries from different cultivations does not show significant differences in relation to fresh weight, size and soluble solids content. Ecological strawberries have a higher value of dry weight and percentage of acidity than traditionally-cultivated strawberries, as well as better organoleptic characteristics.
- There are significant differences between the different conservation conditions, but not between the content of total phenols of both types of cultivations. In addition, freezing and dehydration cause a significant decrease in the phenolic content.
- The analysis of the antioxidant activity was equivalent for the two used assays. No significant differences were found between the strawberries from ecological and traditional cultivation. Unlike dehydration, freezing does not cause a significant decrease of the antioxidant capacity of the fruit; this is the reason why freezing is a better conservation method.

## 6 Bibliografía

Ávalos García, A. and Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2(3), pp.119-145.

Barbieri, G., Colonna, E., Roupael, Y. and De Pascale, S. (2015). Effect of the farming system and postharvest frozen storage on quality attributes of two strawberry cultivars. *Fruits*, 70(6), pp.351-360.

Bionest.es. (2017). *Bionest*. [online] Available at: <http://www.bionest.es/ES/strawberry.html> [Accessed 3 Jul. 2017].

Boligon, A., Machado, M. and Athayde, M. (2014). Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Medicinal Chemistry*, 4(7), pp.517-522.

Conti, S., Villari, G., Faugno, S., Melchionna, G., Somma, S. and Caruso, G. (2014). Effects of organic vs. conventional farming system on yield and quality of strawberry grown as an annual or biennial crop in southern Italy. *Scientia Horticulturae*, 180, pp.63-71.

Delange.org. (2017). *Strawberry or Strawberries, Fragaria x ananassa "EarliGlow"*. *Arizona Vegetable & Fruit Gardening For The Arizona Desert Environment. Pictures, Photos, Images, Descriptions, Information, & Reviews*. [online] Available at: <https://delange.org/Strawberries/Strawberries.htm> [Accessed 3 Jul. 2017].

Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J., Quiles, J., Mezzetti, B. and Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28(1), pp.9-19.

Gliessman, S. (2002). *Agroecología: Procesos Ecológicos En Agricultura Sostenible*. Turrialba: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, pp.3-14.

Gonçalves, G., Resende, N., Carvalho, E., Resende, J. and Vilas Boas, E. (2017). Effect of pasteurisation and freezing method on bioactive compounds and antioxidant activity of strawberry pulp. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(6), pp.682-694.

Kasote, D., Katyare, S., Hegde, M. and Bae, H. (2015). Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *International Journal of Biological Sciences*, 11(8), pp.982-991.

Kraujalytė, V., Venskutonis, P., Pukalskas, A., Česonienė, L. and Daubaras, R. (2015). Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chemistry*, 188, pp.583-590.

Martínez-Bolaños, M., Nieto-Angel, D., Téliz-Ortíz, D., Rodríguez-Alcazar, J., Martínez-Damian, M., Vaquera-Huerta, H. and Carrillo Mendoza, O. (2008). Comparación Cualitativa de fresas (*Fragaria x ananassa* Duch). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, XIV (2).

Méndez-Lagunas, L., Rodríguez-Ramírez, J., Cruz-Gracida, M., Sandoval-Torres, S. and Barriada-Bernal, G. (2017). Convective drying kinetics of strawberry (*Fragaria ananassa*): Effects on antioxidant activity, anthocyanins and total phenolic content. *Food Chemistry*, 230, pp.174-181.

Muñoz Garmendia, F. and Navarro, C. (1998). *Flora ibérica. Plantas vasculares de la península Ibérica e Islas Baleares*. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC, Volumen VI, pp.88-93.

Mygardenlife.com. (2017). Strawberry (*Fragaria x ananassa*) | *My Garden Life*. [online] Available at: <https://www.mygardenlife.com/plant-library/3186/fragaria/x-ananassa/roman> [Accessed 3 Jul. 2017].

Panico, A., Garufi, F., Nitto, S., Di Mauro, R., Longhitano, R., Magrì, G., Catalfo, A., Serrentino, M. and De Guidi, G. (2009). Antioxidant activity and phenolic content of strawberry genotypes from *Fragaria x ananassa*. *Pharmaceutical Biology*, 47(3), pp.203-208.

Park, D., Park, Y., Lee, Y., Choi, I., Park, K., Park, S., Kim, B., Yeoung, Y. and Park, N. (2017). A Comparative Study of Phenolic Antioxidant Activity and Flavonoid Biosynthesis-Related Gene Expression Between Summer and Winter Strawberry Cultivars. *Journal of Food Science*, 82(2), pp.341-349.

Peña-Cerda, M., Arancibia-Radich, J., Valenzuela-Bustamante, P., Pérez-Arancibia, R., Barriga, A., Seguel, I., García, L. and Delporte, C. (2017). Phenolic composition and antioxidant capacity of *Ugni molinae* Turcz. leaves of different genotypes. *Food Chemistry*, 215, pp.219-227.

Prior, R., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G. and Mainland, C. (1998). Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), pp.2686-2693.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), pp.1231-1237.

Sigma-Aldrich. (2017). *Sigma-Aldrich*. [online] Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/spain.html> [Accessed 5 Jul. 2017].

Surexport.es. (2017). *Surexport*. [online] Available at: <http://www.surexport.es/ESP/strawberry.html> [Accessed 3 Jul. 2017].

Taiz, L. and Zeiger, E. (2006). *Plant physiology*. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers, Chapter 13.

Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E., Garrido, J. and Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Research International*, 2013, pp.1-11.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. and Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), pp.669-675.

Wojdyło, A., Figiel, A. and Oszmiański, J. (2009). Effect of Drying Methods with the Application of Vacuum Microwaves on the Bioactive Compounds, Color, and Antioxidant Activity of Strawberry Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), pp.1337-1343.