UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la
Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico
de Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS ENTERAS Y MÍNIMAMENTE PROCESADAS

por
María Rosa WILLINER

Instituto de Tecnología de Alimentos - FIQ - UNL
Directores de Tesis: Ing. Daniel Raúl GÜEMES
Mag. Cs. Alim. María Elida PIROVANI

- 2001 -

"Ánimo, pues, para seguir perseverando hasta el fin, porque no basta con haber comenzado"

San Antonio María Gianelli

A Raúl, Melina, Rodrigo y Sybela

A mis padres y mi hermana

Agradecimientos:

A mis Directores de Tesis Ing. Daniel Raúl Güemes y Mag. Alim. María Elida Pirovani por su gran apoyo, comprensión y orientación.

A la Sra. Norma de Czerweny de la localidad de Coronda por colaborar con toda la materia prima para realizar este estudio.

A mi compañero de trabajo en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Bioq. Claudio Nuñez por su colaboración y apoyo cotidiano.

Al Sr. Walter Darú, de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, y a los Sres. Arias y Sampietro del Taller de Vidrio de la UNL, por su ayuda desinteresada.

Un recuerdo especial para el Ing. Jorge Hugo Di Pentima que confió en mí.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS v
ÍNDICE DE FIGURAS xi
RESUMEN xiii
OBJETIVOS xv

1. INTRODUCCIÓN
1.1 ACIDO ELÁGICO 2
1.1.1 Características generales de los fitoquímicos con valor nutracéutico 2
1.1.2 Naturaleza química del ácido elágico 6
1.1.3 Acción nutracéutica del ácido elágico 9
1.1.4 Ácido elágico en frutillas 12
1.2 FRUTILLA 14
1.2.1 Composición y características de la frutilla 14
1.2.2 Variedades de frutilla cultivadas en la zona de Coronda (Provincia de Santa Fe) ... 17
1.2.3 Cultivo, cosecha, postcosecha y comercialización 18
1.2.4 Factores que afectan la calidad de las frutillas enteras durante las etapas de pre y postcosecha 20
1.3 FRUTAS MÍNIMAMENTE PROCESADAS. CALIDAD 24
1.4 ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS PROCESADAS 29

2 MATERIALES Y MÉTODOS
2.1 EXPERIENCIAS REALIZADAS 31
2.1.1 Determinación del contenido de ácido elágico en frutas de consumo masivo 31

2.1.2 Determinación del contenido de ácido elágico en frutillas en función de distintas variedades y el grado de madurez 31
2.1.3 Determinación del contenido de ácido elágico en frutillas en función del tipo de presentación y del tiempo de almacenamiento 31
2.1.4 Determinación del contenido de ácido elágico en frutillas enteras y mínimamente procesadas 32
2.1.5 Determinación del contenido de ácido elágico en frutillas mínimamente procesadas tratadas con una solución antioxidante 32
2.1.6 Evaluación de interferencias en la reacción de Wilson-Hagerman por efecto del tratamiento con una solución antioxidante 32
2.2 MATERIA PRIMA 32
2.2.1 Frutas de consumo masivo 32
2.2.2 Frutillas 32
2.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS 35
2.4 DETERMINACIÓN DE ACIDO ELÁGICO 35
2.4.1 Elección y justificación de la técnica para la determinación de ácido elágico 35
2.4.2 Fundamento del método de Wilson-Hagerman 36
2.4.3 Técnica de Wilson-Hagerman 40
2.4.4 Puesta a punto de la técnica experimental 43
2.5 ANÁLISIS COMPLEMENTARIOS 46
2.5.1 pH 46
2.5.2 Sólidos solubles 46
2.5.3 Sólidos secos 46
2.5.4 Pérdida de peso 46
2.5.5 Color 46
2.5.6 Aroma y *off- odors* 47
2.6 MATERIAL DE VIDRIO UTILIZADO EN LA TÉCNICA 48
2.7 ENVASES Y PELÍCULAS USADOS EN LAS EXPERIENCIAS DE CONSERVACIÓN 48
2.8 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN GASEOSA EN EL ENVASE 48
2.9 SOLUCIÓN DE LAVADO CLORADA 49
2.10 SOLUCIÓN ANTIOXIDANTE 49
2.11 PROCEDIMIENTOS 50
2.11.1 Contenido de ácido elágico en frutas de consumo masivo 50

2.11.2 Contenido de ácido elágico en frutillas en función de distintas variedades y el grado de madurez 50
2.11.3 Efecto del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento sobre el contenido de ácido elágico en frutillas 50
2.11.4 Efecto del lavado sobre el contenido de ácido elágico en frutillas enteras y mínimamente procesadas 52
2.11.5 Efecto del tratamiento con una solución antioxidante sobre el contenido de ácido elágico en frutillas mínimamente procesadas 52
2.11.6 Evaluación de interferencias en la reacción de Wilson-Hagerman por efecto del tratamiento con una solución antioxidante 53

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS SOBRE LA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA DE WILSON-HAGERMAN 55
3.1.1 Parámetros de validación del método 55
3.1.2 Determinación de los tiempos de cada etapa de la técnica 63
3.2 CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTAS DE CONSUMO MASIVO 66
3.3 CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS SEGÚN EL TIPO DE MUESTRA A UTILIZAR 68
3.4 CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS EN FUNCIÓN DE DISTINTAS LAS VARIEDADES Y EL GRADO DE MADUREZ 70
3.5 VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS VARIEDAD CAMAROSA EN DISTINTOS AÑOS DE COSECHA 76
3.6 CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PRESENTACIÓN Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO 77
3.7 CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS EN FUNCIÓN DEL CORTE Y LAVADO 101
3.8 CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS MÍNIMAMENTE PROCESADAS EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO CON UNA SOLUCIÓN ANTIOXIDANTE 111
3.9 EVALUACIÓN DE INTERFERENCIAS EN LA REACCIÓN DE WILSON-HAGERMAN POR EFECTO DEL TRATAMIENTO CON UNA SOLUCIÓN ANTIOXIDANTE 117

4. CONCLUSIONES 120

5. ANEXOS

Anexo A. Tablas de resultados experimentales 125

Anexo B. Figuras 163

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 167

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Composición química media de distintas variedades de frutilla 15

Tabla 2.1 Volúmenes necesarios de la solución patrón de 30 ppm para preparar la curva de calibrado..... 45

Tabla 3.1 Estimadores de linealidad de las curvas de calibrado correspondientes a la Tablas 5.1, 5.2 y 5.3 presentadas en el Anexo A. Modelo Y = bX + a..... 56

Tabla 3.2 ANOVA para el modelo lineal de las curvas de calibrado correspondientes a la Tablas 5.1, 5.2 y 5.3 presentadas en el Anexo A..... 57

Tabla 3.3 Determinaciones de ácido elágico a concentraciones ≤ 1.5 ppm..... 61

Tabla 3.4 Desviación estándar *vs* concentraciones ≤ 1.5 ppm..... 63

Tabla 3.5 Secuencias de trabajo ensayadas, con distintos tiempos de cada etapa, para la determinación de ácido elágico en frutillas..... 64

Tabla 3.6 ANOVA para el contenido de ácido elágico en frutillas según la secuencia de trabajo realizada..... 65

Tabla 3.7 Test de diferencia de medias para las distintas secuencias de trabajo..... 65

Tabla 3.8 Contenido de ácido elágico en frutas de consumo masivo..... 66

Tabla 3.9 ANOVA para el contenido de ácido elágico en diferentes frutas..... 67

Tabla 3.10 Test de diferencia de medias entre el contenido de ácido elágico en diferentes frutas..... 67

Tabla 3.11 Contenido de ácido elágico en frutilla según el tipo de muestra..... 69

Tabla 3.12 ANOVA para el contenido de ácido elágico en frutillas en función del tipo de muestra y grado de madurez..... 69

Tabla 3.13 Test de diferencia de medias del contenido de ácido elágico en frutillas para los distintos tipos de muestras a diferentes grado de madurez..... 70

Tabla 3.14 Valores promedio de ácido elágico para las distintas variedades y grados de madurez en frutillas..... 71

Tabla 3.15 ANOVA para el contenido de ácido elágico en frutillas según variedad y grado de madurez..... 72

Tabla 3.16 Test de diferencia de medias para las distintas variedades y grado de madurez..... 73

Tabla 3.17 Contenido promedio de ácido elágico teniendo en cuenta sólo las variedades, sin diferenciar entre frutillas verdes, intermedias o maduras.... 74

Tabla 3.18 Contenido de ácido elágico en frutillas en función del grado de madurez, considerando todas las variedades..... 74

Tabla 3.19 Valores promedio de sólidos solubles y pH para las distintas variedades y grados de madurez..... 75

Tabla 3.20 Contenido promedio de ácido elágico en frutillas verdes (inapropiadas para el consumo) y en frutillas con valor comestible (50 y 100 % color rojo) para las distintas variedades presentadas en orden decreciente..... 75

Tabla 3.21 Contenido promedio de ácido elágico en frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento..... 78

Tabla 3.22 ANOVA para el contenido de ácido elágico en frutillas en función del tipo de presentación, tiempo de almacenamiento y bloque..... 79

Tabla 3.23 Contenido de ácido elágico para las distintas presentaciones..... 81

Tabla 3.24 Contenido de ácido elágico en frutillas para los distintos días..... 81

Tabla 3.25 Contenido de ácido elágico en frutillas para los distintos bloques..... 82

Tabla 3.26 pH promedio de frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento..... 83

Tabla 3.27 Valores promedio de sólidos solubles en frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento..... 84

Tabla 3.28 ANOVA para los sólidos solubles en frutillas en función del tipo de presentación, tiempo de almacenamiento y bloque..... 84

Tabla 3.29 Sólidos solubles en frutillas para las distintas presentaciones..... 85

Tabla 3.30 Sólidos solubles en frutillas para los distintos días..... 85

Tabla 3.31 Sólidos solubles en frutillas para los distintos bloques..... 85

Tabla 3.32 Color de las frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento..... 87

Tabla 3.33 ANOVA para la claridad (L*) en frutillas en función del tipo de presentación, tiempo de almacenamiento y bloque 88
Tabla 3.34 Magnitud de L* en frutillas para las distintas presentaciones 88
Tabla 3.35 Magnitud de L* en frutillas para los distintos días 89
Tabla 3.36 Magnitud de L* en frutillas para los distintos bloques 89
Tabla 3.37 ANOVA para el ángulo de tono (Hue) en frutillas en función del tipo de presentación, tiempo de almacenamiento y bloque 90
Tabla 3.38 Magnitud de Hue en frutillas para las distintas presentaciones 90
Tabla 3.39 Magnitud de Hue en frutillas para los distintos bloques 91
Tabla 3.40 ANOVA para la saturación (Chroma) en frutillas en función del tipo de presentación, tiempo de almacenamiento y bloque 91
Tabla 3.41 Magnitud de Chroma en frutillas para las distintas presentaciones 92
Tabla 3.42 Magnitud de Chroma en frutillas para los distintos días 92
Tabla 3.43 Magnitud de Chroma en frutillas para los distintos bloques 93
Tabla 3.44 Pérdida de peso en frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento 94
Tabla 3.45 Aroma de frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento 95
Tabla 3.46 *Off*-odors en frutilla en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento 95
Tabla 3.47 Composición gaseosa promedio en los distintos envases 96
Tabla 3.48 ANOVA del % CO_2 en los envases en función del tipo de presentación, tiempo de almacenamiento y bloque 97
Tabla 3.49 % CO_2 en los envases para las distintas presentaciones 98
Tabla 3.50 % CO_2 en los envases para los distintos días 98
Tabla 3.51 % CO_2 en los envases para los distintos bloques 98
Tabla 3.52 ANOVA del % O_2 en los envases en función del tipo de presentación, tiempo de almacenamiento y bloque 99
Tabla 3.53 % O_2 en los envases para las distintas presentaciones 100
Tabla 3.54 % O_2 en los envases para los distintos días 100
Tabla 3.55 Contenido de ácido elágico en frutillas en función del corte y tipo de lavado 104
Tabla 3.56 ANOVA para el contenido de ácido elágico en frutillas en función del corte

y tipo de lavado 105
Tabla 3.57 Contenido de ácido elágico en frutillas enteras y frutillas cortadas 105
Tabla 3.58 Contenido de ácido elágico en frutillas en función de los distintos tipos de lavado 106
Tabla 3.59 Contenido de ácido elágico en frutillas en función de los distintos bloques. 106
Tabla 3.60 Sólidos solubles y pH promedio de frutillas en función del corte y tipo de lavado 108
Tabla 3.61 ANOVA para el contenido de sólidos solubles en frutillas en función del corte y tipo de lavado 109
Tabla 3.62 Sólidos solubles en frutillas en función del corte 109
Tabla 3.63 Sólidos solubles en frutillas en función del lavado 109
Tabla 3.64 Sólidos solubles en frutillas en función de los distintos bloques 110
Tabla 3.65 Contenido de ácido elágico promedio en frutillas en función del lavado y el tratamiento con una solución antioxidante 112
Tabla 3.66 ANOVA para el contenido de ácido elágico en frutillas en función del lavado y el tratamiento con una solución antioxidante 112
Tabla 3.67 Test de diferencia de medias para el contenido de ácido elágico en frutillas cortadas en función los distintos tipos de lavado y tratamiento con una solución antioxidante 113
Tabla 3.68 Sólidos solubles en frutillas mínimamente procesadas en función de los distintos tipos de lavado y del tratamiento con una solución antioxidante 115
Tabla 3.69 ANOVA para el contenido de sólidos solubles en frutillas en función de los distintos tipos de lavado y del tratamiento con una solución antioxidante 116
Tabla 3.70 Test de diferencia de medias para los sólidos solubles en frutillas en función de los distintos tipos de lavado y del tratamiento con una solución antioxidante 116
Tabla 3.71 Contenido promedio de ácido elágico en bananas en función del tratamiento con una solución antioxidante 117
Tabla 5.1 Valores individuales de la curva de calibrado N°1 125
Tabla 5.2 Valores individuales de la curva de calibrado N°2 126
Tabla 5.3 Valores individuales de la curva de calibrado N°3 127
Tabla 5.4 Valores individuales para el cálculo de RSD para la concentración 15 ppm de las curvas de calibrado 1, 2 y 3 128

Tabla 5.5 Valores individuales para el cálculo de RSD del método para frutillas verdes y maduras 128
Tabla 5.6 Contenido de ácido elágico, con el ΔA y su correspondiente concentración obtenida de gráfica, para frutas de consumo masivo 129
Tabla 5.7 Contenido de ácido elágico para distintos grados de madurez en frutillas variedad Camarosa 131
Tabla 5.8 Contenido de ácido elágico para distintos grados de madurez en frutillas variedad Chandler 132
Tabla 5.9 Contenido de ácido elágico para distintos grados de madurez en frutillas variedad Sweet Charly 133
Tabla 5.10 Contenido de ácido elágico para distintos grados de madurez en frutillas variedad Oso Grande 134
Tabla 5.11 Contenido de ácido elágico para distintos grados de madurez en frutillas variedad Milsei 135
Tabla 5.12 Valores de sólidos solubles y pH para la variedad Camarosa en distintos grados de madurez 136
Tabla 5.13 Valores de sólidos solubles y pH para la variedad Chandler en distintos grados de madurez 136
Tabla 5.14 Valores de sólidos solubles y pH para la variedad Sweet Charly en distintos grados de madurez 137
Tabla 5.15 Valores de sólidos solubles y pH para la variedad Oso Grande en distintos grados de madurez 137
Tabla 5.16 Valores de sólidos solubles y pH para la variedad Milsei en distintos grados de madurez 138
Tabla 5.17 Contenido de ácido elágico en frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento 139
Tabla 5.18 pH de cada *pool* de frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento 140
Tabla 5.19 Sólidos solubles de cada *pool* de frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento 141
Tabla 5.20 Color en frutilla en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento para el bloque 1 142
Tabla 5.21 Color en frutilla en función del tipo de presentación y tiempo de

almacenamiento para el bloque 2 148
Tabla 5.22 Pérdida de peso en frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento 153
Tabla 5.23 Aroma de frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento 154
Tabla 5.24 *Off*-odors en frutilla en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento 155
Tabla 5.25 Composición gaseosa en los distintos envases en función del tiempo de almacenamiento 156
Tabla 5.26 Contenido de ácido elágico en frutillas en función del corte y tipo de lavado 157
Tabla 5.27 Contenido de ácido elágico en frutillas en función del lavado y el tratamiento con una solución antioxidante 161
Tabla 5.28 Contenido de ácido elágico en bananas en función del lavado y el tratamiento con una solución antioxidante 162

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Acción de bloqueo de ciertos fitoquímicos sobre la iniciación y promoción de determinados tipos de cáncer 5

Figura 1.2 Taninos hidrolizables 7

Figura 1.3 Estructura del ácido gálico y del ácido hexahidroxidifénico 8

Figura 1.4 Hidrólisis de los elagitaninos 9

Figura 2.1 Establecimiento productor de frutillas de Norma de Czerweny. Coronda. Provincia de Santa Fe 33

Figura 2.2 Frutillas de distintas variedades en tres grados de madurez diferentes: 0 % color rojo, 50 % color rojo y 100 % color rojo 34

Figura 2.3 Formación de ácido elágico a partir de elagitanino y reacción del ácido elágico con el electrófilo NO^+ 39

Figura 2.4 Procedimiento experimental. A: Tubos previo a la hidrólisis, B: Tubos luego de la hidrólisis y C: Reacción de color 41

Figura 2.5 Principales etapas de la técnica espectrofotométrica de Wilson-Hagerman 42

Figura 2.6 Medición de color 47

Figura 2.7 Presentaciones de muestras 50

Figura 2.8 Vista de la cestilla metálica (2) en el vaso de precipitado (1) usado en los lavados 51

Figura 3.1 Curva de calibrado para concentraciones bajas de analito ($\leq$ 1.5 ppm) 62

Figura 3.2 Porcentaje del aporte diario de ácido elágico de diferentes frutas 68

Figura 3.3 Variación del contenido de ácido elágico en frutillas variedad Camarosa (100 % color rojo) en distintos años de cosecha 76

Figura 3.4 Interacciones en el contenido de ácido elágico entre tiempo de almacenamiento, tipo de presentación y bloque. En A y B: 1. Sin acondicionar, 2. Envasadas en PVC, 3. Envasadas en PET. En C: 0, 2 y 7 son tiempos de almacenamiento en días..... 80
Figura 3.5 Porcentaje de conservación de ácido elágico en frutillas en función de la presentación y del tiempo de almacenamiento..... 82
Figura 3.6 Composición de la atmósfera en función de los dos tipos de envases empleados..... 97
Figura 3.7 Interacciones entre tipo de corte, tipo de lavado y bloque. En A y B: 1. Enteras, 2. Cortadas. En C: 1. Sin lavar, 2. Lavadas con agua destilada y 3. Lavadas con agua clorada..... 103
Figura 3.8 Porcentaje de conservación de ácido elágico en frutillas en función el corte y lavado..... 107
Figura 3.9 Interacción entre tipo de tratamiento y bloque. 1. Sin lavar, 2. Lavadas con agua destilada, 3. Lavadas con agua clorada y 4. Tratadas con solución antioxidante..... 113
Figura 3.10 Porcentaje de conservación de ácido elágico en frutillas cortadas en función de los tipos de lavado y del tratamiento con una solución antioxidante..... 114
Figura 5.1 Curva de calibrado N° 1..... 163
Figura 5.2 Curva de calibrado N° 2..... 164
Figura 5.3 Curva de calibrado N° 3..... 165

RESUMEN

Actualmente existe una especial atención en el rol que presentan sobre la salud, los alimentos funcionales o nutracéuticos, los que proveen un beneficio fisiológico adicional, más allá de los aportes nutricionales básicos conocidos.

Cuando estos compuestos tienen origen vegetal, reciben el nombre de fitoquímicos. Dentro de ellos, se encuentra el ácido elágico, un fuerte antioxidante con actividad anticancerígena y antimutagénica, que se encuentra principalmente en frutillas y frambuesas.

Los niveles de ácido elágico estarían influenciados por el cultivar, la especificidad tisular, el índice de madurez de la fruta, las prácticas agrícolas, los factores ambientales como la temperatura, amplitud del día y enfermedades fitopatógenas.

Existen muy pocos estudios sobre cómo afectan las distintas tecnologías al contenido de ácido elágico en frutillas.

En tal sentido, se ha observado una disminución del contenido de ácido elágico, al cabo del tiempo, en frutillas conservadas refrigeradas y en atmósferas de CO_2. Otros investigadores hallaron que el congelamiento en sí, no afecta el contenido de ácido elágico en frutillas. Sí influye el tiempo de almacenamiento de las frutillas congeladas. También determinaron que el contenido de ácido elágico en mermelada de frutillas recién preparada

disminuye respecto a la fruta fresca, probablemente porque las reacciones oxidativas lo afectan durante la cocción.

La presente Tesis tuvo como objetivo implementar y poner a punto la técnica para la determinación de ácido elágico y cuantificar dicho nutracéutico en frutillas de la zona de Coronda (Pcia. de Santa Fe), tanto como producto fresco sin procesar como mínimamente procesado.

La determinación de ácido elágico se realizó por la técnica espectrofotométrica de Wilson-Hagerman, con la que se obtuvo excelente linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad. También se realizaron análisis complementarios que permitieron evaluar la calidad global de las frutillas en las distintas experiencias.

Se realizó, primeramente, un relevamiento del contenido de ácido elágico en diversas frutas de consumo habitual, resultando ser muy superior el de la frutilla, respecto a las demás, con una contribución del 103 % del aporte diario recomendado, si se toma como base una ración de 300 g de fruta.

Se determinó el contenido de ácido elágico en diferentes variedades y en distintos grados de madurez (0 %, 50 % y 100 % color rojo), comprobándose que las verdes contienen más ácido elágico que las maduras, y dentro de las maduras las que presentaron los niveles más elevados fueron las variedades Camarosa, Chandler y Sweet Charly, con valores entre 0.42 y 0.50 mg de ácido elágico/g peso seco.

Se evaluó el contenido de ácido elágico en función de la presentación y del tiempo de almacenamiento. Se determinó que el mínimo procesamiento afecta la calidad nutracéutica y sensorial de las frutillas. Por ello se estudió el efecto del corte y del lavado sobre este nutracéutico, observándose que estas operaciones también provocan una disminución de la calidad de las frutillas, siendo mayor la pérdida cuando se empleó agua clorada, pues al efecto de lixiviación de los lavados se sumó la acción oxidante.

Cuando se estudió el efecto de una solución antioxidante de ácido ascórbico y ácido cítrico, en las frutillas mínimamente procesadas, se detectó una acción protectora sobre el ácido elágico. Lo mismo ocurrió con los sólidos solubles, que si bien sufren cierto grado de lixiviación, son protegidos de la oxidación. Por lo que se sugiere que el tratamiento con esta solución antioxidante mejora la calidad nutracéutica y conserva la calidad sensorial de las frutillas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS PRINCIPALES

Los objetivos principales de la presente Tesis se orientan hacia la implementación y puesta a punto de la técnica para la determinación de ácido elágico y la cuantificación de dicho nutracéutico en frutillas, tanto como producto fresco sin procesar como mínimamente procesado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Respecto a la técnica espectrofotométrica de Wilson – Hagerman

Validar, con la determinación de parámetros estadísticos adecuados, el método de análisis usado, estudiando además los tiempos de las distintas etapas de la técnica y la posible existencia de interferencias.

Respecto al ácido elágico en frutillas

Valorar el contenido de ácido elágico frente a otras frutas de consumo masivo.

Estudiar comparativamente el contenido de ácido elágico en muestras con y sin semillas.

Cuantificar el ácido elágico en frutillas enteras en función de las distintas variedades cultivadas en la zona de Coronda (Pcia. de Santa Fe), grados de madurez y épocas de cosecha.

Evaluar la preservación del ácido elágico en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento en cámara refrigerada.

Valorar en frutillas mínimamente procesadas la influencia de las operaciones de corte, lavado y tratamiento con solución antioxidante, sobre la conservación del nutracéutico en cuestión.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1 ÁCIDO ELÁGICO

1.1.1 Características generales de los fitoquímicos con valor nutracéutico

El dogma "Deja que el alimento sea tu medicina y que la medicina sea tu alimento", establecido por Hipócrates hace aproximadamente 2500 años, está recibiendo un renovado interés (Hasler, 1998; Sloan, 1999; Christopher, 2000). En particular, hay un aumento de atención por parte del consumidor respecto al rol que presentan sobre la salud, ciertos alimentos específicos o fisiológicamente activos, llamados también **alimentos funcionales**. En realidad, todos los alimentos son funcionales, pues ellos proveen sabor, aroma o valor nutritivo. Sin embargo, en la última década el término funcional, aplicado a los alimentos, ha adoptado una connotación diferente, que es proveer un beneficio fisiológico *adicional*, más allá de los beneficios nutricionales básicos conocidos (Hasler, 1998).

El término alimentos funcionales fue primero introducido en Japón a mediado de los años 80 y se refiere a alimentos procesados que además de ser nutritivos, contienen ingredientes que agregan una función física específica. Japón es el único país que tiene una regulación específica para este tipo de alimentos, denominados FOSHU (Foods For Specified

Health Use). En Estados Unidos, el Institute of Medicine's Food and Nutrition Board, define a los alimentos funcionales como "cualquier alimento o ingrediente de alimentos que pueda proporcionar un beneficio a la salud más allá de los nutrientes tradicionales que contiene". Estos alimentos funcionales o **nutracéuticos** (Witwer, 1999) pueden tener origen animal (pescado, productos lácteos, etc.) o vegetal, en cuyo caso el compuesto biológicamente activo recibe el nombre de **fitoquímico** (Hasler, 1998).

Los fitoquímicos les dan a los vegetales el color, aroma, sabor, y además, los protege contra enfermedades. En los últimos años, los científicos han descubierto que muchos de estos químicos vegetales protegen también al cuerpo humano contra enfermedades (Applegate, 1999; Ancos *et al.*, 2000), pues formarían parte de su "arsenal de defensa" (Dao, 1996). Numerosos estudios han encontrado que comiendo grandes cantidades de frutas y vegetales, se reduce el riesgo de ataques cardíacos, de la mayoría de los tipos de cáncer y de la degeneración macular (la principal causa de ceguera entre la gente de edad). Por ello, es que en la actualidad están siendo investigadas cientos de este tipo de sustancias para conocer el rol que cumplen en la prevención del cáncer y de otras enfermedades degenerativas (Buscher, 1999; Caragay, 1992; Dao, 1996; Prior *et al.*, 1998).

Dentro de los fitoquímicos se encuentran los flavonoides, que reducirían el colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (LDL); los isocianatos, que protegen contra el cáncer a través de su efecto sobre determinadas enzimas y se encuentran en las crucíferas como el brócoli; las saponinas, que se encuentran en las legumbres y previenen la multiplicación de las células cancerosas por acción sobre el material genético de la célula; los terpenos, en los citrus, que causan regresión del cáncer pancreático y de tumores mamarios en animales de laboratorio; los alil sulfuros, presentes en cebolla y ajo, que incrementan enzimas que afectan sustancias causantes de cáncer y ayudan al organismo a deshacerse de ellas; los indoles, en las crucíferas, que estimulan enzimas reduciendo posiblemente el riesgo de padecer cáncer de mama; el licopeno en el tomate, que previene el cáncer de próstata; el ácido elágico en frutillas, que reduce el daño genético causado por carcinógenos como el humo del tabaco o la polución ambiental, etc. (Dao, 1996; Stansbury, 1998; Anónimo, 1999a; Anónimo, 2001).

Muchos fitoquímicos actúan como poderosos antioxidantes, protegiendo a las células y al organismo del daño causado por los radicales libres. Los radicales libres son moléculas oxigenadas tóxicas producidas por el humo del tabaco, los rayos X, la polución ambiental, la luz solar, y también surgen como productos propios de nuestro metabolismo. Ellos son

capaces de oxidar otras moléculas causando la destrucción y envejecimiento de las células (Buscher, 1999). Se ha demostrado que las frutas y hortalizas, además de las bien conocidas vitamina C y vitamina E, o los carotenoides, poseen otros nutrientes antioxidantes que contribuyen de manera significativa a su capacidad antioxidante total (Prior *et al.*, 1998). Es el caso de los compuestos fenólicos y las antocianinas, que presentan una fuerte correlación con la capacidad antioxidante de muchas frutas, como la frutilla (Kalt *et al.*, 1999).

Recientemente, a través de distintos campos de la ciencia, como la epidemiología, la medicina y la nutrición, se encontraron evidencias de que los antioxidantes presentes en frutas y verduras juegan un rol importante en la reducción del riesgo de padecer alguna enfermedad degenerativa. El ácido ascórbico ha sido muy bien estudiado en su rol como antioxidante. Actualmente han adquirido significancia como antioxidantes dietarios los compuestos fenólicos. Por lo tanto, se estudia su capacidad antioxidante, su contribución en la dieta, si reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, y su estabilidad en relación a la del ácido ascórbico (Kalt *et al.*, 1999).

Investigadores de Estados Unidos y Alemania que revisaron más de 200 dietas humanas alrededor del mundo, encontraron evidencias consistentes con respecto a que las personas que consumen frutas y verduras en mayor escala tienen menor riesgo de desarrollar un amplio rango de cánceres, comparado con quienes consumen pocas frutas y verduras (Webb y Yeykal, 1998; Hasler, 1998).

Mientras los científicos aún no han determinado todos los aspectos sobre el desarrollo del cáncer, se sabe que el crecimiento tumoral presenta dos etapas críticas: iniciación y promoción. Un carcinógeno puede "iniciar" o alterar una célula, haciéndola susceptible al crecimiento canceroso. Este crecimiento no ocurre, sin embargo, hasta que uno de muchos factores, llamados "promotores", actúa sobre la célula alterada. En el cáncer de mama, la causa más común de mortalidad en mujeres, estos factores "promotores" incluyen el daño oxidativo, la acción de hormonas esteroides, y la acción de ciertas clases de prostaglandinas (PGS). En la Figura 1.1 se ilustra, en un esquema muy simplificado, cómo y en qué fase pueden actuar ciertos fitoquímicos para bloquear el proceso de promoción del cáncer, combatiendo los efectos de ciertos carcinógenos, iniciadores y promotores (Caragay, 1992).

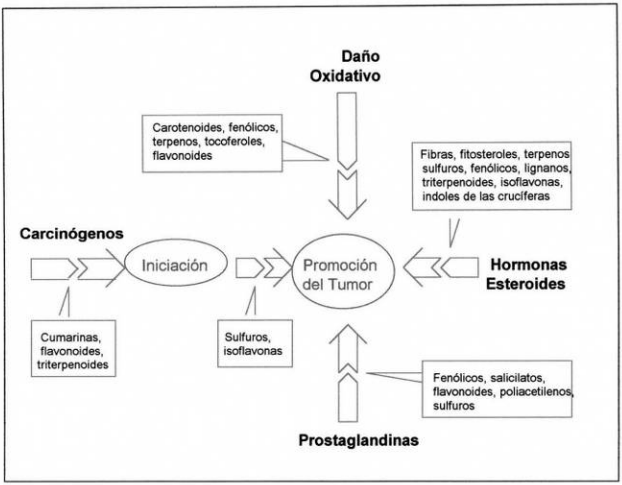


Figura 1.1 Acción de bloqueo de ciertos fitoquímicos sobre la iniciación y promoción de determinados tipos de cáncer

El futuro realmente está en el área de "alimentos como medicina", donde las personas buscarán los alimentos que les ayuden a prevenir distintas enfermedades (Sloan, 1999; Hasler, 1998). Cada día están siendo descubiertos más nutracéuticos, con un amplio rango de beneficios para la salud. Los vegetales completos contienen decenas o centenas de diferentes fitoquímicos que son la base de una dieta saludable. Para una salud óptima, se debería comer al menos 5 a 9 porciones diarias de frutas y vegetales, como así también 3 a 6 porciones diarias de cereales, incluyendo regularmente a la soja (Cedar, 1999). Al ser los nutracéuticos sustancias naturales que se consumen en los alimentos, no manifiestan efectos colaterales negativos, como sí lo presentan frecuentemente numerosas preparaciones medicinales (Anónimo, 1999b; Applegate, 1999).

Dada la importancia de los nutracéuticos, el USDA (United State Department of Agriculture) encaró un programa en el que científicos de diferentes centros de investigación estudiarán la presencia de los mismos en los 100 alimentos más consumidos de Estados Unidos (Anónimo, 2001).

1.1.2 Naturaleza química del ácido elágico

El fitoquímico de interés en este trabajo, el ácido elágico, se encuentra en la naturaleza como elagitanino, que junto a los galotaninos pertenece al grupo de los taninos hidrolizables.

El término tanino se refiere a un amplio grupo de compuestos (poli)fenólicos presentes en plantas, que desde tiempos ancestrales han sido utilizados para preservar cueros y hacerlos resistentes al agua. Las plantas poseen este tipo de compuestos que actúan como poderosos mecanismos de defensa contra predadores y aún sobre muchos patógenos (Cannas, 1998).

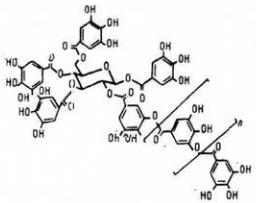
No existe una definición rigurosa de tanino (Fenema, 1996), pero para ser clasificado como tal, al menos 3 grupos -OH de la glucosa deben estar esterificados para exhibir una capacidad de enlace suficientemente fuerte. La definición dada por Horvath (1981) considera como tanino a "cualquier compuesto fenólico de suficiente peso molecular conteniendo suficientes hidroxilos y otros grupos apropiados (por ejemplo carboxilos) para formar complejos efectivamente fuertes con proteínas y otras macromoléculas bajo condiciones ambientales particulares" (Cannas, 1998).

Los taninos están localizados en las vacuolas o en la superficie cerosa de los vegetales y no interfieren con el metabolismo. Sólo cuando la célula se rompe y muere, ellos pueden actuar y tener efectos metabólicos.

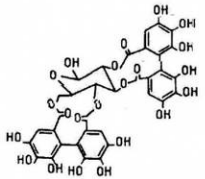
Los polifenoles, clase a la que pertenecen los taninos, comprenden una de las tres grandes categorías de metabolitos secundarios de las plantas (Sambandam, 1997), junto a compuestos que contienen nitrógeno (amidas, aminas, etc.) y los terpenoides.

Todos los compuestos fenólicos (primarios o secundarios) se forman, de una forma u otra, vía "el camino del ácido shikímico", también conocida como "el camino del ácido fenilpropanoico". El ácido gálico deriva del ácido quínico. Este camino conduce a la formación de otros fenólicos como las isoflavonas, cumarina, lignina y aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina y tirosina) (Cannas, 1998).

Los taninos presentan color amarillo a marrón y contribuyen a la astringencia de ciertos alimentos, como el té. Las dos principales categorías de taninos que impactan en la nutrición son los taninos hidrolizables y los taninos condensados (Fenema, 1996), identificados más corrientemente como proantocianidinas, que son resistentes a la degradación hidrolítica. Estos compuestos forman complejos tanino-proteína. Las proteínas así ligadas, generalmente son resistentes a los ataques producidos por proteasas y por lo tanto no quedan disponibles nutritivamente para el hígado. Sin embargo, los taninos hidrolizables no tendrían este efecto nocivo sobre la digestión de las proteínas porque este tipo de tanino se hidroliza en el ambiente gástrico ácido y libera a las proteínas de dicho enlace (Cannas, 1998).



Galotanino



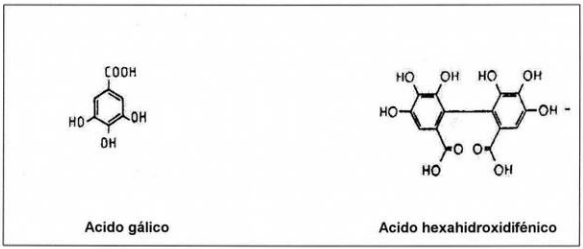
Elagitanino

Figura 1.2 Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables, que son mucho menos comunes en la naturaleza que los taninos condensados, son polifenoles con un polialcohol (muchos grupos -OH) como corazón central (Arcuri, 1999). Generalmente esa molécula de polialcohol es la D-glucosa. En los taninos hidrolizables los grupos -OH están parcial o totalmente esterificados con grupos fenólicos (3 como mínimo). Si esos grupos fenólicos son ácido gálico, el tanino hidrolizable será un galotanino, y si el grupo es un ácido elágico será un elagitanino (Fig. 1.2) (Sambandam, 1997). Algunos autores definen dos clases adicionales de taninos hidrolizables,

los taragalotaninos (con ácido gálico y ácido quínico como corazón) y los cafetaninos (ácido cafeico y ácido quínico) (Cannas, 1998).

Los taninos elágicos son mucho más frecuentes que los gálicos. Los elagitaninos son formados a partir de ésteres del ácido hexahidroxidifénico, y es probable que el sistema bifenílico del ácido hexahidroxidifénico sea el resultado del acoplamiento oxidativo de dos ácidos gálicos vecinos (Fig. 1.3). Los elagitaninos presentan acoplada al menos una unidad de ácido hexahidroxidifénico. El peso molecular oscila entre 2000 y 5000. Son hidrolizados por ácidos débiles o bases débiles, dando carbohidrato y ácidos fenólicos. También son hidrolizados por enzimas (tanasa). Muchos miembros de este grupo (ácido chebulágico, agriminiin A, coriariin A, gemin A y pedunculagin) muestran interacciones específicas con objetivos biológicos de interés medicinal (Sahasrabudhe, 1997; Itoh *et al.*, 1998).



Acido gálico **Acido hexahidroxidifénico**

Figura 1.3 Estructura del ácido gálico y del ácido hexahidroxidifénico

La hidrólisis de los elagitaninos (solubles en solventes acuosos) produce ácido hexahidroxidifénico (HHDP), el cual espontáneamente lactoniza a ácido elágico (insoluble en solventes acuosos) (Wilson y Hagerman, 1990) (Fig. 1.4).

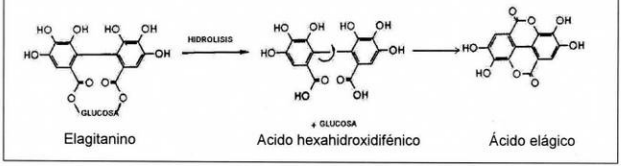


Figura 1.4 Hidrólisis de los elagitaninos

1.1.3 Acción nutracéutica del ácido elágico

El ácido elágico, producto de la hidrólisis de los elagitaninos, se encuentra en muchas frutas, principalmente frutillas y frambuesas (Lin y Vine, 1990). El interés en este fenólico natural radica en su actividad como anticancerígeno y antimutagénico.

Estudios realizados por el Hollings Cancer Center (Medical University of South Carolina), corroboraron lo que otros investigadores observaron en animales de laboratorio: el ácido elágico, compuesto fenólico natural presente en altas concentraciones en frutillas y frambuesas, sería un potente camino para prevenir el cáncer, inhibir el crecimiento de células cancerosas y detener la aparición de cáncer en personas con una predisposición genética a dicha enfermedad, porque remueve la señal sobre el DNA que provoca que el cáncer ataque y comience a desarrollarse (Maas *et al.*, 1991a; Wang *et al.*, 1994; Smith, 1997; Ancos *et al.*, 2000; Anónimo, 2000). Los científicos indicaron que el ácido elágico disminuye el crecimiento de células anormales del colon en humanos, previene el desarrollo de células infectadas con el papilomavirus humano (HPV) que está asociado al cáncer cervical, y promueve la apoptosis (muerte natural) de células de cáncer de próstata. El proceso de apoptosis por él accionado también tiene efectos beneficiosos sobre el cáncer de mama, pulmón, esófago y de piel (melanoma) (Bennett, 1999).

El ácido elágico es un fuerte antioxidante (Maas *et al.*, 1991a; Anónimo, 2000) que ayuda a barrer radicales libres, que dañan los lípidos de membrana y producen tumores. El ácido elágico ha probado tener más de un mecanismo de acción, probablemente como recolector de especies oxigenadas producidas por tratamientos con peróxido de hidrógeno y como un protector de la doble hélice de DNA de la injuria de agentes alcalinizantes (Cozzi *et al.*, 1995).

La inhibición del cáncer por acción del ácido elágico parece ocurrir por los siguientes mecanismos:

•Inhibición de la activación metabólica de los carcinógenos: inhibe la conversión de hidrocarburos aromáticos policíclicos (benzo(*a*)pireno, 7,12-dimetilbence(*a*)antraceno, y 3-metilcolantreno), compuestos nitrosados (N-nitrosobencilmetilamina y N-metil-N-nitrosourea), y aflatoxina B_1 a formas que inducen daño genético (Maas *et al.*, 1991a; Khanduja *et al.*, 1999).

•Desintoxicación de carcinógenos por estimulación de enzimas (ej. glutation s-transferasa), la actividad se incrementa hacia los sustratos 4,5-oxidobenzo(*a*)pireno y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno en ratas (Barch *et al.*, 1996; Maas *et al.*, 1991a).

•Unión a formas metabólicamente reactivas para formar complejos inofensivos que son incapaces de reaccionar con el DNA celular, es decir actúa como removedor. El ácido elágico reacciona con el diolepoxibenzo(*a*)pireno por tener una posición estéricamente favorable, formando un producto por enlace covalente en el cual el anillo epoxi reactivo del pireno se cierra, convirtiendo al carcinógeno en inofensivo (Maas *et al.*, 1991a; Vance, 1998).

•Ocupando sitios en el DNA que de otra manera reaccionarían con carcinógenos o sus metabolitos. El ácido elágico inhibió el enlace de la N-metil-N-nitrosourea al DNA de esperma de salmón por reacción con la posición O^6 en la guanina y previno la metilación de dicho sitio (Barch *et al.*, 1996; Maas *et al.*, 1991a).

Investigadores de Chicago (Department of Medicine, Lakeside Veterans Affairs Medical Center, Northwestern University Medical School y University Lurie Cancer Center) y de Ohio (Department of Preventive Medicine) que estudian la carcinogénesis química y el rol que cumplen distintos factores presentes en la dieta, relacionaron la estructura química del ácido elágico con las distintas actividades anticancerígenas que presenta. Para ello, sintetizaron químicos análogos a la molécula de ácido elágico y examinaron la relación entre los grupos hidroxilo y los grupos lactona de la molécula con las diversas acciones que presenta. Estos estudios demostraron que los grupos 3-hidroxilo y 4-hidroxilo son requeridos para desintoxicar a través de enzimas. En cambio, los grupos lactona son necesarios para reducir la formación del carcinógeno O^6-metilguanina, porque se une al DNA y previene el acoplamiento a la posición O^6 de la guanina. Por lo tanto, diferentes porciones de la molécula de ácido elágico son responsables de sus distintas actividades anticancerígenas (Barch *et al.*, 1996; Constantinou *et al.*,1995).

El Dr. Gary Stoner del James Cancer Institute (Ohio State University), dirige investigaciones en las que utiliza nutracéuticos para la prevención de ciertos tipos de cáncer. Así logró, empleando como alimento frutillas liofilizadas, prevenir el cáncer de esófago en un 60 % de ratas tratadas con sustancias cancerígenas (Funt *et al.*, 1997) e incluso inhibir el número y tamaño de tumores de esófago ya existentes (Smith, 1997; Funt *et al.*, 2000).

El ácido elágico y muchos elagitaninos han mostrado tener propiedades inhibitorias contra la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Itoh *et al.*, 1998; Anónimo, 2000) y del virus de la mieloblastosis de aves. El ácido elágico, a diferencia de algunos antibióticos como el Colistin o la Enduracidina A, inhibe inespecíficamente a las polimerasas del DNA. La actividad antiviral de muchos elagitaninos puede deberse a que producen la inhibición de la absorción de HIV a la célula, como así también porque producen la inhibición de la actividad de la transcriptasa reversa. Algunos estudios realizados en ratones sugieren que el elagitanino oenoterina B puede ser usado efectivamente por administración oral para la inhibición del HIV y del herpes virus (Maas *et al.*, 1991a).

Se encontró también que el ácido elágico controla hemorragias en animales y en humanos (Anónimo, 2000). Promueve la coagulación activando el factor Hageman (factor XII) de la sangre. Es ampliamente usado en investigaciones sanguíneas que estudian los factores que afectan la coagulación o trombosis. Según nuevos estudios en roedores, también presenta algunos efectos sedativos (Maas *et al.*, 1991a).

Médicos europeos encontraron recientemente que el ácido elágico reduce la incidencia de defectos de nacimiento, promueve la cicatrización de heridas, reduce y revierte la fibrosis hepática inducida químicamente, y es una ayuda en la lucha contra enfermedades cardíacas (Bennett, 1999).

Para estudiar la acción antimutagénica del ácido elágico se realizaron ensayos con una microsuspensión de Salmonella expuesta a un potente mutágeno, la aflatoxina B_1. Los resultados obtenidos demostraron que el ácido elágico inhibe la acción de la aflatoxina B_1 (Loarca-Pina *et al.*, 1998).

Las nuevas evidencias clínicas sugieren que se puede obtener una concentración de ácido elágico en tejidos, como el cervical, con la administración oral de frambuesas. Se estudió la biodisponibilidad de este importante fitoquímico con la ayuda de voluntarias que ingirieron diariamente puré de frambuesas. El trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Daniel Nixon, presidente de la American Health Foundation, y de los Dres. Dave Gangemi y Blair

Holliday del Hollings Cancer Center (Medical University of South Carolina). La investigación se basó en la evaluación de mujeres con células escamosas atípicas de indeterminada significancia (ASCUS), para las cuales no hay ni tratamiento ni evaluación clínica disponible. Esos casos representan alrededor del 10 % de todos los Papanicolaou realizados en Estados Unidos y comprenden aproximadamente 5 millones de mujeres. En esta población, las mujeres que están infectadas con el papilomavirus humano (HPV) tipo 16 y/o 18 (1 millón estimativamente), tienen un gran riesgo de desarrollar cáncer cervical en algún momento de sus vidas (Petek, 1999a).

Se estableció que una dieta diaria de 150 g de frambuesas, las cuales contienen aproximadamente 1.50 mg/g peso seco, previene el desarrollo de células cancerosas. Se recomienda además, consumir alimentos completos y no ácido elágico sintético, ya que este compuesto puede ocasionar efectos secundarios como por ejemplo hipertensión. Por el contrario, cuando el compuesto está naturalmente presente en la fruta, el tracto digestivo lo absorbe sin ningún efecto colateral (Petek, 1999b). Esto ratifica lo expresado por otros investigadores: cantidades relativamente pequeñas de elagitanino, tal como se encuentra el ácido elágico en las frutas, es más efectivo en la dieta humana que grandes dosis de ácido elágico (Wang *et al.*, 1994; Stanley, 1997).

1.1.4 Ácido elágico en frutillas

Las frutillas presentan una gran capacidad antioxidante debido a la presencia de ácido ascórbico, antocianinas y de compuestos fenólicos (Prior *et al.*, 1998; Kalt *et al.*, 1999), donde el principal es el ácido elágico, pues representa aproximadamente un 51% del total (Häkkinen *et al.*, 1998; Häkkinen *et al.*, 1999; Häkkinen *et al.*, 2000). El ácido elágico funciona como un sustrato oxidativo protegiendo de la oxidación a otros constituyentes de la planta. También actúa como antioxidante exógeno, pues previene la oxidación de aceites comestibles, grasas, metiloleato, manteca de cerdo y soja. Su rendimiento es tan bueno o mejor que el del α-tocoferol o el *t*-butilanisol (Maas *et al.*, 1991a).

El ácido elágico, como muchos compuestos fenólicos presentes en el tejido vegetal, está estrechamente asociado con la resistencia de las plantas a enfermedades. Presenta además, una acción fungistática, pues rompería la membrana fúngica, atacaría y polimerizaría moléculas dentro de la pared de las hifas, reduciendo la plasticidad del hongo para crecer. También podría inactivar ciertas enzimas suprimiendo la producción de toxinas por parte de

microorganismos fitopatógenos. Se comprobó que el contenido de ácido elágico en hojas de frambuesas infectadas con roya naranja aumentó 3 veces con respecto al de hojas sanas (Maas *et al.*, 1991a).

El ácido elágico intervendría también en la regulación hormonal de las frutillas. Se vio que si se fuerza la fotosíntesis aumentando el período de luz, aumenta la producción de polifenoles, mientras que si la iluminación es baja o hay ausencia de ella, se favorece la degradación de los polifenoles y la síntesis de monofenoles como parte integral del sistema regulatorio indol-ácido acético. Sería también un inhibidor endógeno del crecimiento de insectos que atacan a las plantas (Maas *et al.*, 1991a).

Maas *et al.* (1991b) y Wang *et al.* (1994) encontraron que en las plantas de frutillas, la mayor cantidad de ácido elágico se encuentra en las hojas. Las semillas, en general, contendrían más ácido elágico que la pulpa de la fruta, y la pulpa de frutillas verdes contendría más que la pulpa de frutas rojas, maduras, lo que significaría que durante el *"ripening"* (maduración organoléptica), por los procesos fisiológicos que ocurren, el compuesto de interés disminuiría. También encontraron que la cantidad presente difería notablemente entre las distintas variedades.

Estos investigadores informaron que la pulpa de frutilla madura contenía de 0,43 a 4,64 mg/g de peso seco (media 1,5 mg/g de peso seco) medido en 35 variedades y 15 clones, mientras que la pulpa de fruta verde varió entre 1,32 y 8,43 mg/g de peso seco (media 3,36 mg/g de peso seco) (Maas *et al.*, 1991b).

Wang *et al.* (1998), también sugieren que los niveles de ácido elágico en plantas de frutillas y otras frutas estaría influenciado por el cultivar, la especificidad tisular, el índice de madurez de la fruta, factores ambientales como la temperatura, amplitud del día y enfermedades fitopatógenas. Estudios recientes determinaron que también lo puede afectar el empleo de diferentes tipos de *"mulching"* (cobertura plástica usada para cubrir el lomo en el campo).

1.2 FRUTILLA

1.2.1 Composición y características de la frutilla

La frutilla pertenece a la familia de las Rosáceas y su género es Fragaria, que en latín significa "fragancia". Es autóctona de los hemisferios norte y sur. La primera mención de ella en la literatura data del período comprendido entre 234-148 AC en escritos de Cato, un senador romano. Las primeras descripciones publicadas fueron mayormente por sus usos como planta medicinal y no por sus beneficios como fruta (Anónimo, 1999b).

Se cultiva en nuestro país desde la época colonial, en las quintas vecinas a la ciudad de Buenos Aires. A partir de 1935 fue creciendo la producción en Coronda, provincia de Santa Fe. Esta producción prácticamente llegó a monopolizar el abastecimiento nacional de frutilla para la industria y mercado fresco (Scaglia *et al.*, 1995).

La frutilla puede ser cultivada en una amplia diversidad de situaciones climáticas. No obstante, el clima tiene una preponderante influencia en su productividad, ya que responde en forma diferente a combinaciones específicas de temperatura y de longitud del día (fotoperíodo) (Scaglia *et al.*, 1995).

Las condiciones climáticas influyen también sobre el sabor y la firmeza de los frutos. En zonas de días soleados y noches frescas, los frutos son de mejor sabor que en zonas de días nublados y húmedos y noches templadas. Las temperaturas altas favorecen la formación de frutos de poca firmeza, lo cual puede ser un grave problema cuando el centro de consumo se encuentra a grandes distancias (Scaglia *et al.*, 1995).

Los factores que constituyen la base de la calidad en las frutillas son la resistencia de la pulpa, las características organolépticas, colores brillantes y atractivos, el aspecto general y el tamaño uniforme. Los trabajos de mejora genética indican que resulta difícil asociar en un mismo material consistencia y sabor (Namesny, 1999).

TABLA 1.1

Composición química media de distintas variedades de frutilla

Contenido por 100 g de fruta	
Valor energético	40.00 calorías
Proteínas	0.90 g
Grasas	0.50 g
Carbohidratos	13.00 g
Calcio	21.00 mg
Fósforo	21.00 mg
Potasio	164.00 mg
Sodio	1.00 mg
Hierro	1.00 mg
Vitamina A	100.00 U.I.
Vitamina B_1	0.03 mg
Vitamina B_2	0.07 mg
Vitamina B_5	0.90 mg
Vitamina C	90.00 mg

Fuente: FAO. Datos suministrados por Olías *et al.* (1995).

El consumo de frutilla como producto fresco o como alimento procesado en forma de confitura, mermelada y helado ha experimentado una rápida difusión en los últimos años, dejando de ser una fruta reservada a mercados minoritarios. Entre las causas impulsoras de este incremento del consumo podemos destacar aspectos intrínsecos del fruto y aspectos psicológicos del consumidor. Dentro del primer apartado se incluyen su delicado sabor y aroma, su valor nutritivo (Tabla 1.1), en el que se destacan su elevado contenido en vitamina C, superior al de los cítricos, y su alto contenido en ácido elágico, de gran interés por sus propiedades anticarcinogénicas. Por último, habría que destacar su pequeño tamaño, que hace de la frutilla una fruta con posibilidades muy variadas de preparación y distribución

familiar. Entre los aspectos psicológicos que parecen inducir al consumo de la frutilla se destaca su estacionalidad o disponibilidad limitada, que le confiere un mayor atractivo al producto y la hacen más deseable que las frutas a las que se tiene acceso todo el año. Además, la aparición de la frutilla en los mercados marca el final de la monotonía invernal y se identifica con la llegada inminente de la primavera. Por último, si tuviésemos que elegir una sola característica del fruto como principal atractivo para el consumidor tendríamos que destacar el aspecto estético, la apariencia externa de la frutilla que hace de ella una fruta tentadora y apetecible (Olías *et al.*, 1995).

Los principales pigmentos, responsables del color de las frutillas son la clorofila y las antocianinas. Durante el desarrollo de la fruta, una vez que ha alcanzado el tamaño definitivo, se observa una rápida pérdida de la coloración verde de la superficie, asociada con la degradación de la clorofila. Simultáneamente o inmediatamente después, se acumulan las antocianinas. El color rojo final de la fruta madura es principalmente debido al pelargonidin-3-glucósido (88% del total de las antocianinas) y al cianidin-3-glucósido. El contenido total de antocianinas en frutillas varía ampliamente según las variedades (Olías *et al.*, 2000).

Estudios recientes revelan que la frutilla presenta una importante capacidad antioxidante (Kalt *et al.*, 1999), determinada por el método ORAC (oxygen radical absorbing capacity), debida al contenido de los fenólicos totales (entre los que se encuentra el ácido elágico), antocianinas y ácido ascórbico. Tanto los fenólicos como las antocianinas presentan una fuerte correlación con esta capacidad, mientras que el ácido ascórbico contribuye muy poco (Prior *et al.*, 1998), pues la capacidad antioxidante debida a él es sólo del 9,4 %. El incremento observado en la capacidad antioxidante a través de la síntesis y metabolismo postcosecha de los fenólicos sugiere que pueden desarrollarse tecnologías para incrementar la funcionalidad de estas pequeñas frutas, relacionadas con la salud de quienes la consumen (Kalt *et al.*, 1999).

La estabilidad del ácido ascórbico en frutas (no así en verduras de hojas como la espinaca) se atribuye a su alto contenido en ácidos y al efecto protector de los antioxidantes fenólicos. La estabilidad relativa de las cantidades de ácido ascórbico en la frutas puede también relacionarse a la compartimentación intracelular del ascorbato y de los fenólicos (Kalt *et al.*, 1999).

La frutilla es un fruto no climatérico, su tasa de producción de etileno es baja y durante la maduración los cambios en la respiración son leves (Namesny, 1999).

1.2.2 Variedades de frutilla cultivadas en la zona de Coronda (Prov. de Santa Fe)

Hasta 1955 se cultivó como única variedad en Coronda (Santa Fe) y en localidades vecinas como Arocena y Desvía Arijón, la llamada "Corondina", de la cual existen dudas sobre su origen (Scaglia *et al.*, 1995). Se estima que el sabor dulce e intenso de esta particular variedad se debía a la acción de polinización que ejercían las abejas entre las plantas de frutillas y los durazneros que por aquella época ocupaban grandes extensiones en la zona (Czerweny, 2000).

Alrededor de 1970 comenzó la introducción de nuevas variedades creadas en California, Florida y España (Scaglia *et al*, 1995).

En la actualidad, las principales variedades cultivadas en la zona son Chandler, Oso Grande, Camarosa, Sweet Charly y Milsei, las cuales reúnen las siguientes características:

Chandler: es una variedad de día corto introducida en 1983 por la Universidad de California. Posee frutos grandes, bien pigmentados. La fruta mantiene su firmeza por un tiempo prolongado. Es sensible al moho gris por el gran vigor de la planta (Scaglia *et al*, 1995; Anónimo, 1996; Anónimo, 2000).

Oso Grande: es una variedad de día corto introducida en 1987 por la Universidad de California. El fruto es el más grande de las variedades californianas. Posee buen sabor, color rojo medio a oscuro, firme para el transporte. Presenta sensibilidad al clima frío (variaciones al rendimiento), por ello funciona bien en cultivos protegidos. Suele aparecer corazón hueco (Scaglia *et al*, 1995; Anónimo, 1996).

Camarosa: es una variedad desarrollada también por la Universidad de California. Los frutos son grandes a muy grandes. El color de la fruta es uniforme, incluyendo el interior que es rojo brillante. El fruto es firme y muy bueno para la comercialización (Scaglia *et al*, 1995; Anónimo, 1996; Anónimo, 2000).

Sweet Charly: es una variedad de día corto, introducida por la Universidad de Florida. Posee una fruta grande, bien roja y de excelente sabor. Es muy productiva, presenta ventajas sobre las californianas por ser resistente a antracnosis, por lo que se adapta a las condiciones climáticas del norte Argentino. Es suceptible a viruela y *Botrytis* (Scaglia *et al*, 1995).

Milsei: es una variedad desarrollada en Navarra, España. Posee frutos cilíndricos, alargados, de color rojo brillante y muy aromáticos (Scaglia *et al*, 1995).

1.2.3 Cultivo, cosecha, postcosecha y comercialización

Cultivo

El cultivo de frutilla en la zona representa alrededor del 45 % de la superficie cultivada en el país. El producto obtenido es de excelente calidad, reconocido en los mercados más exigentes con la denominación "Frutillas de Coronda" (Anónimo, 1999c).

En el período 1994-1998 se registró un sostenido aumento en los rendimientos debido a la incorporación de tecnología en campo. El proceso productivo de la frutilla, que incluye las etapas de empaque, transporte y comercialización, ocupa entre 3000 y 5000 personas por año (Diario El Litoral, 2000).

En la campaña 2000 se plantaron 380 hectáreas de frutilla en el distrito Coronda, superficie que se ha visto reducida en un 27 %, si se tiene en cuenta que fueron 520 las hectáreas cultivadas en el año 1999, según cifras aportadas por la Secretaría de la Producción de la Municipalidad de Coronda (Diario El Litoral, 2000).

Para la obtención de un buen rendimiento es imprescindible la utilización de plantines de calidad, es decir, que hayan sido obtenidos de "plantas madres" que respondan a las características de la variedad (pureza genética), de buen desarrollo de corona y radicular, libre de enfermedades (virus, hongos, bacterias, etc.) (Scaglia *et al.*, 1995).

Una práctica común es la cobertura del suelo o *mulching*. Para ello pueden utilizarse distintos materiales (paja, cáscara de arroz, etc.), pero lo más común es el polietileno, que proporciona varios beneficios como el control de la maleza (si es de color negro), mejor aprovechamiento de la humedad del suelo, menor incidencia de enfermedades del fruto, maduración uniforme y mayor calidad del fruto en cuanto a tamaño, brillo y limpieza (Scaglia *et al.*, 1995). Todos estos factores redundan en un mayor rendimiento y ahorro de mano de obra.

En el mercado existen polietilenos de distintos colores: negro, transparente, naranja, rojo, bicolor, gris, metalizado, etc. El *mulch* negro es el más utilizado, ya que impide el crecimiento de las malezas (Wang *et al.*, 1998; Scaglia *et al.*, 1995).

Cosecha

La recolección, que se realiza en forma manual, normalmente comienza en agosto y se extiende hasta diciembre. Debe recolectarse en los momentos frescos del día, evitando las horas de más calor. Igualmente debe evitarse recoger frutos mojados.

Los rindes en la zona de Coronda, que son muy buenos, oscilan entre 25.000 y 35.000 Kg por hectárea.

El índice utilizado para determinar el momento de recolección es la fracción de superficie del fruto que ha adquirido color rojo, teniéndose los siguientes criterios:

- para mercados lejanos la mitad del fruto debe presentar color rojo.
- para mercados próximos puede retrasarse la cosecha hasta que la superficie coloreada alcance 3/4 del total (Namesny, 1999; Czerweny, 2000).

En términos generales, los frutos que se recolectan virando tendrán una mayor resistencia al deterioro, pero una menor calidad gustativa que los cosechados totalmente maduros debido a que las frutillas son frutos no climatéricos. Un fruto recogido durante el envero (cambio de color) no necesariamente alcanzará una buena coloración final. Para que una frutilla tenga buenas características organolépticas, el índice refractométrico debe estar entre 7 y 10 °Brix. Por debajo de 7 °Brix contiene muy pocos azúcares (Namesny, 1999).

Postcosecha

Las principales causas de pérdida de calidad en post-recolección son las enfermedades fitopatógenas, la desecación, la sobremadurez, los machucones o daños mecánicos, los cambios composicionales, etc.

Por lo expresado, las normas básicas para un buen manejo de frutillas son:

- manipulación delicada.
- temperatura tras la cosecha y durante la conservación lo más baja posible, entre 0°C y 4°C.
- humedad relativa elevada durante la conservación, cercana a la saturación pero sin alcanzarla, o el uso de material de empaque protector (Olías *et al.*, 1995).

Comercialización

La casi totalidad de la producción santafesina de frutilla se destina al mercado interno, al cual accede el 60% de las frutas en fresco y el 40% restante va a la industria. La exportación de productos frescos y elaborados es incipiente y dependerá de las condiciones que presente el mercado internacional (Anónimo, 1999c).

El transporte debe realizarse rápidamente, a temperaturas bajas y manipulando cuidadosamente el producto para evitar magulladuras. En algunos países se utiliza el transporte en atmósferas modificadas, ya que a 10 % O_2 y 15-20 % de CO_2 se preserva la calidad (Sanz *et al.*, 1999), fundamentalmente la firmeza, pudiéndose alterar en algunos casos el sabor y el aroma. También se obtienen buenos resultados induciendo la formación de una atmósfera modificada, pues las frutillas se mantienen más firmes, tienen un aspecto más fresco y muestran una incidencia de *Botrytis* significativamente menor cuando las cestitas son recubiertas con PVC y mantenidas a 2 °C (Namesny, 1999). En nuestra región, el transporte se realiza, lamentablemente en la mayoría de los casos, a temperatura ambiente, pues controlar la temperatura y la atmósfera eleva los costos en forma considerable.

1.2.4 Factores que afectan la calidad de las frutillas enteras durante las etapas de pre y postcosecha

Precosecha: la calidad de las frutillas está influenciada por numerosas condiciones climáticas y de cultivo, como el cultivar, la madurez, el régimen de lluvias, la humedad, la intensidad de la luz solar, la fertilización, el riego y el tiempo de cosecha. Muchos de estos factores afectan la firmeza, la jugosidad, los sólidos solubles, el contenido de humedad, el contenido de azúcares, etc. Por ejemplo, las plantas protegidas de la luz solar, maduran más lentamente, y en las frutillas disminuye el contenido de ácido ascórbico, ácido cítrico, pH, sólidos solubles y totales (Sistrunk *et al.*, 1983).

La frutilla, como cualquier otro fruto, necesita un aporte continuo de energía que le permita poder llevar a cabo las reacciones metabólicas básicas para mantener su organización celular, conservar la permeabilidad de las membranas, realizar el transporte de metabolitos, etc. La mayor parte de esta energía para mantener vivo al fruto es suministrada por la respiración celular.

La respiración es un proceso metabólico que puede describirse como la degradación mediante oxígeno (O_2) de los productos normalmente presentes en las células (almidón, azúcares, ácidos orgánicos, etc.) hasta moléculas más simples como dióxido de carbono (CO_2) y agua, con la consiguiente liberación de energía. La respiración es un proceso fundamental tanto en el fruto en formación como en el fruto recolectado. La principal diferencia entre ambos estados estriba en el hecho que en el momento de la recolección, el fruto se desconecta de la fuente natural de agua y compuestos orgánicos que es la planta. Esto conlleva una pérdida continua de los materiales de reserva que termina cambiando la estructura del fruto hasta su destrucción (Olías *et al.*, 1995).

Postcosecha: a continuación se presentan los aspectos más importantes de los efectos de la temperatura, humedad relativa, composición gaseosa o uso de empaques, sobre la fisiología postcosecha, que si bien son aspectos no específicos en lo que respecta al ácido elágico, son esenciales conocer para plantear adecuadamente los ensayos experimentales de la presente tesis. Además, en muchos casos, cuando no se dispone de información específica, el conocimiento sobre cómo es afectado otro compuesto (por ejemplo ácido ascórbico o algunos fenólicos) puede aclarar la situación y sugerir el camino a seguir en la investigación.

Las principales causas que afectan a la frutilla luego de la cosecha son:

• Respiración: la velocidad de respiración del fruto depende en gran medida de la temperatura de almacenamiento y de su estado de maduración en el momento de la recolección. En general, se da una relación inversa entre actividad respiratoria y período de almacenamiento, de manera que aquellos frutos que tienen una actividad respiratoria menor son los que pueden almacenarse durante períodos de tiempo más prolongados. Como la actividad respiratoria de la frutilla a 20 °C es de 150 mg CO_2/Kg.h (que es un valor elevado), se puede decir que es un fruto que "vive" en forma muy "rápida" y que por lo tanto se autodestruye en poco tiempo, aún en ausencia de fitopatógenos que aceleran esa destrucción. Por lo tanto, la vida comercial útil es de 5-6 días, siendo uno de los frutos más perecederos dentro del abanico de los productos frutihortícolas (Olías *et al.*, 1995).

Toda reducción de la temperatura de conservación, se traduce de inmediato en un descenso de la velocidad de respiración. El límite inferior para el desarrollo de la actividad metabólica normal es el punto de congelación de los fluidos tisulares, que generalmente se encuentra en el rango de 0 y -2 °C. En el caso de la frutilla, en el rango comprendido entre -

0,5 y 0 °C es en el que consigue una menor actividad metabólica sin producir daños por frío. Así, y debido a la estrecha relación existente entre actividad metabólica y vida comercial útil, se ha podido comprobar que la vida comercial útil de la frutilla conservada a 10 °C es aproximadamente 1/4 de la que presenta cuando se conserva a 0 °C (Olías *et al.*, 1995).

• Cambios composicionales: los cambios que experimenten las frutillas post-recolección dependerán de la temperatura de almacenamiento. Si se compara lo que sucede entre frutillas almacenadas a 0 y 5 °C, a esta última temperatura, los mayores cambios ocurren en el contenido de sacarosa. El ácido cítrico experimenta una reducción importante que una temperatura baja no es capaz de detener (Namesny, 1999).

El contenido de ácido ascórbico (vitamina C) no tiene un comportamiento homogéneo entre los diferentes cultivares. En algunos disminuye al aumentar la temperatura y el tiempo de almacenamiento, mientras que en otros estos factores no lo afectan (Namesny, 1999).

Kalt *et al.* (1999) almacenaron frutillas frescas a 0, 10, 20 y 30 °C durante 8 días para determinar el efecto de la temperatura de almacenamiento en la capacidad antioxidante total de la fruta y en el contenido de los fenólicos totales, antocianinas y ácido ascórbico. Vieron que existe un incremento en la capacidad antioxidante durante el almacenamiento a temperaturas mayores a 0 °C, que está acompañada por un incremento en las antocianinas, mientras que los fenólicos no presentan cambios significativos. No hubo pérdida de ácido ascórbico durante los 8 días a las distintas temperaturas.

Como ya se dijo, la estabilidad del ácido ascórbico en frutas (no así en verduras de hojas como la espinaca) se atribuye a su alto contenido de ácidos y al efecto protector de los antioxidantes fenólicos. La estabilidad relativa de las cantidades de ascorbato en la frutas en este estudio puede también relacionarse a la compartimentación intracelular del ácido ascórbico y de los fenólicos (Kalt *et al.*, 1999).

El contenido de antocianinas puede variar durante la vida postcosecha de las frutillas, dependiendo de la luz y de la temperatura de almacenamiento (Olías *et al*, 2000). La concentración de antocianinas se incrementa tanto en tejidos externos como internos de las frutillas cuando se almacenan en aire a 5°C durante 10 días, pero el aumento es menor en frutas almacenadas en atmósferas enriquecidas con CO_2 (Holcroft y Kader, 1999).

Los compuestos fenólicos, al igual que el pH, se incrementan durante el almacenamiento, pero no son afectados por la atmósfera (Holcroft y Kader, 1999).

La producción máxima de volátiles en postcosecha se produce en fruta que ha sido cosechada roja, siendo 8 y 25 veces mayor que en frutillas cosechadas de color rosado o blanco, respectivamente. Los cambios de color de la superficie de las bayas durante la maduración post-recolección coincide con la producción de volátiles (Namesny, 1999).

• Desecación: otro aspecto importante a considerar es la pérdida de agua por transpiración, que representa no sólo una disminución del peso comercial sino también provoca un descenso importante de la calidad sensorial al afectar a la apariencia y textura del fruto (Olías *et al.*, 1995; García *et al.*, 1998; Namesny, 1999), y una importante disminución en la calidad nutricional, por reducción, por ejemplo, del ácido ascórbico (Nunes *et al.*, 1998).

Cuando la frutilla se deja en una atmósfera de aire, el contenido en agua de este aire aumenta o disminuye hasta que alcanza un equilibrio con el del fruto. En el primer caso, este equilibrio se conseguirá a expensas del agua del fruto. Pérdidas de peso de tan sólo un 5 % son suficientes para marchitar y arrugar al producto, lo que en ambientes secos y cálidos puede ocurrir en unas pocas horas, debido a su alta actividad respiratoria y a su piel fina. Por ello, es necesario tomar medidas adecuadas que permitan minimizar las pérdidas de agua que puedan tener lugar después de la recolección (Olías *et al.*, 1995).

El método más sencillo para reducir estas pérdidas de agua del fruto consiste en incrementar la humedad relativa del aire de su entorno (humedad en la cámara) o a través de envases o películas semipermeables que actúan como barreras.

• Sobremadurez: la frutilla, debido a su gran actividad fisiológica, pasa con suma rapidez del estado maduro al sobremaduro senescente, especialmente si el control de la temperatura no es el adecuado.

• Machucones o daños mecánicos: la fragilidad de los tejidos de las frutillas hace que los daños mecánicos, especialmente los provocados por los cosechadores, sean una de las causas más importantes de deterioro. En cambio, los daños debidos a la vibración no son demasiado importantes, lo que se atribuye a la elasticidad de los tejidos, capaces de absorberlos (Namesny, 1999). Es frecuente encontrar daño por aplastamiento en cajas sobrecargadas, lo que produce una pérdida directa del producto y una pérdida indirecta debido a la podredumbre por *Botrytis*, para la cual el fruto dañado supone una caldo de cultivo inmejorable (Olías *et al.*, 1995). Otra causa de daño mecánico es el granizo, que cuando se ha producido sobre el fruto no maduro, da lugar a frutillas con cicatrices de coloración marrón, que no es posible comercializar.

• Pérdida de vitalidad del cáliz: un cáliz verde es signo de frescura en las frutillas. Sin embargo, como otros tejidos verdes, tiende a perder clorofila rápidamente (Namesny, 1999).

•Sensibilidad al etileno: la frutilla misma tiene una baja tasa de producción del etileno, pero reacciona a esta hormona. El control del etileno en ambiente post-recolección exento de este gas hace que la evolución hacia la maduración sea más lenta, permitiendo disponer de frutos más azucarados y más ácidos, lo que resulta en una mayor calidad gustativa (Namesny, 1999).

•Enfermedades fitopatógenas:

Podredumbre gris o *Botrytis*: Es el principal problema fitopatológico de las frutillas. Está causada por el hongo *Botrytis cinerea*. Se manifiesta especialmente en épocas húmedas. El tejido afectado adquiere un color rosa mate a marrón, pudiendo extenderse a todo el fruto sin desintegración y con poca exudación. Pasado un tiempo, la lesión exhibe en la superficie del fruto un micelio blanco que se transforma en gris cuando se produce la esporulación (Olias *et al.*, 1995; Namesny, 1999).

Antracnosis: causada por el hongo *Colletotrichum fragarie*, se manifiesta en el fruto por manchas grandes, circulares, deprimidas, en que el color aparece alterado, dando lugar a una podredumbre parda.

Podredumbre blanda: causada por hongos del género *Rhizopus*, que infectan al fruto una vez maduro a través de las heridas, manifestándose durante la conservación y transporte por ablandamiento del fruto y el característico exudado. Los tejidos pierden jugos que gotean de los envases. La manipulación de la frutilla por debajo de los 10 °C no permite el desarrollo del hongo (Olías *et al.*, 1995; Namesny, 1999).

1.3 FRUTAS MÍNIMAMENTE PROCESADAS. CALIDAD.

En los últimos años, las tendencias de consumo han ido cambiando. Existe una creciente demanda de productos de alta calidad, con atributos similares a los alimentos frescos (Hoover, 1997; Alzamora, 1997).

El consumidor requiere algunas características como por ejemplo, calidad superior a precios aceptables, conveniencia en la preparación y distribución, que sean nutritivos,

naturales y saludables, con menos aditivos, que posean atributos de frescura y que satisfagan los hábitos culturales y el estilo actual de vida (Alzamora, 2000).

Para responder a estos requerimientos se han desarrollado distintas alternativas, siendo una de ellas las frutas mínimamente procesadas o frutas "cortadas frescas" que involucran habitualmente las operaciones de eliminación de cáscara, corte, lavado y envasado. Se debe señalar que son productos altamente perecederos, porque sus tejidos internos resultan expuestos cuando su cubierta protectora (cáscara o cutícula) es removida y el metabolismo de los tejidos se acelera por el daño físico causado por la operación de corte. La combinación de la exposición y de la injuria interna de los tejidos y el metabolismo acelerado, origina un estrés severo en el producto fresco cortado, lo cual subsecuentemente afecta la vida útil y la calidad del producto. Típicamente, los productos frescos cortados son preparados sólo cuando se necesitan. El período de comercialización se limita de 15 a 20 días para tejidos vegetativos, inflorescencias, raíces, y tallos, y alrededor de 5 a 7 días para tejidos de frutas. Por lo tanto, todos los factores desde la cosecha hasta la venta necesitan ser tenidos en cuenta para mantener óptimas las cualidades (Watada, 1997).

Se puede obtener un período razonable de vida de anaquel para un producto de calidad, teniendo en cuenta los siguientes factores:

Madurez y variedad: la madurez óptima para la cosecha difiere ampliamente según los vegetales.

Las variedades pueden tener efecto diferencial sobre la calidad del producto fresco cortado. Por ello, se necesita seleccionar la variedad apropiada de cualquier vegetal para obtener productos frescos cortados de calidad óptima (McCarthy y Matthews, 1994; Watada, 1997), pues el contenido final de nutrientes en las frutas procesadas depende no sólo del procesamiento, sino también de la calidad de la materia prima (Howard *et al.*, 1999).

Sanitización: los microorganismos son ubicuos, por lo tanto el lavado de sanitización es esencial para mantener la población microbiana al mínimo, porque la vida de almacenamiento es más corta con una carga microbiana elevada.

La población microbiana del producto entero y del fresco cortado se reduce por lavado con un sanitizante. Los compuestos clorados son los más ampliamente utilizados como sanitizantes en el procesamiento de alimentos, de los cuales la solución de hipoclorito de sodio (100-150 ppm) es el más ampliamente usado en este tipo de industria. Alternativas a los

compuestos clorados son el ozono, luz ultravioleta y radiación gamma, de los cuales ninguno es tan conveniente como el lavado clorado (Watada, 1997).

Los sanitizantes no eliminan totalmente los microorganismos presentes en los tejidos. Además, los microorganismos nativos no deberían ser destruidos completamente, porque ellos controlan el crecimiento de cualquier patógeno contaminante (Watada, 1997).

Desórdenes químicos y físicos causados por el procesamiento: las frutas y vegetales son injuriados o dañados cuando son procesados para la preparación de productos frescos cortados, lo que consecuentemente resulta en desórdenes del producto. El desorden más común inducido por el procesamiento, es la decoloración y el amarronamiento, que ocurren preferentemente en el lugar de corte. Algunos investigadores previenen el amarronamiento con tratamientos de inmersión en soluciones de ácido ascórbico, ácido cítrico, $CaCl_2$ y/o fosfatos (Watada, 1997). Los baños de calcio retardan el *ripening*, el ablandamiento, principalmente en la frutillas cortadas, y retienen la vitamina C. También reducen el amarronamiento y la actividad enzimática. Los baños con ácido ascórbico y ácido cítrico, retardan el amarronamiento enzimático (Rosen y Kader, 1989).

Temperatura: la temperatura es el factor más importante en el mantenimiento de la calidad de los productos frescos cortados. La temperatura ideal de manipulación, mantenimiento y transporte para mercadería no sensible al frío es cercana a los 0 °C, pero esto no es económicamente factible. Dicha temperatura no debería ser mayor a los 4 °C. La tasa de respiración se incrementa substancialmente cuando aumenta la temperatura. La tasa de respiración aumenta de 2 a 7.5 cuando la temperatura se eleva de 0 a 10 °C. Como la respiración aumenta, la reserva de sustratos cae más rápidamente, lo cual repercute sobre la vida de anaquel del producto (Watada, 1997).

Atmósferas modificadas: la preservación de alimentos por medio de la modificación de la atmósfera que los rodea ha demostrado ser una buena alternativa y/o complemento a la refrigeración.

El concepto básico detrás de la conservación en atmósferas modificadas (AM) o controladas (AC) es que los alimentos se deterioran, al menos en parte, por la ocurrencia de reacciones oxidativas. Estas reacciones pueden ser resultado del propio metabolismo celular de las frutas y hortalizas frescas; o como resultado de la actividad de enzimas que usan como sustrato el oxígeno gaseoso. Cambiar la composición de la atmósfera alrededor del alimento inhibe o retarda estas reacciones extendiendo así su vida útil (del Valle y Palma, 1997).

La atmósfera adecuada estará determinada por el tipo de fruta. La mayor parte de frutas y hortalizas frescas son muy sensibles a condiciones de anaerobiosis, por lo que deben almacenarse en atmósferas con al menos un 1.5 - 2 % de O_2. Cabe destacar que la disminución de la tasa respiratoria y el retardo de la madurez de los frutos se obtienen siempre y cuando el fruto se mantenga respirando en forma aeróbica. Concentraciones de O_2 inferiores, provocan que la célula respire en forma anaeróbica con el consiguiente deterioro (del Valle y Palma, 1997; Brody, 1998).

Para todo producto existen límites mínimo de O_2 y máximo de CO_2, dentro de los cuales la modificación de la atmósfera es beneficiosa (McCarthy y Matthews, 1994). Fuera de estos rangos pueden tener efectos perjudiciales, tales como la maduración desuniforme, inducción o incremento de la incidencia de desórdenes fisiológico, y el desarrollo de olores y sabores extraños, debido a la acumulación de productos de fermentación (del Valle y Palma, 1997).

Para el caso de la frutilla, se recomienda que la temperatura oscile entre 0-5 °C, y que la composición de la atmósfera sea de 5-10 % de O_2 y de 15-20 % de CO_2 (Sanz *et al.*, 1999). Estos valores son sólo de referencia, pues la respuesta de los vegetales varía no sólo de especie en especie, sino de variedad en variedad, y aún dentro de las variedades dependiendo del estado de madurez en que se encuentre el producto. En la práctica, para un producto determinado, la única manera de determinar la composición atmosférica óptima es experimentalmente (Namesny, 1999).

Atmósferas elevadas en CO_2 disminuyen el ablandamiento de las frutillas (Rosen y Kader, 1989). También disminuyen la incidencia de *Botritis* (10-15 % de CO_2), pues actúan en forma directa disminuyendo la tasa de crecimiento de los microorganismos, o en forma indirecta, manteniendo la resistencia de la fruta. Este tipo de atmósferas han sido usada comercialmente en el transporte de frutillas (del Valle y Palma, 1997).

Los productos frescos cortados son empacados en bolsas o bandejas recubiertas con películas plásticas semipermeables y la atmósfera dentro del empaque es modificada por la propia respiración del producto. Esta modificación en la atmósfera puede ser beneficiosa para el mantenimiento de la calidad del producto fresco cortado. Las mezclas de gases que son generalmente aceptadas, se basan en lo recomendado para los productos enteros. Sin embargo, los cortados frescos pueden probablemente tolerar niveles más extremos de O_2 y CO_2, porque ellos no tienen cutícula o piel que restringen la difusión del gas y la distancia de

difusión de gas del centro a la superficie del producto es mucho menor que en los enteros. Además, como no puede regularse exactamente la mezcla de gases de la atmósfera modificada, se deberían evitar niveles de umbral que causen injuria (Watada, 1997).

La composición gaseosa de una atmósfera modificada depende de la intensidad respiratoria y peso de la muestra, y del área de intercambio y permeabilidad de la película. La tasa de respiración cambia con la temperatura y la edad del tejido, por eso no es constante. La permeabilidad de las películas comunes se ajusta a un estrecho margen de temperatura, pero no a las temperaturas bajas en que se mantienen los productos frescos cortados. En un futuro cercano, una amplia variedad de películas o sistemas estarán disponibles con ventajas tecnológicas que ajustarán la permeabilidad con los cambios de temperatura (Watada, 1997).

Humedad relativa: los productos frescos cortados son altamente susceptibles a la pérdida de peso porque los tejidos internos estan expuestos y se ha eliminado la piel o cutícula. Sin embargo, la humedad relativa no es un problema, ya que los productos frescos cortados son empaquetados en bolsas o bandejas recubiertas con películas. Esto proporciona una humedad relativa elevada, pero origina dos problemas potenciales. Con la película, la humedad se condensa sobre la superficie interna, lo cual desluce la visión del producto, y además, el goteo puede convertirse en un sitio de posible crecimiento microbiano. El segundo problema es que si la película no permite una suficiente transmisión de O_2 ó CO_2, niveles extremos pueden causar daños al producto. Así, las películas deben ser seleccionadas no sólo para mantener la humedad relativa elevada, sino también para permitir una transmisión apropiada de gases (Watada, 1997).

En conclusión, las calidad de los productos frescos cortados puede ser controlada observando la calidad inicial de madurez del producto, las prácticas sanitizantes, las condiciones óptimas de procesamiento, la temperatura y humedad relativa, durante el proceso, manipulación, transporte y comercialización. Esto es así porque por la naturaleza perecedera del producto no puede esperarse una vida de anaquel similar a la del producto entero. En efecto, debería desalentarse una vida de almacenamiento prolongada, pues luego de cierto período, el producto pierde calidad (Kader y Mitcham, 1996; Watada, 1997).

1.4 ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS PROCESADAS

Existen muy pocos estudios sobre cómo afectan las distintas tecnologías a los alimentos en su valor nutracéutico, y en particular cómo es afectado el contenido de ácido elágico en frutillas procesadas.

Efecto de la atmósfera modificada en almacenamiento refrigerado

Holcroft y Kader (1999) evaluaron la variación del contenido de ácido elágico, conjuntamente con otros compuestos fenólicos, en frutillas conservadas a 5 °C durante 10 días, en distintas atmósferas. Se observó una disminución del 8 % a los 5 días en las frutillas conservadas en aire y en las conservadas en atmósfera con 10 kPa de CO_2, y una disminución del 17 % en las expuestas a una atmósfera con 20 kPa de CO_2. A los 10 días de almacenamiento en las mismas condiciones, no se produjeron cambios respecto a los valores hallados a los 5 días.

Efecto del congelamiento y almacenamiento

El congelamiento en sí, no afecta el contenido de ácido elágico en frutillas. Sí influye el tiempo de almacenamiento de las frutillas congeladas, disminuyendo el contenido de ácido elágico un 5 % al cabo de 3 meses, un 24 % a los 6 meses y un 40 % a los 9 meses. Durante el almacenamiento y/o descongelamiento, el ácido elágico actuaría como antioxidante por su capacidad de quelar metales y por su habilidad de reaccionar con los radicales libres (Häkkinen *et al.*, 2000).

Efecto del proceso de cocción

El contenido de ácido elágico en mermelada de frutillas recién preparada disminuye aproximadamente un 40 % respecto a la fruta fresca. En mermelada de frutilla almacenada a 5 °C ó a -20 °C durante 9 meses, no se observa una disminución adicional estadísticamente significativa, probablemente porque las reacciones oxidativas que afectan al ácido elágico se producen durante la cocción (Häkkinen *et al.*, 2000).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 EXPERIENCIAS REALIZADAS

2.1.1 Determinación del contenido de ácido elágico en frutas de consumo masivo

Se analizaron las siguientes frutas: ananá, banana, ciruela, kiwi, mandarina, manzana roja, manzana verde y pera.

2.1.2 Determinación del contenido de ácido elágico en frutillas en función de distintas variedades y el grado de madurez

Se estudiaron 5 variedades de frutillas, seleccionadas entre las de mayor difusión entre los productores de la zona. Las mismas fueron: Camarosa, Sweet Charly, Chandler, Oso Grande y Milsei. Los estados de madurez analizados correspondieron a 0 %, 50 % y 100 % de desarrollo de color rojo exterior.

2.1.3 Determinación del contenido de ácido elágico en frutillas en función del tipo de presentación y del tiempo de almacenamiento

Se evaluó el contenido de ácido elágico de frutillas de la variedad Camarosa envasadas de 2 maneras diferentes (frutillas enteras en bandejas recubiertas con láminas de

PVC y frutillas cortadas, lavadas y envasadas en celdillas PET), y se comparó con las mismas frutas sin lavar y sin envasar.

A todos esos lotes se le evaluó el contenido de ácido elágico durante el almacenamiento refrigerado, hasta un plazo de 7 días (considerado razonable desde el punto de vista comercial).

2.1.4 Determinación del contenido de ácido elágico en frutillas enteras y mínimamente procesadas

En ambos casos se evaluó el efecto que podría tener el lavado con agua destilada y con agua clorada, contrastándolo con el de las respectivas frutas sin lavar.

2.1.5 Determinación del contenido de ácido elágico en frutillas mínimamente procesadas tratadas con una solución antioxidante

Además de las soluciones de lavado mencionadas anteriormente, también se evaluó el posible efecto sobre las frutillas, del tratamiento con una solución similar a la que podría utilizarse comercialmente para mantener el color y firmeza.

2.1.6 Evaluación de interferencias en la reacción de Wilson-Hagerman por efecto del tratamiento con una solución antioxidante

Por los resultados obtenidos en el punto anterior, se evaluó la posibilidad de la existencia de interferencias en la reacción espectrofotométrica de Wilson-Hagerman cuando las frutillas son tratadas con una solución antioxidante de $CaCl_2$, ácido ascórbico y ácido cítrico.

2.2 MATERIA PRIMA

2.2.1 Frutas de consumo masivo

Las frutas investigadas (ananá, banana, ciruela, kiwi, mandarina, manzana roja, manzana verde y pera) fueron adquiridas en un negocio minorista de la ciudad de Santa Fe.

2.2.2 Frutillas

Todas las frutillas utilizadas fueron recolectadas en un mismo establecimiento, localizado en Coronda, provincia de Santa Fe (principal zona productora del país) (Fig. 2.1).

Figura 2.1 Establecimiento productor de frutillas de Norma de Czerweny. Coronda. Provincia de Santa Fe

Las frutillas recién cosechadas fueron transportadas hasta el laboratorio (distante aproximadamente 40 km) y colocadas durante la noche bajo refrigeración (7°C), hasta procesarlas para los análisis.

Para la determinación del contenido de ácido elágico en frutillas de distintas variedades y grado de madurez, se trabajó con ejemplares cosechados en el período comprendido entre los meses de septiembre y diciembre de 1999 (Fig. 2.2).

Para la determinación de la variación del contenido de ácido elágico en función del tiempo de conservación en cámara y del procesamiento aplicado, se trabajó con frutillas cosechadas en el período comprendido entre los meses de agosto a diciembre de 2000.

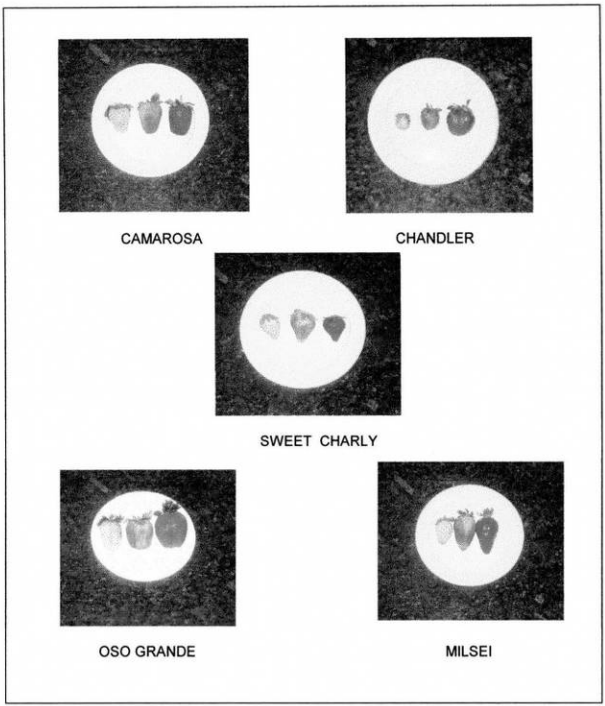


Figura 2.2 Frutillas de distintas variedades en tres grados de madurez diferentes: 0 % color rojo, 50 % color rojo y 100 % color rojo.

2.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las frutas de consumo masivo se lavaron con agua corriente a temperatura ambiente, se pelaron y 50-100 g de la porción comestible de cada una de ellas se trituró en procesadora hasta obtener un puré lo más homogéneo posible.

Las frutillas, luego de ser sometidas a los distintos procesamientos que se detallarán en el punto 2.11 del presente capítulo, se trituraron en procesadora hasta obtener un puré lo más homogéneo posible (incluyendo semillas). Dicho puré se denomina *pool* y está formado por diez frutillas (aproximadamente 80 g), para lograr una muestra representativa.

2.4 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ELÁGICO

2.4.1 Elección y justificación de la técnica para la determinación de ácido elágico

El ácido elágico puede ser cuantificado por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Wang *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1998; Häkkinen *et al.*, 1998), como así también por el ensayo espectrofotométrico de Wilson-Hagerman (Wilson y Hagerman, 1990; Cannas, 1998).

Cuando se utiliza HPLC, algunos autores recomiendan identificar simultáneamente el ácido elágico con el flavonoide miricetina, pues no consiguen, con varios sistemas de elución, separarlos adecuadamente (Häkkinen *et al.*, 1998). Incluso el Dr. Schwartz y su grupo no lograban obtener resultados repetitivos del contenido de ácido elágico en muestras analizadas por ésta técnica. Actualmente, estos mismos autores mejoraron la técnica modificando los métodos de extracción desarrollados en los primeros trabajos del Dr. Daniel (Funt *et al.*, 2000).

Por otra parte, los autores de la técnica espectrofotométrica aseguran que su método es altamente selectivo (Wilson y Hagerman, 1990).

En ambas técnicas existen etapas, como la hidrólisis y el posterior lavado de los residuos, donde si no se trabaja con cuidado, puede haber pérdida de muestra. Por ello, estos pasos no fueron tenidos en cuenta en el momento de la elección del método.

Evaluando el equipamiento y los recursos con que se disponía, y por asesoramiento recibido del grupo español del Dr. José Manuel Olías Jiménez (Olías, 1999), se decidió

trabajar con la técnica espectrofotométrica de Wilson-Hagerman, cuyos principales aspectos se presentan a continuación.

2.4.2 Fundamento del método de Wilson-Hagerman

Es un método espectrofotométrico para la determinación cuantitativa de ácido elágico, basado en la formación del p-Nitrosofenol del producto de nitrosilación del ácido elágico. El límite de detección del método es 1 μg de ácido elágico, y la desviación estándar relativa del método es de 0.8 %. El método es selectivo, con reacción positiva para ácido elágico, pero no para una variedad de otros compuestos fenólicos comunes en plantas, incluidos galotaninos, elagitaninos, proantocianidinas, fenilpropanoides, flavonoides y ácido gálico.

Los elagitaninos, presentes en varias dicotiledóneas, son taninos hidrolizables que contienen ácido hexahidroxidifénico. Hay poca información cuantitativa sobre la presencia de elagitaninos, pero parece ser que son más comunes que los galotaninos. Wilson y Hagerman explican que existen métodos para determinar taninos condensados (proantocianidinas), y para determinar galotaninos, pero no ha sido descripto aún un método cuantitativo adecuado para evaluar elagitaninos, ya que el existente (Método Bate-Smith) para la determinación de elagitaninos está sujeto a la interferencia del ácido gálico y es poco confiable.

Hidrólisis de las muestras

Estos investigadores estudiaron distintas condiciones para hidrolizar elagitaninos (presentes en frutilla) y así obtener a partir de ellos ácido elágico, que es el que se cuantifica. Probaron con calentamiento en ácido trifluoroacético 1 N, con calentamiento en ácido clorhídrico 1 N, y con calentamiento en ácido sulfúrico 2 N. La cantidad de ácido elágico liberado de los elagitaninos fue la misma cuando la hidrólisis se llevó a cabo a 100 °C en ácido sulfúrico o clorhídrico, pero fue mucho menor cuando fue liberado por hidrólisis a 68 °C en ácido trifluoroacético. Rutinariamente se utiliza para la hidrólisis ácido sulfúrico. La liberación de ácido elágico es completa a las 10 hs. Si se hidroliza por más de 120 hs, no hay liberación adicional de ácido elágico.

Para determinar la estabilidad del ácido elágico bajo las condiciones de hidrólisis, suspendieron ácido elágico en ácido sulfúrico 2 N y lo hidrolizaron bajo vacío a 100 °C durante 120 hs. El promedio recuperado fue 94 $\pm$ 4 % (n = 3).

Los sólidos recuperados del hidrolizado se lavan con acetona/agua fría con HCl para eliminar compuestos coloreados que interfieren con la determinación. El ácido elágico es

insoluble en solvente de lavado frío. Los investigadores sugieren que se debe tener mucho cuidado en los pasos en que se desecha el solvente de lavado, porque puede haber pérdida de ácido elágico. Para minimizar esa pérdida cada paso de lavado y centrifugación se realiza a 4 °C.

Especificidad

El ácido elágico, que no absorbe en el visible, forma un producto nitrosilado rojo en piridina (λ_{max} = 538 nm). El producto de reacción primario eventualmente decae a un compuesto amarillo (producto de decaimiento), el cual se convierte en anaranjado en solución básica. El espectro del producto primario y del producto de decaimiento son idénticos a longitudes de onda por debajo de 400 nm.

El ácido gálico es estructuralmente similar al ácido elágico, pero la reacción del ácido gálico con $NaNO_2$ da un producto amarillo-amarronado. Los compuestos fenólicos como el fenol, floroglucinol, catecol, ácido gálico, ácido 2,5-dimetoxicinámico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido p-cumárico, alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencilo, ácido 3,4-dimetoxibenzoico, catequina y quercetina, que tienen una variada forma de sustitución, también reaccionan dando productos nitrosilados amarillos o naranjas en lugar del rojo característico del producto del ácido elágico. Los taninos (incluídos taninos condensados), los galotaninos (ácido tánico) y los elagitaninos, no dan el producto de reacción primario. Se forman también productos amarillos cuando la dietilamina o anilina reaccionan con el $NaNO_2$ bajo las condiciones de este ensayo, pero las aminas son solubles en ácidos fuertes y por lo tanto, son separadas del ácido elágico durante la hidrólisis de las muestra. Por ello, las aminas presentes en muestras vegetales no interfieren con la determinación de ácido elágico.

Condiciones de reacción

La formación de color se maximiza cuando el ácido elágico y el $NaNO_2$ reaccionan en piridina. Aunque el ácido elágico y el $NaNO_2$ también reaccionan en tetrahidrofurano acuoso, en N,N-dimetilacetamida, o en dimetilsulfoxido, la absorbancia del producto en piridina es 5 veces la absorbancia en los otros solventes.

Se forma un precipitado cuando la reacción se lleva a cabo en piridina absoluta, pero no cuando se incorpora a la mezcla una pequeña cantidad de H_2O al usar $NaNO_2$ en solución acuosa. La concentración final de H_2O en la mezcla es aproximadamente del 4 % (en volumen).

Los autores ensayaron muchos catalizadores ácidos para maximizar el color. El ácido fosfórico y el ácido sulfúrico dieron mezclas de reacción turbias en piridina. El ácido perclórico y el ácido acético producen menos color que el HCl o el HNO_3, pero la concentración del HNO_3 debió ser un 33 % mayor que la concentración del HCl para dar la misma respuesta. Por ello, el elegido fue el HCl.

Otros investigadores sugirieron que las soluciones de $NaNO_2$ no eran estables, por ello Wilson y Hagerman evaluaron una solución acuosa de $NaNO_2$ al 1 % (p / v) recién preparada y otra almacenada 6 semanas a temperatura ambiente. La absorbancia obtenida con la solución más vieja no fue estadísticamente diferente al valor obtenido con la solución recién preparada ($P > 0,05$; $n = 3$).

El producto de nitrosilación primario del ácido elágico es transitorio, por eso el control de la temperatura y del tiempo son críticos. Una temperatura conveniente para el ensayo es de 30 °C. Hay una demora al comienzo de la reacción, seguida de una rápida formación y un decaimiento gradual del producto de reacción primario. La máxima absorbancia a 538 nm se alcanza a los 36 minutos de comenzada la reacción.

Este método lo estandarizaron bajo condiciones óptimas de reacción con el ácido elágico comercial, obteniendo un $R^2 = 0.99$ al trabajar por triplicado con cada una de las 6 concentraciones de ácido elágico con que se construyó la curva de calibrado. La respuesta dejó de ser lineal a partir de absorbancias mayores de 1,100. La desviación estándar relativa fue de 0,85 %. La mínima cantidad detectable de ácido elágico fue de 1 μg.

Wilson y Hagerman informaron que las soluciones recién preparadas de ácido elágico en piridina son amarillas, y las soluciones almacenadas durante 6 semanas son de color marrón. Sus estudios indican que la absorbancia obtenida de la solución de ácido elágico recién preparada no fue estadísticamente diferente de las que ya tenían 6 semanas ($P > 0,05$, $n = 3$), indicando que el cambio de color no afecta la determinación de ácido elágico.

Mecanismo de la reacción de formación de color

La reacción es una sustitución aromática electrofílica en la cual el $NaNO_2$ y el ácido son agregados a la solución para formar el electrófilo *in situ*. El pK_b de la piridina es 8,6 lo que implica que es una base lo suficientemente débil para no interferir con la formación del electrófilo. En medio ácido, el $NaNO_2$ forma los electrófilos HONO, N_2O_3, H_2ONO^+, NOCl y NO^+. Probablemente la formación de electrófilos ocurre durante el decaimiento de la reacción, antes de la formación del producto primario.

De los electrófilos posibles, las especies principales en este sistema probablemente son el N_2O_3 y el NOCl.

Existen dos carbonos equivalentes en el ácido elágico disponibles para la sustitución (Fig. 2.3). Los dos carbonos donde puede ocurrir la sustitución son químicamente idénticos y probablemente ambos son nitrosilados.

La nitrosilación del ácido elágico implica uno de estos dos mecanismos: uno puede ser una simple sustitución del H^+ por NO^+ sobre un carbono de densidad electrónica insustituída para dar un compuesto nitrosilado (Fig. 2.3, A); el otro puede ser un ataque electrofílico y pérdida de H^+ del grupo ortofenol para dar la nitrosildienona neutra (Fig. 2.3, B). El último mecanismo es como el propuesto para la nitrosilación de otros fenólicos.

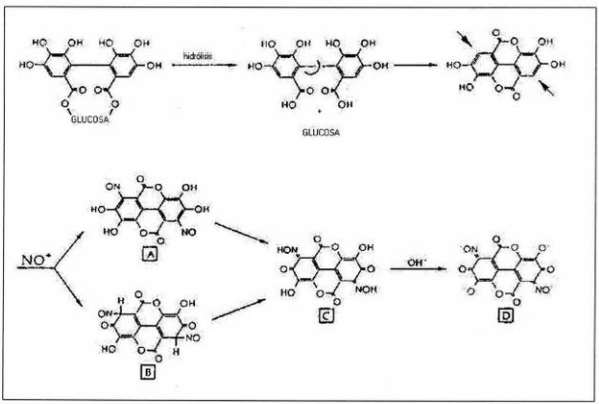


Figura 2.3 Formación de ácido elágico a partir de elagitanino y reacción del ácido elágico con el electrófilo NO^+

El producto de decaimiento es probablemente la quinona oxima (Fig. 2.3, C). Sobre la reacción con el $NaNO_2$, otros fenólicos distintos al ácido elágico forman inmediatamente productos nitrosilados amarillos los cuales pueden ser quinona oximas. Presumiblemente el

modelo de sustitución de otros fenólicos distintos al ácido elágico promueve el decaimiento rápido de la dienona nitrosilada a quinona oxima de tal modo que la dienona no se acumula. Con el ácido elágico el decaimiento es lento y la dienona se acumula durante la fase inicial de reacción.

Cuando se agrega NaOH al producto de decaimiento, se forma un compuesto rojo-naranja vivo (producto de decaimiento ionizado), que presumiblemente es la sal ionizada de la quinona oxima (Fig. 2.3, D). Cambios similares de color acompañando la ionización de la quinona oxima se ha observado con otros fenólicos.

Los carbonos insustituídos del ácido elágico, suceptibles al ataque electrofílico, están indicados por medio de flechas. Los dos productos primarios posibles son: A, producto de una sustitución simple, y B, la nitrosildienona. Se produce el mismo producto de decaimiento, una quinona oxima (C), y el mismo producto de decaimiento ionizado (D) tanto a partir de A como de B.

2.4.3 Técnica de Wilson-Hagerman

En la Figura 2.4 se pueden visualizar características de las muestras en distintas etapas de la técnica y en la Figura 2.5 se esquematiza el procedimiento experimental.

Hidrólisis

Una cantidad perfectamente pesada de muestra (alrededor de 0,5 gr) se coloca en un tubo de análisis, se le agregan 5 ml de SO_4H_2 2N, se congela en un baño de hielo seco/2-propanol, se le realiza vacío con ayuda de una bomba y luego se sella a la llama, quedando convertido el tubo en una ampolla (Fig. 2.4, A). Esta ampolla se lleva a 100 °C en estufa durante un tiempo apropiado (12-15 hs) para que se produzca la hidrólisis.

Lavado

Luego, la muestra se enfría a temperatura ambiente (Fig. 2.4, B), se abre la ampolla y se coloca en un baño de hielo (4°C) durante 10 minutos. Se centrifuga y el sobrenadante es sifoneado y desechado. El residuo que queda se lava 2 veces con 5 ml de solvente de lavado [acetona/H_2O/HCl concentrado (70/30/1, v/v/v)], siempre a 4°C. Por último, se seca bajo una corriente de N_2 . El residuo se disuelve con 5 ml de piridina.

Reacción de color

Se centrifuga para separar bien el residuo sólido del sobrenadante de piridina, donde se encuentra el ácido elágico disuelto. Se colocan 2,10 ml de dicho sobrenadante en un tubo de vidrio seco. Se agregan 0,10 ml de HCl concentrado, se mezcla y se coloca el tubo a 30 °C. Se agregan 0,10 ml de $NaNO_2$ al 1 % en H_2O, se mezcla rápidamente y se mide inmediatamente la absorbancia a 538 nm. Luego de incubar durante 36 minutos a 30 °C, se mide nuevamente la absorbancia (Fig. 2.4, C). La concentración de ácido elágico en las muestras es proporcional a la diferencia entre la absorbancia a los 36 minutos y la absorbancia inicial (ΔA_{538}).

Los resultados se refieren a los sólidos secos de la frutilla y se expresan en [mg de ácido elágico / gr de sólidos secos de frutilla].

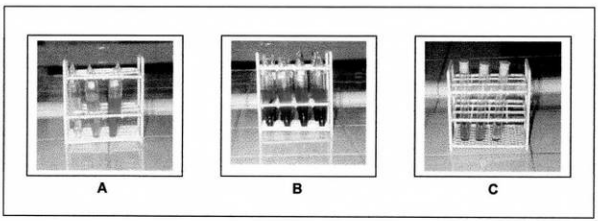
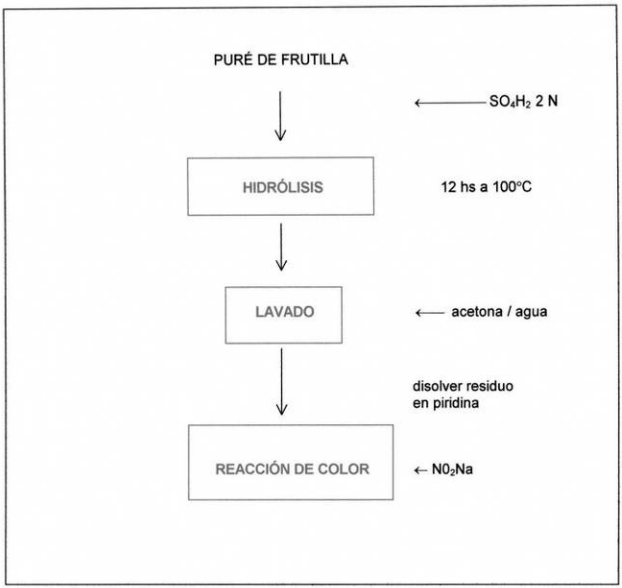


Figura 2.4 Procedimiento experimental. A: Tubos previo a la hidrólisis, B: Tubos luego de la hidrólisis y C: Reacción de color.



[ÁCIDO ELÁGICO] = K . ($A_{t=36\ min}$ - $A_{t=0\ min}$)

donde:

K = constante de proporcionalidad

$A_{t=0\ min}$ = absorbancia de la solución a tiempo cero

$A_{t=36\ min}$ = absorbancia de la solución a los 36 minutos

Figura 2.5 Principales etapas de la técnica espectrofotométrica de Wilson-Hagerman

2.4.4 Puesta a punto de la técnica experimental

Curva de calibrado

Una vez analizada cuidadosamente la técnica espectrofotométrica de Wilson-Hagerman, se procedió a realizar la curva de calibrado de la reacción colorimétrica.

Para acotarla, se buscó un valor de referencia y como no se disponía de información del contenido de este fitoquímico en frutas de nuestro país, se debió recurrir a trabajos realizados en Estados Unidos.

Maas *et al.* (1991b), encontraron que la pulpa de frutillas maduras contiene de 0,43 a 4,64 mg/g de peso seco (media 1,5 mg/g de peso seco) medido en 35 variedades y 15 clones, mientras que la pulpa de fruta verde varió entre 1,32 y 8,43 mg/g de peso seco (media 3,36 mg/g de peso seco). Se eligió como punto medio de la curva, a la media hallada en frutillas verdes (aproximadamente 3,50 mg/g de peso seco).

Como este trabajo se realizó con frutillas frescas, se debió tener en cuenta el contenido de agua de la frutilla, que en término medio es de un 90 %. Por lo tanto, un valor de 3,5 mg/g de peso seco correspondió a 0,35 mg elágico/g de peso fresco.

Para la hidrólisis, a aproximadamente 0,5 gr de frutilla fresca se le agregaron 5 ml de SO_4H_2 2 N. Luego el residuo se lavó y finalmente se disolvió con piridina el ácido elágico presente, siendo el volumen final de 5 ml. Por lo tanto no hubo ni dilución ni concentración.

Durante la reacción de color, sí existió una dilución, ya que de los 5 ml de ácido elágico en piridina que había en el tubo se tomaron sólo 2,1 ml y a este volumen se le agregaron los reactivos de color llegando a un volumen final de 2,3 ml.

En resumen, si se hace un esquema se tendrá:

0,5 gr frutilla fresca en 5 ml H_2SO_4 2 N $\longrightarrow$ Residuo Seco $\longrightarrow$ 5 ml piridina

$\Big|$

2,1 ml $\longrightarrow$ 2,3 ml

Teniendo en cuenta los distintos pasos en la técnica, se llegó a una concentración promedio final de ácido elágico de las frutillas verdes de:

$$C_f = \frac{0,5\ g \times 0,35\ mg \times 2,1ml \times 1000ml}{1\ g \times 5\ ml \times 2,3ml \times 1\ l} = 31,96\ mg/l = 31,96\ ppm$$

Así, en un principio, se tomó como punto medio de la curva un valor de 30 ppm.

Pruebas preliminares demostraron que para una concentración de 30 ppm, el valor de absorbancia superaba el valor de 1,100 y según los autores de la técnica al llegar a este valor de absorbancia la curva se aplana y no se detectan diferencias de absorbancia para las sucesivas concentraciones. Además, para una concentración de 60 ppm (punto máximo de la curva de calibrado propuesto), no se obtuvo lectura de absorbancia, porque se fue de escala.

Por esto, se decidió acotar la curva de calibrado hasta 30 ppm, y si se obtenían valores mayores era necesario diluir la muestra.

Solución patrón

El patrón de ácido elágico se obtuvo en la compañía Sigma de Saint Louis, Missouri, Estados Unidos.

La concentración de la solución madre de ácido elágico estuvo limitada por la solubilidad del ácido elágico en piridina, dato que no se disponía. De las distintas soluciones preparadas, a saber: 1000 ppm, 600 ppm, 500 ppm, 300 ppm, sólo en la última se obtuvo una disolución adecuada. Debido a que los volúmenes calculados para preparar los estándares secundarios a partir de esta solución fueron muy pequeños, se decidió trabajar con una solución de 30 ppm.

Se prepararon por triplicado las siguientes concentraciones: 1,5 ppm, 3 ppm, 6 ppm, 9 ppm, 12 ppm, 15 ppm, 18 ppm, 21 ppm, 24 ppm, 27 ppm y 30 ppm.

Los volúmenes a tomar de la solución de 30 ppm para que al enrasarlos a 25 ml se obtuviera cada punto de la curva de calibrado resultaron ser los detallados en la Tabla 2.1.

TABLA 2.1

Volúmenes necesarios de la solución patrón de 30 ppm para preparar la curva de calibrado

Concentración (ppm)	Volumen de solución de 30 ppm
1,5	1,25
3	2,50
6	5,00
9	7,50
12	10,00
15	12,50
18	15,00
21	17,50
24	20,00
27	22,50
30	25,00

Cálculo de la concentración mínima medible por la técnica

Dado que los investigadores que desarrollaron la técnica (Wilson y Hagerman, 1990) sugieren que la menor cantidad de ácido elágico detectable fue 1 μg, se calculó la concentración que correspondía a 1 μg en 2,3 ml. El valor calculado (0,43 ppm) es inferior a la menor concentración de la curva de calibrado y además fue un valor de referencia mínimo que se lo tuvo en cuenta para todas las determinaciones posteriores

Determinación espectrofotométrica

Para la determinación espectrofotométrica, se utilizó un equipo TURNER modelo 390. Fue necesario, una vez encendido y estabilizado el instrumento, llevar a cero de absorbancia ó a 100 % de transmitancia con una solución "blanco" preparada de la siguiente forma: en un tubo de vidrio seco se colocaron 2,1 ml de piridina, 0,10 ml de ClH concentrado y 0,10 ml de $NaNO_2$ al 1% en agua, se mezcló y se llevó a cero el instrumento. Entre lectura y lectura de los tubos con las distintas concentraciones, se controló el cero de absorbancia con esta solución blanco.

En las Tablas 5.1, 5.2 y 5.3 del Anexo A se presentan los resultados de 3 curvas de calibrado, representativas de las muchas que se realizaron cada vez que se utilizó un reactivo nuevo. Estas gráficas (Fig. 5.1, Fig. 5.2 y Fig. 5.3 del Anexo B) tienen muy buena linealidad hasta la concentración máxima (30 ppm) a pesar que a concentraciones mayores a las 18 ppm los valores de absorbancia superan el valor 1.

Análisis estadístico de los resultados de las curvas de calibrado

Para el análisis de la curva de calibrado se usó el programa estadístico STATGRAPH Plus 7.11 que permitió realizar un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la idoneidad del modelo lineal. La estimación de la ordenada al origen y la pendiente de la recta se realizaron por análisis de regresión lineal. Asimismo, el programa permite la aplicación de un t-test a dichos coeficientes para determinar la significación estadística de los mismos. En las Tablas 3.1 y 3.2 se presentan los resultados completos de dichos análisis.

2.5 ANÁLISIS COMPLEMENTARIOS

2.5.1 pH

A cada *pool* de frutillas se le determinó el pH utilizando un pHmetro Cardy Twin B-113, Horiba.

2.5.2 Sólidos solubles

A las muestras se las exprimió para obtener el jugo, sobre el que se realizó la determinación del contenido de los sólidos solubles, utilizando un refractómetro Abbe de Bausch and Lomb y expresando los resultados como °Brix a 25 °C.

2.5.3 Sólidos secos

Se pesó una cantidad perfectamente conocida de muestra y se colocó en una caja de Petri previamente pesada. Se llevó a estufa a 60 °C y se pesó el residuo seco hasta pesada constante. Los resultados se expresaron como %.

2.5.4 Pérdida de peso

El día 0 de la experiencia se pesó el total de frutillas colocadas en cada recipiente. La operación se repitió en los días 2 y 7, calculándose la pérdida de peso en forma porcentual.

2.5.5 Color

Se cortaron las frutillas al medio, en forma longitudinal, para realizar la medición de los componentes L* (luminosidad), a* y b*, en un Espectrofotómetro Minolta CM-508d (Fig. 2.6). Luego estos dos últimos datos fueron convertidos a valores de ángulo de tono,

$H = \tan^{-1}(b^*/a^*)$, y de saturación, $C = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$, que permiten realizar la interpretación de los mismos (Anónimo, 1994).

Es importante, una vez cortadas las frutillas, realizar las mediciones lo más rápido posible para evitar cambios producidos por desecación o amarronamiento.

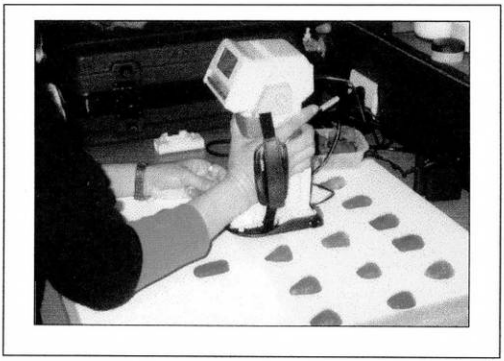


Figura 2.6 Medición de color

2.5.6 Aroma y *off odors*

El experimentador evaluó en forma sensorial la presencia de aroma típico a frutillas, como así también el desarrollo de *off odors*. Para ello, en el momento de la evaluación se procedió a abrir cada recipiente y se valoró la muestra usando en ambos casos una escala estructurada no numérica.

Para el aroma los términos de la escala fueron:

Nada - Pobre - Bueno - Muy Bueno

Para el *off-odors* los términos fueron:

Nada - Muy Poco - Poco - Mucho

2.6 MATERIAL DE VIDRIO UTILIZADO EN LA TÉCNICA

Dado que en la etapa de hidrólisis la muestra se encuentra en una ampolla de vidrio que luego durante el lavado deberá ser centrifugada, se debieron construir tubos de análisis adecuados. Para ello se recurrió a los vidrieros dependientes de la Facultad de Ingeniería Química y de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, quienes a partir de tubos de centrífuga de vidrio, elaboraron unos especiales con una prolongación, de modo que una vez colocada la muestra con el SO_4H_2 2 N y congelada, se pudiera efectuar el vacío y sellado a cada tubo, quedando así conformadas las ampollas que luego se llevarían a 100 °C en estufa durante toda una noche.

2.7 ENVASES Y PELÍCULAS USADOS EN LAS EXPERIENCIAS DE CONSERVACIÓN

Las muestras (aproximadamente 150 g) fueron envasadas en dos formas diferentes (Figura 2.7):

(1) Bandejas de polietileno semirrígido (130 mm x 100 mm x 40 mm) recubierto con film de cloruro de polivinilo (PVC) de 13 μm de espesor, con un área superficial de 0.013 m^2. Las velocidades de transmisión a los gases para el film (datos provistos por el distribuidor) fueron: para el O_2 18.500 [cm^3/m^2.día.atm]; para el CO_2 [169.200 cm^3/m^2.día.atm] (ambos a 23 °C y 1 atm) y para el vapor de agua 460 [g/m^2.día] (a 37 °C y 90 % HR).

(2) Celdillas con tapa, en forma de tronco de cono (de diámetros 93 mm x 110 mm y altura 60 mm) de tereftalato de polietileno (PET) de 0,42 mm de espesor con un área superficial de 0.036 m^2 . Las velocidades de transmisión según datos de bibliografía (Day, 1995) fueron: para el O_2 entre 29-59 [cm^3/m^2.día.atm] (a 23 °C y 0 % HR) y para el vapor de agua entre 12-18 [g/m^2.día] (a 38 °C y 90 % HR).

2.8 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN GASEOSA EN EL ENVASE

Análisis de oxígeno y dióxido de carbono

Las muestras se analizaron por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo SRI, usando un detector de conductividad térmica. El análisis del espacio de cabeza consistió en

inyectar 1 ml de gas extraído del paquete con una jeringa Hamilton. Fue usada una columna CTRI (concéntrica) Cat. Nº 8700 que permitió la determinación simultánea de oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno. La temperatura del horno se fijó en 55 ºC y el inyector y el detector se mantuvieron en 110 ºC. El flujo del *carrier* usado se mantuvo en 65 ml/min.

Los resultados se expresan como % de O_2 y % de CO_2

La puesta a punto de esta técnica cromatográfica fue previamente realizada por el grupo de Conservación de Alimentos del Instituto de Tecnología de Alimentos.

2.9 SOLUCIÓN DE LAVADO CLORADA

La solución utilizada fue una solución acuosa de hipoclorito de sodio (NaClO) que por ser una sal proveniente de un ácido débil y una base fuerte tendrá un pH>7.

Cuando el hipoclorito de sodio es agregado al agua, se genera ácido hipocloroso, ión hipoclorito y cloro gas (disuelto) en diferentes proporciones dependiendo del pH de la solución.

Dado que la especie germicida es el ácido hipocloroso no disociado, es necesario regular el pH a un valor adecuado, donde la especie se encuentre en gran proporción. Así, a pH menores o iguales a 7.0, la proporción de cloro como HClO sería mayor al 80 %.

Para las experiencias se prepararon soluciones de lavado de 100 ppm a partir de una solución acuosa comercial de hipoclorito de sodio (NaClO) de 55 g/l. El ajuste del pH a un valor de 7 se hizo con ClH 2 N.

Para todos los lavados se consideró una relación [peso de muestra / volumen solución de lavado] de 100 g/l.

2.10 SOLUCIÓN ANTIOXIDANTE

De las distintas combinaciones que se presentan en la bibliografía (Rosen y Kader, 1989; Wiley, 1994; Watada, 1997), se eligió trabajar con una solución de $CaCl_2$ 1 %, ácido ascórbico 1% y ácido cítrico 0,5 %. Se obtiene así una solución de lavado similar a las que suelen usarse en la industria, que actúa inhibiendo el pardeamiento y manteniendo la firmeza, especialmente en las frutillas cortadas.

2.11 PROCEDIMIENTOS

2.11.1 Contenido de ácido elágico en frutas de consumo masivo

El puré obtenido de las distintas frutas se utilizó para determinar tanto el contenido de ácido elágico como así también el pH, los sólidos solubles y los sólidos secos.

Para la determinación de ácido elágico, cada muestra se analizó por duplicado o triplicado.

2.11.2 Contenido de ácido elágico en frutillas en función de distintas variedades y el grado de madurez

Se trabajó en forma similar a lo realizado con las frutas de consumo masivo, es decir, se analizó por triplicado el contenido de ácido elágico de cada *pool*, a los cuales también se les determinó el pH, los sólidos solubles y los sólidos secos.

2.11.3 Efecto del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento sobre el contenido de ácido elágico en frutillas

Se dividió el total de frutillas recolectadas en tres grupos y a cada uno se les aplicó un proceso distinto según el diseño experimental. Estos fueron:

(1) Sin acondicionar: frutillas enteras sin lavar y sin envasar.

(2) Envasadas con PVC: frutillas enteras sin lavar y envasadas en bandejas recubiertas con lámina de PVC.

(3) Mínimamente procesadas: frutillas cortadas, lavadas y envasadas en celdillas PET

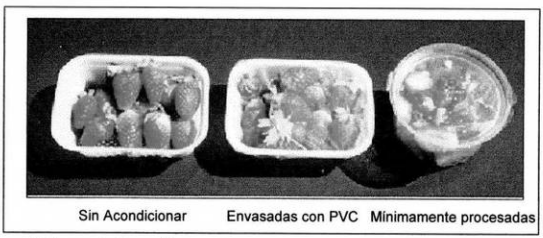


Figura 2.7 Presentaciones de muestras

Para cada procesamiento se prepararon seis muestras de aproximadamente 150 g de frutilla cada una.

En el caso de las frutillas cortadas, fueron despalilladas y el corte fue por la mitad y en forma longitudinal. El lavado con agua clorada se realizó durante tres minutos con una agitación de 60 movimientos / minuto. Luego las frutillas se escurrieron por gravedad, durante un minuto en una cestilla metálica y un minuto más sobre papel tisú. El dispositivo usado se muestra en la Figura 2.8.

Posteriormente se envasaron en celdillas con tapa en forma de tronco de cono de tereftalato de polietileno (PET).

Las muestras fueron conservadas en cámara a 4°C y 90 % HR.

Los muestreos se realizaron por triplicado a los 0, 2 y 7 días. Además de la determinación de ácido elágico, pH y sólidos solubles, se evaluó la composición gaseosa del envase, la pérdida de peso, el color, el aroma y desarrollo de *off odors*.

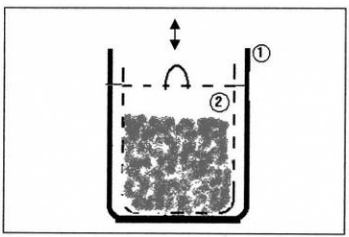


Figura 2.8 Vista de la cestilla metálica (2) en el vaso de precipitado (1) usado en los lavados.

2.11.4 Efecto del lavado sobre el contenido de ácido elágico en frutillas enteras y mínimamente procesadas

Se dividió el total de frutillas en 6 grupos y a cada uno se les aplicó un proceso distinto según el diseño experimental:

(1) Frutillas enteras sin lavar

(2) Frutillas enteras lavadas con agua destilada

(3) Frutillas enteras lavadas con agua clorada

(4) Frutillas cortadas sin lavar

(5) Frutillas cortadas lavadas con agua destilada

(6) Frutillas cortadas lavadas con agua clorada

Todas las frutillas sometidas a estos procesos fueron despalilladas. En el caso de las cortadas, el corte fue al medio y longitudinal. En las que fueron lavadas, se mantuvo la relación 100 g fruta / lt de solución de lavado, durante tres minutos con una agitación de 60 movimientos / minuto. Luego se escurrieron por gravedad durante un minuto en una cestilla metálica y un minuto más sobre papel tisú.

2.11.5 Efecto del tratamiento con una solución antioxidante sobre el contenido de ácido elágico en frutillas mínimamente procesadas

Se dividió el total de frutillas en 4 grupos y a 3 de ellos se le efectuó un lavado distinto según el diseño experimental:

(1) Frutillas cortadas sin lavar

(2) Frutillas cortadas lavadas con agua destilada

(3) Frutillas cortadas lavadas con agua clorada

(4) Frutillas cortadas lavadas con solución antioxidante

Todas fueron despalilladas y cortadas longitudinalmente por la mitad. Para el lavado se mantuvo la relación 100 g fruta / lt de solución de lavado, durante tres minutos con una agitación de 60 movimientos / minuto. Luego fueron escurridas durante un minuto en una cestilla metálica y un minuto más sobre papel tisú.

2.11.6 Evaluación de interferencias en la reacción de Wilson-Hagerman por efecto del tratamiento con una solución antioxidante

Se trabajó con banana, que cumplió el rol de matriz vegetal de la reacción para la determinación de ácido elágico. Se eligió esta fruta porque la cantidad que contiene de este nutracéutico es insignificante.

Se tomaron 2 lotes de aproximadamente 100 g de banana cada uno y se los trató de la siguiente forma:

a) Banana entera sin lavar

b) Banana cortada y lavada con solución antioxidante

Para el lavado se utilizó la relación 100 g fruta / lt de solución de lavado, durante tres minutos con una agitación de 60 movimientos / minuto. Luego se escurrió durante un minuto en una cestilla metálica y un minuto más sobre papel tisú.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS SOBRE LA TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA DE WILSON-HAGERMAN

3.1.1 Parámetros de validación del método

Toda técnica analítica debe validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados por ella producidos son confiables (Quattrocchi *et al.*, 1992).

En un ensayo de validación deben considerarse los siguientes parámetros:

Linealidad

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Este paso de validación es necesario si se va a trabajar con un solo estándar en las determinaciones de rutina, aunque pueden aceptarse métodos no lineales, si se opera con estándares múltiples cada vez.

Se prepara cada punto de la gráfica por triplicado y se le mide la absorbancia a cada uno. Luego, se determina la curva de regresión **Y = bX + a** por el método de los cuadrados

mínimos sobre los puntos individuales sin promediar (Tablas 5.1, 5.2 y 5.3 del Anexo A). Las gráficas se presentan en las Figuras 5.1, 5.2 y 5.3 del Anexo B.

Resulta conveniente evaluar los estimadores de regresión en un intervalo de confianza dado.

•Coeficiente de regresión lineal (r): se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto.

•Pendiente (b): se determina como parámetro indicativo de la sensibilidad del método. La magnitud de su valor depende de las unidades utilizadas.

•Ordenada al origen (a): se determina para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse únicamente a un error aleatorio.

TABLA 3.1

Estimadores de linealidad de las curvas de calibrado correspondientes a la Tablas 5.1, 5.2 y 5.3 presentadas en el Anexo A. Modelo Y = bX + a

Curva	Parámetros	Estimación	Error Estándar	t-test	P justo
	a	0.00051	0.006634	0.0775	0.93873
1	b	0.0456	0.000374	122.133	0.00000
	r	0.9990			
	a	-0.00827	0.008396	-0.9850	0.33223
2	b	0.0453	0.000473	95.7123	0.00000
	r	0.9983			
	a	0.00205	0.006575	0.3117	0.75736
3	b	0.0487	0.000370	131.525	0.00000
	r	0.9991			

El test de Student (t-test) aplicado a los coeficientes del modelo nos indica que la ordenada al origen (a) es no significativa ($p > 0.05$) y la pendiente (b) es altamente significativa ($p \leq 0.001$).

Otro test que se aplicó fue un ANOVA de una vía para comprobar la idoneidad del modelo lineal, analizando conjuntamente el coeficiente de determinación (R^2) que orienta sobre el porcentaje de la variación que ha sido explicada por el modelo (Tabla 3.2).

En todos los casos los coeficientes de determinación (R^2) del modelo resultaron adecuados (> 99.66 %). El análisis de la varianza reafirma que el modelo elegido es altamente significativo ($p \leq 0.001$).

TABLA 3.2

ANOVA para el modelo lineal de las curvas de calibrado correspondientes a la Tablas 5.1, 5.2 y 5.3 presentadas en el Anexo A.

Curva	Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado medio	F calc.	P justo
	Modelo	5.917	1	5.917	14916.46	0.00000
1	Residual	0.012297	31	0.000397		
	Total (correg.)	5.929299				
	(R^2)	99.79 %				
	Modelo	5.8208	1	5.8208	9160.842	0.00000
2	Residual	0.019697	31	0.000635		
	Total (correg.)	5.840474				
	(R^2)	99.66 %				
	Modelo	6.741	1	6.741	17298.90	0.00000
3	Residual	0.012081	31	0.000390		
	Total (correg.)	6.753544				
	(R^2)	99.82 %				

Precisión

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación. Está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

Los estimadores desviación estándar (s) y desviación estándar relativa (RSD), permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio, correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la media).

$$\mathbf{RSD} = \frac{\mathbf{s.100}}{\bar{\mathbf{X}}}$$

La precisión de un método analítico deberá estudiarse sobre:

(a) *el sistema*, evaluando la dispersión de la medida de la concentración del estándar.

Para el estándar de 15 ppm (punto medio de la curva de calibrado)

$$RSD_{curva\ 1} = 4.24\ \%$$

$$RSD_{curva\ 2} = 2.24\ \%$$

$$RSD_{curva\ 3} = 3.75\ \%$$

Los valores individuales se presentan en la Tabla 5.4 del Anexo A.

Teniendo en cuenta que para determinaciones simples, para un intervalo de aceptación del 95-105 %, se considera que el RSD debe ser menor de 1.9 % y para el caso de determinaciones por duplicado menor de 2.7 % (Quattrocchi *et al.*, 1992), los valores de RSD obtenidos para determinaciones por triplicado resultaron aceptables.

(b) *el método*, evaluando la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea. La evaluación corresponde a todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito por parte del instrumento.

Los valores utilizados para el cálculo se presentan en la Tabla 5.5 del Anexo A.

$$RSD_{frutillas\ verdes} = 6.20\ \%$$

$$RSD_{frutillas\ maduras} = 7.62\ \%$$

Los resultados obtenidos se hallan dentro de los valores aceptables para un micronutriente como el ácido elágico. Quatrocchi y otros (1992), indica que la masa relativa del analito y la complejidad de la matriz son de importancia, resultando apropiadas, en estos casos, RSD de 5 % a 10 % o mayores.

Además, es lógica la mayor dispersión en las frutas maduras, pues evaluar esta condición en función de la coloración es bastante subjetivo.

Exactitud

La exactitud de un método, también conocida como *error sistemático* o *tendencia*, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero.

Matemáticamente, la exactitud puede expresarse a través del % de recuperación (R)

$$R = \frac{\bar{X}}{X^*} \cdot 100$$

donde $\bar{X}$ es el valor medio y X^* el valor verdadero.

El procedimiento consiste en agregar a una cantidad conocida de frutilla, a la que previamente se le determinó el contenido de ácido elágico, una cantidad conocida de ácido elágico puro. Según los cálculos realizados se debían colocar en el tubo de hidrólisis, junto al puré de frutilla, 60 μg de ácido elágico puro. Pesar esta pequeña cantidad con las balanzas disponibles significa cometer mucho error. Otra posibilidad era agregar un volumen determinado de una solución patrón de ácido elágico en piridina (lo cual también era un inconveniente debido a la hidrólisis ácida que se debía realizar). Entre ambas opciones, se eligió la segunda. Por lo tanto, se colocó en un tubo de hidrólisis, 200 μl de una solución de ácido elágico en piridina de 300 ppm y se evaporó para obtener así los 60 μg de ácido elágico requeridos. Luego se agregó al mismo tubo una cantidad conocida de puré de frutilla (0.5072 g).

Los cálculos realizados fueron los siguientes:

El contenido de ácido elágico del puré de frutillas determinado con anterioridad fue de 0.066 mg/g frutilla fresca. Por lo tanto en 0.5072 g había 0.033 mg de ácido elágico. A esta cantidad se le sumó el ácido elágico puro agregado (0.060 mg) dando un total de 0.093 mg.

La absorbancia de este tubo incógnita fue de 0.523, correspondiendo a una concentración final de 0.115 mg/g peso fresco. Así, el contenido de ácido elágico en 0.5072 g de frutilla fue de 0.058 mg.

Con estos datos se calculó la recuperación (R):

$$R = \frac{0.058mg}{0.093mg}.100 = 62.36\%$$

El valor de recuperación se encuentra dentro de lo esperado para este tipo de analito. Häkkinen y otros (1998), hallaron que el porcentaje de recuperación de fenólicos en frutillas, como el ácido elágico, varía entre el 42 y 82 %. En los cálculos de los resultados finales no fue tenida en cuenta la recuperación.

Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo.

Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método, son los límites de detección y de cuantificación.

Quatrocchi y otros (1992), definen el límite de detección como la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, y el límite de cuantificación como la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables. Ambos, en las condiciones establecidas, y se expresan en unidades de concentración.

Los límites de detección (**LOD**) y cuantificación (**LOQ**) pueden estimarse a partir de las siguientes expresiones:

$$LOD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b}$$

$$LOQ = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b}$$

donde:

b: pendiente de la curva de calibración empleada habitualmente ($C_{analito}$ hasta 30 ppm)

Y_{bl} : estimador de la respuesta del blanco, utilizando curva de regresión con concentraciones bajas de analito ($C_{analito} \leq 1.5$ ppm)

S_{bl} = estimador de la desviación estándar del blanco, utilizando también la curva de regresión con concentraciones bajas de analito ($C_{analito} \leq 1.5$ ppm)

• Determinación de b: se determina la pendiente de la curva de calibrado en el rango apropiado (hasta 30 ppm).

Para los cálculos, se usarán los datos de la curva de calibrado N° 3 (Tabla 5.3 del Anexo A), representada por la ecuación:

$$Y = b\,X + a$$

siendo:

b = 0.0487

• Determinación de Y_{bl}: se obtiene otra curva de calibración, determinando también cada punto por triplicado, pero en este caso para concentraciones menores de analito (≤ 1.5 ppm). Se determina la ecuación de esta nueva recta de calibración y de la ordenada al origen de dicha curva, se obtiene un estimador de la respuesta del blanco: Y_{bl}.

Los datos de esta nueva curva se presentan en la Tabla 3.3. y la gráfica correspondiente en la Figura 3.1.

TABLA 3.3

Determinaciones de ácido elágico a concentraciones ≤ 1.5 ppm

Concentración (ppm)	Absorbancias			Abs. Media
0.45	0.014	0.017	0.014	0.015
0.90	0.031	0.030	0.032	0.031
1.50	0.053	0.050	0.050	0.051

El análisis de regresión tomando los valores medios de absorbancia, da la recta:

$$Y = 0.0342\ X - 0.0001$$

Cuando se aplica un ANOVA de una vía al modelo para esta recta de regresión, se obtiene un coeficiente de determinación elevado (R^2 = 99.50 %), resultando ser el modelo elegido altamente significativo.

La estimación de la respuesta a concentración cero es $\mathbf{Y_{bl} = 0.000}$. Se consideran sólo 3 cifras después de la coma porque es lo que puede medir el espectrofotómetro usado.

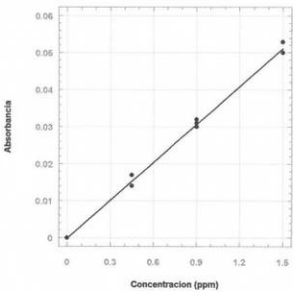


Fig. 3.1 Curva de calibrado para concentraciones bajas de analito (≤ 1.5 ppm)

• Determinación de S_{bl}: Se determina la desviación estándar de la absorbancias correspondiente a cada concentración del punto anterior.

Se calcula la recta correspondiente a desviación estándar *vs* concentración (Tabla 3.4) y se extrapola, como en el caso anterior, la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimador S_{bl}, correspondiente a la desviación estándar del blanco.

TABLA 3.4

Desviación estándar *vs* concentraciones ≤ 1.5 ppm

s	Concentración (ppm)
0.0017	0.45
0.0010	0.90
0.0017	1.50

Del análisis de regresión lineal se obtiene la recta:

$$Y = 0.0001\ X + 0.0014$$

Por lo que la desviación estándar cuando X tiende a 0 es 0.0014.

Cuando se aplica un ANOVA de una vía al modelo para esta recta de regresión, se obtiene un coeficiente de determinación muy bajo (R^2 = 0.68 %), resultando no significativo el modelo elegido (p = 0.95).

Como el modelo lineal no resultó adecuado para representar la variación de s en función de la concentración, se prefirió tomar como mejor estimador de S_{bl} el promedio de las desviaciones estándares independientemente de la concentración, siendo el resultado

$$\bar{S} = 0.0015 = S_{bl}$$

Así, con estos valores se calcula el límite de detección y el límite de cuantificación:

$$LOD = \frac{0.00 + 3x0.0015}{0.0487} = 0.09 \text{ ppm}$$

$$LOQ = \frac{0.00 + 10x0.0015}{0.0487} = 0.31 \text{ ppm}$$

3.1.2 Determinación de los tiempos de cada etapa de la técnica

La reacción de Wilson-Hagerman consiste en tres etapas con cierta complejidad operativa, por lo que, cuando se opera con muchas muestras, implica 3 días de trabajo hasta obtener un resultado. Como los autores de la técnica (Wilson y Hagerman, 1990) no

especifican qué intervalo de tiempo debe transcurrir entre una y otra etapa, se decidió estudiar si diferencias en los mismos presentan influencia en el valor final, a fin de poder trabajar con mayor flexibilidad de tiempos.

Se realizó para ello, un esquema de secuencias de trabajo que difieren en el tiempo de cada etapa, dentro de una semana. Los resultados para los distintos diseños, para un mismo *pool* de frutillas, se presentan en la Tabla 3.5.

TABLA 3.5

Secuencias de trabajo ensayadas, con distintos tiempos de cada etapa, para la determinación de ácido elágico en frutillas

Secuencia N°	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Acido elágico (mg/g peso seco)
1	H	L	R_C			1.57
1	H	L	R_C			1.33
2	H	L			R_C	1.62
2	H	L			R_C	1.64
3	H		L	R_C		2.00
3	H		L	R_C		2.15
4	H			L	R_C	0.98
4	H			L	R_C	0.75

H: hidrólisis, L: lavado, R_C: reacción de color

Analizando los resultados por medio de un ANOVA de una vía, se demuestra que existe diferencia (p justo = 0.0033) según cuál sea la secuencia seguida (Tabla 3.6). Los resultados del test de diferencia de medias para las distintas secuencias se muestran en la Tabla 3.7. Se observa que entre las dos primeras secuencias no hay diferencias significativas, lo que indicaría que una vez lavado el residuo sólido, donde se encuentra el ácido elágico de la muestra, y se le agrega la piridina, la solubilización de ácido elágico en este compuesto orgánico es igual con tiempos entre 24 y 72 hs. Las otras dos secuencias, que se diferencian en el tiempo transcurrido para efectuar los lavados luego de producida la hidrólisis, sí presentan diferencias.

Ahora bién, con el objeto de adoptar una determinada secuencia que sería respetada a lo largo de todo el trabajo, se asumió que un valor promedio entre el mayor y menor valor obtenido con las distintas secuencias sería apropiado (valor promedio = 1.47 ppm). En consecuencia, se decidió trabajar con la secuencia N° 1, es decir, realizar la hidrólisis, el lavado y la reacción de color en 3 días consecutivos.

TABLA 3.6

ANOVA para el contenido de ácido elágico en frutillas según la secuencia de trabajo realizada

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F	Probabilidad (P justo)
Secuencia	1.5063	3	0.5021	30.111	0.0033
Error	0.0667	4	0.0167		
Total	1.5730	7			

TABLA 3.7

Test de diferencia de medias para las distintas secuencias de trabajo

Secuencia	N° de Muestras	Ácido elágico (mg/g peso seco)
1	2	1.45a
2	2	1.63a
3	2	2.07b
4	2	0.86c

Diferentes letras en la misma columna representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

3.2 CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTAS DE CONSUMO MASIVO

Se hizo un relevamiento del contenido de ácido elágico en diversas frutas de consumo masivo para así poder destacar la importancia de la frutilla en relación a la presencia de este importante nutracéutico.

En la Tabla 5.6 del Anexo A, se presentan los valores individuales de cada una de las muestras procesadas. En ella, se puede observar que algunos de estos valores no superan el valor correspondiente al límite de cuantificación obtenido para la técnica de Wilson-Hagerman (LOQ = 0.31 ppm), tal es el caso de las muestras de kiwi, manzana roja y algunas muestras de banana, mandarina, manzana verde y pera, las que por lo tanto debieron ser descartados.

Los resultados promedios obtenidos con estos últimos datos, se presentan en la Tabla 3.8.

Con los datos de todas las frutas cuyos valores de ácido elágico en la curva de calibrado superaron el límite de cuantificación, se realizó un ANOVA de 1 vía (Tabla 3.9) donde se demuestra que existe diferencia altamente significativa en el contenido de ácido elágico entre las distintas frutas.

TABLA 3.8

Contenido de ácido elágico en frutas de consumo masivo

Fruta	Ácido elágico (mg/g peso seco)*	Observaciones
Ananá	0.06 ± 0.01	
Banana	0.02 ± 0.00	2 valores < LOQ
Ciruela	0.07 ± 0.00	
Kiwi	-	todos los valores< LOQ
Frutilla **	**0.77 ± 0.06**	
Mandarina	0.04	2 valores < LOQ
Manzana Roja	-	todos los valores< LOQ
Manzana Verde	0.07 ± 0.03	1valor < LOQ
Pera	0.04 ± 0.01	1valor < LOQ

* Valores promedios ± s.

** Frutillas maduras (100 % color rojo) variedad Camarosa.

TABLA 3.9

ANOVA para el contenido de ácido elágico en diferentes frutas

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F	Probabilidad (P justo)
Diferentes Frutas	2.3553	7	0.3365	36.426	0.0000
Error	0.1478	16	0.0092		
Total	2.5031	23			

Con el test de diferencia de medias (Tabla 3.10) se comprueba que el contenido de ácido elágico en frutillas es estadísticamente diferente, y muy superior, al de otras frutas de consumo masivo, mostrando su importancia en cuanto al contenido de éste nutracéutico.

TABLA 3.10

Test de diferencia de medias entre el contenido de ácido elágico en diferentes frutas

Frutas	N° de Muestras	Ácido elágico (mg/g peso seco)
Ananá	3	0.06a
Banana	5	0.02a
Ciruela	4	0.07a
Frutilla	6	**0.77b**
Mandarina	1	0.04a
Manzana Verde	2	0.07a
Pera	2	0.04a

Diferentes letras en la misma columna representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Otra forma de destacar la importancia de la frutilla respecto a otras frutas, es evaluar el consumo diario que debería hacerse de las mismas para la prevención de ciertos tipos de

cáncer, teniendo en cuenta investigaciones realizadas en Ohio y Washington (Funt *et al.*, 1997; Petek, 1999b), que indican que la cantidad necesaria para tal fin sería de 22.5 mg de ácido elágico / día.

Considerando que una ración diaria de frutillas (aproximadamente 300 g), aportaría el 103 % de las necesidades de ácido elágico, se demuestra que el aporte de la misma ración por parte de otras frutas es insignificante. Los resultados se ilustran en la Figura 3.2.

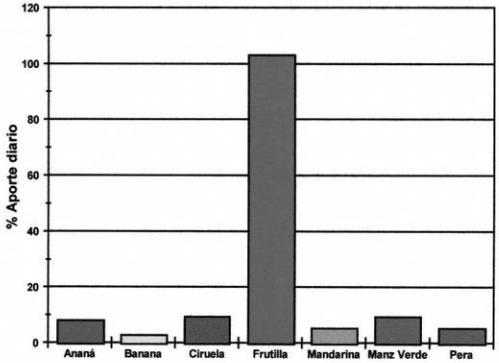


Figura 3.2 Porcentaje del aporte diario de ácido elágico de diferentes frutas

3.3 CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS SEGÚN EL TIPO DE MUESTRA A UTILIZAR

Se trabajó con puré obtenido a partir de frutillas enteras (pulpa + semillas) y con puré a partir sólo de pulpa (pulpa sin semillas). La experiencia se realizó con la variedad Camarosa y para distintos grados de madurez, determinados visualmente según la coloración de su superficie como 0 %, 50 % y 100 % de color rojo (Tabla 3.11).

TABLA 3.11

Contenido de ácido elágico en frutilla según el tipo de muestra

Variedad Camarosa	Ácido elágico (mg/g de sólido seco)		
Muestra	**0 % rojo**	**50 % rojo**	**100 % rojo**
Pulpa con semilla	2.53	1.87	1.43
	1.99	1.64	1.19
			1.16
Pulpa sin semilla	0.93	0.73	0.23
	1.34	0.59	0.21
			0.13

De los resultados del ANOVA de 2 vías (Tabla 3.12) se demuestra claramente que existen diferencias significativas entre los dos tipos de muestra ($p \leq 0.001$) y entre los distintos grado de madurez ($p \leq 0.001$).

TABLA 3.12

ANOVA para el contenido de ácido elágico en frutillas en función del tipo de muestra y grado de madurez

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F	Probabilidad (P justo)
Efectos principales					
Tipo de muestra	4.1802	1	4.1802	131.733	0.0000
Madurez	2.2948	2	1.1474	36.159	0.0000
Error	0.3173	10	0.0317		
Total	6.7923	13			

Con el test de diferencia de medias (Tabla 3.13), se observa claramente que el contenido de ácido elágico en las muestras constituídas por pulpa con semillas es superior al

de las constituidas sólo por pulpa, cualquiera sea el grado de madurez. Esto corrobora lo hallado en la bibliografía que señala que los niveles de ácido elágico en plantas de frutillas y otras frutas está influenciado por la especificidad tisular (Wang *et al.*, 1994; Maas *et al.*, 1991b.), siendo mayor el contenido en las semillas que en la pulpa.

TABLA 3.13

Test de diferencia de medias del contenido de ácido elágico en frutillas para los distintos tipos de muestras a diferentes grado de madurez

Muestra	N° de Muestras	Acido elágico (mg/g peso seco)
Verde con semillas	2	2.26a
Intermedia con semillas	2	1.75b
Madura con semillas	3	1.26c
Verde sin semillas	2	1.13c
Intermedia sin semillas	2	0.66d
Madura sin semillas	3	0.19e

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Teniendo en cuenta que la frutilla se consume entera, es decir con sus semillas, y también, debido a la dificultad de poder estandarizar la operación de eliminación de las semillas de las frutillas (grosor de la capa de pulpa con semillas desechada, pérdida de jugo, etc), se decidió que los análisis posteriores se harían con muestras conformadas por puré obtenido a partir de frutillas solamente despalilladas, es decir, de pulpa con semillas.

3.4 CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS EN FUNCIÓN DE DISTINTAS VARIEDADES Y EL GRADO DE MADUREZ

Durante los meses de septiembre, octubre y noviembre de 1999 se estudió, en 5 variedades, cómo influye el grado de madurez de la fruta en el contenido de ácido elágico. En los resultados de los valores promedio, que se presentan en la Tabla 3.14, se observan niveles muy elevados de ácido elágico en las frutas verdes y una notable disminución a

medida que progresa la maduración (los resultados individuales se presentan en la Tabla 5.7 para Camarosa, Tabla 5.8 para Chandler, Tabla 5.9 para Sweet Charly, Tabla 5.10 para Oso Grande y Tabla 5.11 para Milsei, todas ellas en el Anexo A). Similares resultados obtuvieron Maas *et al.* (1991) quienes hallaron que en un 90 % de los clones investigados el contenido de ácido elágico de la pulpa de frutas verdes era mayor que en las maduras.

Los valores hallados en las frutas maduras oscilan entre 0.19 y 0.50 mg/g de peso seco. Las variedades Camarosa, Chandler y Sweet Charly son las que presentan los niveles más elevados, y las variedades Oso Grande y Milsei los más bajos.

Se puede observar además, que las variedades que tienen mayor contenido de ácido elágico cuando están inmaduras, no son necesariamente las de más alto contenido cuando maduran (Tabla 3.14). El ejemplo más notable ocurre en la variedad Milsei donde la fruta verde (inapropiada para el consumo) posee una cantidad muy elevada de ácido elágico (1.60 mg/g peso seco) y al madurar éste disminuye notablemente (0.16 mg/g peso seco), resultando finalmente ser la variedad con menor contenido.

TABLA 3.14

Valores promedio de ácido elágico para las distintas variedades y grados de madurez en frutillas

	Ácido elágico (mg/g peso seco)*		
Variedad	**0 % color rojo**	**50 % color rojo**	**100 % color rojo**
Camarosa	1.36 ± 0.07	0.87 ± 0.06	0.50 ± 0.06
Chandler	2.07 ± 0.10	1.08 ± 0.11	0.46 ± 0.07
Sweet Charly	1.25 ± 0.07	0.63 ± 0.09	0.42 ± 0.05
Oso Grande	0.99 ± 0.16	0.48 ± 0.11	0.20 ± 0.04
Milsei	1.60 ± 0.09	0.46 ± 0.04	0.19 ± 0.02

(*) Promedios de 9 a 24 mediciones ± s

Con un total de 231 datos se realizó un ANOVA de 2 vías. En los resultados obtenidos (Tabla 3.15) se observa que existe una diferencia muy significativa ($p \leq 0.001$) en el contenido de ácido elágico entre las distintas variedades y una diferencia muy significativa ($p \leq 0.001$) entre los grados de madurez. Esto concuerda con los trabajos de otros autores, quienes

señalaron que la cantidad presente difiere no sólo según el grado de madurez, sino también y notablemente según las distintas variedades (Maas *et al.*, 1991b; Wang *et al.*, 1994).

TABLA 3.15

ANOVA para el contenido de ácido elágico en frutillas según variedad y grado de madurez

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F	Probabilidad (P justo)
Efectos principales					
Variedad	10.3559	4	2.5890	17.539	0.0000
Madurez	44.0527	2	22.0263	149.217	0.0000
Error	33.0652	224	0.1476		
Total	87.4738	230			

En el test de diferencia de medias para las distintas variedades y grado de madurez, se obtienen los resultados presentados en la Tabla 3.16.

Si se analiza el contenido de ácido elágico teniendo en cuenta sólo las variedades, sin diferenciar entre frutillas verdes, intermedias o maduras, se observa que la variedad con mayor contenido, en 1999 en la zona de Coronda (Pcia. de Santa Fe), es la Chandler, seguida por Camarosa, Sweet Charly, Milsei y Oso Grande (Tabla 3.17).

Si se analiza el contenido de ácido elágico en las frutillas en función solamente del grado de madurez, considerando todas las variedades, confirma lo ya expresado, que este nutracéutico disminuye cuando la fruta madura (Tabla 3.18).

Paralelamente a la determinación del contenido de ácido elágico, se determinaron como información complementaria, el contenido de sólidos solubles y el pH. Se debe tener en cuenta que para que una frutilla tenga buenas características organolépticas para el consumo, el índice refractométrico debe estar entre 7 y 10 °Brix; por debajo de 7 °Brix contiene pocos azúcares (Namesny, 1999). Los resultados promedio para las distintas variedades y grado de madurez se presentan en la Tabla 3.19 y los valores individuales para la variedad Camarosa en la Tabla 5.12, para Chandler en la Tabla 5.13, para Sweet Charly en el Tabla 5.14, para Oso Grande en la Tabla 5.15 y para Milsei en la Tabla 5.16 del Anexo A.

Mientras el ácido elágico disminuye al madurar, los sólidos solubles y el pH, aumentan, siendo esto último lo esperado al producirse los cambios fisiológicos propios de la maduración. De estos resultados puede verse (prácticamente para todas las variedades) que con un 50 % de color rojo son frutillas de calidad comestible. Con el objeto de obtener unas estimación de valor práctico sobre los aportes de este nutracéutico a la dieta según las distintas variedades se analizaron los datos obtenidos para frutillas con 50 y 100 % de color rojo, que son en definitiva las aptas para el consumo. Los resultados se presentan en orden decreciente en la Tabla 3.20.

TABLA 3.16

Test de diferencia de medias para las distintas variedades y grado de madurez

Muestra		N° de Muestras	Ácido elágico (mg/g peso seco)
Camarosa	Verde	23	1.36fg
	Intermedia	23	0.87d
	Madura	24	0.50c
Chandler	Verde	15	2.07h
	Intermedia	15	1.08de
	Madura	14	0.46abc
Sweet Charly	Verde	15	1.25ef
	Intermedia	15	0.63c
	Madura	15	0.42abc
Oso Grande	Verde	15	0.99d
	Intermedia	15	0.48ac
	Madura	15	0.20ab
Milsei	Verde	9	1.60g
	Intermedia	9	0.46abc
	Madura	9	0.19a

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

TABLA 3.17

Contenido promedio de ácido elágico teniendo en cuenta sólo las variedades, sin diferenciar entre frutillas verdes, intermedias o maduras

Variedad	N° de Muestras	Ácido elágico (mg/g peso seco)
Chandler	44	1.21
Camarosa	70	0.91
Sweet Charly	45	0.78
Milsei	27	0.75
Oso Grande	45	0.56

TABLA 3.18

Contenido de ácido elágico en frutillas en función del grado de madurez, considerando todas las variedades

Madurez	N° de Muestras	Ácido elágico (mg/g peso seco)
0 % colo rojo	77	1.42
50 % color rojo	77	0.72
100 % color rojo	77	0.37

TABLA 3.19

Valores promedio de sólidos solubles y pH para las distintas variedades y grados de madurez

	0 % color rojo		50 % color rojo		100 % color rojo	
Variedad	**°Brix**	**pH**	**°Brix**	**pH**	**°Brix**	**pH**
Camarosa	6.0	3.20	7.3	3.18	8.5	3.34
Chandler	5.5	3.00	6.9	2.96	7.6	3.19
Sweet Charly	6.4	3.19	7.6	3.17	8.0	3.28
Oso Grande	5.5	3.22	6.4	3.18	7.0	3.35
Milsei	5.2	3.26	7.2	3.16	7.9	3.32

TABLA 3.20

Contenido promedio de ácido elágico en frutillas verdes (inapropiadas para el consumo) y en frutillas con valor comestible (50 y 100 % color rojo) para las distintas variedades, presentadas en orden decreciente

Inapropiadas para el consumo (0 % color rojo)			Con valor comestible (50 y 100 % color rojo)		
Variedad	**N° Muestra**	**Ácido elágico (mg/g peso seco)**	**Variedad**	**N° Muestra**	**Ácido elágico (mg/g peso seco)**
Chandler	15	2.07	Chandler	29	0.78
Milsei	9	1.60	Camarosa	47	0.70
Camarosa	23	1.36	Sweet Charly	30	0.52
Sweet Charly	15	1.25	Oso Grande	30	0.35
Oso Grande	15	0.99	Milsei	18	0.31

3.5 VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS VARIEDAD CAMAROSA EN DISTINTOS AÑOS DE COSECHA

Wang *et al.* (1998) sugieren que los niveles de ácido elágico en las frutillas y frambuesas, al igual que otros nutrientes y nutracéuticos, poseen cierta variabilidad según, por ejemplo, el índice de madurez de la fruta, diversos factores ambientales como la temperatura, amplitud del día y también, por acción de algunas enfermedades fitopatógenas. Para visualizar este hecho se realizó una gráfica (Fig. 3.3) que ilustra la variación del ácido elágico en la variedad Camarosa, durante el período de cosecha correspondiente a los años 1999 y 2000, en la zona de Coronda (Pcia. de Santa Fe).

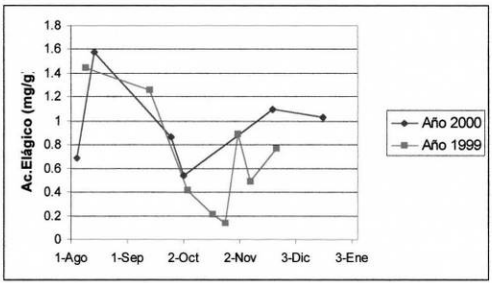


Figura 3.3 Variación del contenido de ácido elágico en frutillas variedad Camarosa (100% color rojo) en distintos años de cosecha

De los resultados obtenidos, se observa la variación que presenta el contenido de ácido elágico en frutillas variedad Camarosa a lo largo del período de cosecha y en los diferentes años. Es probable que los fenómenos meteorológicos como por ejemplo, las heladas (que ocurren generalmente en agosto cuando se emplea el cultivo bajo túnel), las lluvias excesivas, el calor intenso (a partir de octubre), etc., influyan sobre el contenido de ácido elágico. Es interesante destacar también, la posible influencia de la actividad metabólica de la planta sobre la calidad nutracéutica de los frutos. Aparentemente los primeros frutos de

la temporada serían más ricos en este nutracéutico y existiría una caída en los meses de mayor producción, cuando la planta se encuentra más exigida, que coincide con períodos en que los frutos maduran en la planta más rápidamente. Para poder afirmar esta suposición se deberían realizar investigaciones más específicas.

3.6 CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PRESENTACIÓN Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

En todas estas experiencias, realizadas en el año 2000, se trabajó con la variedad Camarosa, ya que fue una de las más cultivadas por ser una fruta de gran calidad sensorial y comercial, debido a su sabor, tamaño, intensidad y distribución del color, y a su excelente firmeza muy favorable para el transporte, lo que es muy conveniente para el productor.

Se evaluó el contenido de ácido elágico a los 0, 2 y 7 días de almacenamiento refrigerado (4°C y 90% HR) en frutillas acondicionadas de las siguientes formas:

- Sin acondicionamiento: frutillas enteras sin lavar y sin envolver.
- Envasadas con PVC: frutillas enteras sin lavar y envasadas en bandejas de polietileno recubiertas con lámina de PVC.
- Mínimamente procesadas: frutillas cortadas, lavadas y envasadas en celdillas de PET.

Se trabajó con un diseño de bloques completos al azar, donde cada bloque correspondió a distintos tiempos de realización de las experiencias (cada bloque corresponde a semanas diferentes). Esta agrupación en bloques resulta adecuada debido a que la variabilidad del contenido de ácido elágico con respecto a condiciones climáticas, época de cosecha, parcelas, etc., no puede se controlada. Además, cuanto mayor sea la variabilidad entre bloques, más eficiente será el diseño en lo que se refiere a su capacidad para detectar posibles diferencias del tratamiento (Little y Hills, 1976). Los resultados promedios del contenido de ácido elágico se presentan en la Tabla 3.21 y los individuales en la Tabla 5.17 del Anexo A.

TABLA 3.21

Contenido promedio de ácido elágico en frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento

		Ácido elágico (mg/g peso seco)		
Tipo de Presentación	**Bloque**	**Día 0**	**Día 2**	**Día 7**
Sin acondicionamiento	1	0.69 (n=4)	0.69 (n=4)	0.59 (n=4)
	2	1.58 (n=6)	1.01 (n=4)	1.24 (n=4)
Envasada en PVC	1	0.69 (n=4)	0.44 (n=4)	0.51 (n=4)
	2	1.58 (n=6)	1.09 (n=4)	1.10 (n=4)
Mínimamente procesadas	1	0.45 (n=4)	0.28 (n=4)	0.34 (n=4)
	2	1.02 (n=6)	1.01 (n=4)	0.98 (n=4)

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.
n: número de muestras.

Con un total de 78 datos se realizó un ANOVA por variables o factores con interacción, que se presenta en la Tabla 3.22. Este tipo de análisis permite evaluar si las conclusiones que se sacan sobre los factores o variables considerados dependen o no de los niveles que se estudien de ellos. Las fuentes de variación fueron: tipo de presentación, tiempo y bloque.

De este análisis, surge que no existen interacciones de segundo orden significativas entre tiempo de almacenamiento, tipo de presentación y bloque, pues en todos los casos se obtuvo un $p > 0.05$. Estos resultados pueden visualizarse en las gráficas de las tres interacciones posibles, que se presentan en la Figura 3.4.

Al no ser significativas las interacciones, se pueden sacar conclusiones definitivas sobre los efectos principales.

Si los efectos principales (tiempo de almacenamiento, tipo de presentación y bloque) se analizan por separado, se ve que existen diferencias muy significativas en los tres casos ($p \leq 0.001$).

TABLA 3.22

ANOVA para el contenido de ácido elágico en frutillas en función del tipo de presentación, tiempo de almacenamiento y bloque

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F	Probabilidad (P justo)
Efectos principales					
A: Presentación	1.0328	2	0.5164	13.444	P < 0.0001
B: Tiempo	0.8756	2	0.4378	11.398	0.0001
C: Bloque	8.6721	1	8.6721	225.779	P < 0.0001
Interacciones					
AB	0.3623	4	0.0906	2.358	0.0628
AC	0.0241	2	0.0121	0.314	0.7314
BC	0.1532	2	0.0766	1.994	0.1445
Error	2.4582	64	0.0384		
Total	14.709092	77			

Con los resultados del test de diferencia de medias para los distintos tipos de presentación, exhibidos en la Tabla 3.23, se demuestra que no existe diferencia entre el contenido de ácido elágico en frutillas sin acondicionar y las envasadas en PVC, lo que indica que ese tipo de envase no afecta al nutracéutico estudiado.

Por el contrario, se muestra claramente que existe una disminución de ácido elágico en las frutillas mínimamente procesadas, con respecto a las sin acondicionar y envasadas en PVC, lo que indica que el mínimo procesamiento afecta a este fitoquímico, siendo el porcentaje de disminución un 28 %, aproximadamente.

Con el test de diferencia de medias para los distintos tiempos de almacenamiento, presentado en la Tabla 3.24, se concluye que existe una disminución en el contenido de ácido elágico entre el día 0 y el día 2 de almacenamiento, de aproximadamente un 22 %, y a partir de ese momento se mantiene el valor por lo menos dentro del intervalo que abarcó la experiencia.

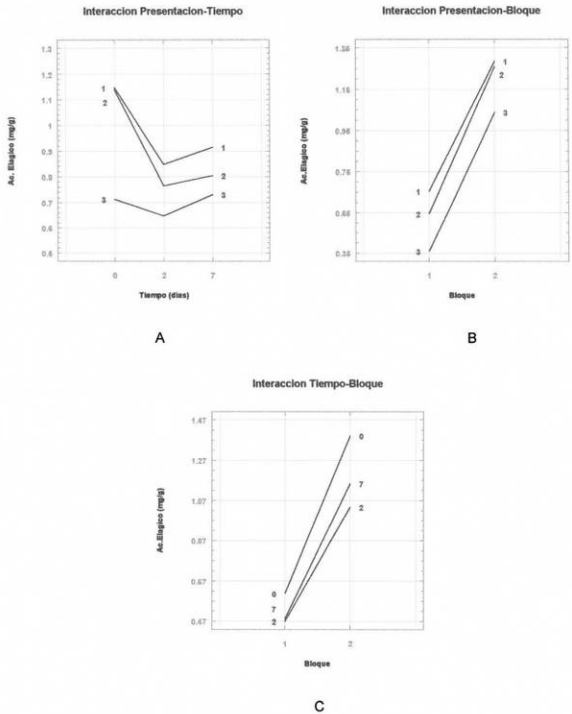


Figura 3.4 Interacciones en el contenido de ácido elágico entre tiempo de almacenamiento, tipo de presentación y bloque. En A y B: 1. Sin acondicionar, 2. Envasadas en PVC, 3. Envasadas en PET. En C: 0, 2 y 7 son tiempos de almacenamiento en días

TABLA 3.23

Contenido de ácido elágico para las distintas presentaciones

Presentación	N° de Muestras	Ácido elágico (mg/g peso seco)
Sin acondicionamiento	26	0.97a
Envasada en PVC	26	0.90a
Minimamente Procesadas	26	0.70b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

TABLA 3.24

Contenido de ácido elágico en frutillas para los distintos días

Tiempo (días)	N° de Muestras	Ácido elágico (mg/g peso seco)
0	30	1.00a
2	24	0.82b
7	24	0.75b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En el test de diferencia de medias para los distintos bloques, presentado en la Tabla 3.25, hay diferencia entre los valores de ácido elágico. Estos resultados se deben a la gran variabilidad que puede existir en el contenido de este nutracéutico, debido a factores ambientales como la parcela de terreno, lluvias, riego, temperatura, amplitud del día, etc. (Maas *et al.*, 1991b; Wang *et al.*, 1994).

TABLA 3.25

Contenido de ácido elágico en frutillas para los distintos bloques

Bloques	N° de Muestras	Ácido elágico (mg/g peso seco)
1	36	0.52a
2	42	1.19b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En la figura 3.5 se observa claramente el porcentaje de conservación de ácido elágico en las frutillas en función de la presentación y del tiempo de almacenamiento.

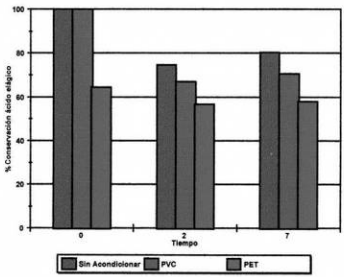


Figura 3.5 Porcentaje de conservación de ácido elágico en frutillas en función de la presentación y del tiempo de almacenamiento

De los resultados se concluye que el mínimo procesamiento en sí, afecta el contenido de ácido elágico en las frutillas, causando una disminución de un 35 %. El tiempo de almacenamiento también produce una disminución en las que no fueron procesadas mínimamente, pero en un porcentaje menor (aproximadamente 20%). Las mínimamente procesadas, que presentan una disminución en el contenido de ácido elágico respecto a las frutillas sin procesar, prácticamente no muestran modificaciones por acción del tiempo de almacenamiento.

Como no tiene sentido evaluar sólo la calidad nutracéutica de las frutillas sin considerar también la calidad sensorial, que en definitiva es lo que atrae al consumidor, se realizaron paralelamente análisis complementarios. Estos fueron la determinación del pH, el contenido de sólidos solubles, el color de las frutillas, la presencia de aroma y *off-odors*, la pérdida de peso, y la atmósfera dentro de los envases, siempre en función del tipo de presentación y del tiempo de almacenamiento.

pH: en general, el pH se incrementa durante el almacenamiento (Holcroft y Kader, 1999.), pero la variación es muy leve debido el la capacidad buffer que presentan las frutas.

En la Tabla 3.26 se presentan los valores promedio de pH de las frutillas en cada bloque en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento y en la Tabla 5.18 del Anexo A, los valores individuales.

Como puede verse, el pH de las frutillas maduras osciló entre un mínimo de 2.98 y un máximo de 3.39. No se observaron efectos debidos al tiempo de almacenamiento ni respecto a la presentación o acondicionamiento de la frutilla.

TABLA 3.26

pH promedio de frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento

		pH		
Tipo de Presentación	**Bloque**	**Día 0**	**Día 2**	**Día 7**
Sin acondicionamiento	1	2.98	3.07	3.00
	2	3.27	3.14	3.23
Envasada en PVC	1	2.98	3.07	3.03
	2	3.27	3.13	3.28
Mínimamente procesadas	1	2.98	3.12	3.12
	2	3.27	3.25	3.39

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.

Sólidos solubles: el valor de los sólidos solubles se relaciona con el contenido de azúcares en las frutas, por ello es un buen indicador de la calidad organoléptica. Para que las frutillas sean apetecibles, el índice refractométrico debe estar entre 7 y 10 °Brix. En la Tabla 3.27 se presentan los valores promedio de sólidos solubles en frutillas, expresados en °Brix, en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento, para cada bloque, y en la Tabla 5.19 del Anexo A, los valores individuales correspondientes.

Se analizó si se produce una modificación en los mismos en función de los efectos considerados. Para ello se realizó un ANOVA por variables (Tabla 3.28), y el test de diferencia de medias para los tres factores mencionados (Tablas 3.29, 3.30 y 3.31).

TABLA 3.27

Valores promedio de sólidos solubles en frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento

		°Brix		
Tipo de Presentación	**Bloque**	**Día 0**	**Día 2**	**Día 7**
Sin acondicionamiento	1	7.8	8.9	9.1
	2	7.6	8.1	8.6
Envasada en PVC	1	7.8	8.1	8.7
	2	7.6	7.8	8.6
Mínimamente procesadas	1	7.6	8.1	7.7
	2	7.4	7.7	7.0

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.

TABLA 3.28

ANOVA para los sólidos solubles en frutillas en función del tipo de presentación, tiempo de almacenamiento y bloque

Fuente de variación	**Suma de cuadrados**	**G.L.**	**Media de cuadrados**	**F**	**Probabilidad (P justo)**
Efectos principales					
A: Presentación	3.6689	2	1.8344	16.444	P < 0.0001
B: Tiempo	2.7356	2	1.3678	12.261	0.0001
C: Bloque	1.2844	1	1.2744	11.514	0.0020
Error	3.3467	30	0.1116		
Total	11.036	35			

Los resultados del ANOVA indican que existen diferencias muy significativas para los distintos tipos de presentación y los distintos tiempos de almacenamiento. Asimismo, entre los diferentes bloques las diferencias son significativas.

TABLA 3.29

Sólidos solubles en frutillas para las distintas presentaciones

Tratamiento	N° de Muestras	°Brix
Sin acondicionamiento	12	8.35a
Envasada en PVC	12	8.10a
Mínimamente Procesadas	12	7.56b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

TABLA 3.30

Sólidos solubles en frutillas para los distintos días

Tiempo (días)	N° de Muestras	°Brix
0	12	7.63a
2	12	8.12b
7	12	8.28b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

TABLA 3.31

Sólidos solubles en frutillas para los distintos bloques

Bloques	N° de Muestras	°Brix
1	18	8.20a
2	18	7.82b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Se observa que el mínimo procesamiento produce una disminución de los sólidos solubles, mientras que el tiempo de almacenamiento provoca un aumento de los mismos.

Color: la medición del color es importante en la valoración de la calidad de productos alimenticios. El color de las frutas es una manifestación externa de la composición y forma de los pigmentos vegetales. Un análisis simple composicional de pigmentos extraídos, no necesariamente predice el impacto visual.

Para expresar con exactitud un color dado, y no caer en la percepción e interpretación subjetiva, se desarrollaron diferentes métodos instrumentales. El valor "L*" se refiere a la claridad ó luminosidad (colores claros, colores oscuros). Los valores "a*" y "b*" son las coordenadas de cromaticidad que se utilizan para definir el ángulo de tono (Hue), donde el valor 0° corresponde al rojo (+a*), 90° al amarillo (+b), 180° al verde (-a*) y 270° al azul (-b*). También definen la saturación (Chroma) que expresa si un color es vívido o apagado. El centro del diagrama es acromático, y cuando los valores a* y b* aumentan, la saturación del color aumenta (el color es más vívido) (Anónimo, 1994).

Los datos promedios de color de las frutillas en sus distintas formas de presentación y en función del tiempo para los distintos bloques, se presentan en la Tabla 3.32. Los datos individuales se detallan en las Tabla 5.20 para el bloque 1 y en la Tabla 5.21 para el bloque 2, ambas en el Anexo A.

Se analizó la claridad L* en función del tipo de presentación, el tiempo de almacenamiento y los bloques (Tabla 3.33). Se vio que existen diferencias significativas respecto a este parámetro ($p \leq 0.05$) en el tipo de presentación y en los bloques, no así para el tiempo de almacenamiento ($p > 0.05$).

Del análisis del test de diferencia de medias para L*, para los distintos tipos de presentación (Tabla 3.34), se observa que aumenta con el tratamiento (lavado y corte), lo que era de esperar, pues el lavado remueve toda posible suciedad presente en la superficie de la frutilla. Además, como un aumento de L* significa un aclaración o empalidecimiento del color , podría ser que al lavar con cloro se pierde algo de antocianinas o la fruta se "blanquea" en pequeña medida. En cambio las frutillas envasadas en PVC, no fueron sometidas a ningún tipo de lavado y, por lo tanto, la magnitud de L* no se modificó respecto a las frutillas sin acondicionar.

TABLA 3.32

Color de las frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento

Día	Bloque	Tipo de Presentación	Color				
			L*	a*	b*	Hue	Chroma
0	1	Sin Acondicionam.	38.51	22.50	12.57	28.57	25.90
		Envadas en PVC	39.10	22.06	12.07	27.39	25.38
		Mínim. Procesadas	ND	ND	ND	ND	ND
	2	Sin Acondicionam.	36.35	23.26	11.38	25.72	25.96
		Envadas en PVC	35.85	23.14	11.68	26.37	25.98
		Mínim. Procesadas	37.88	27.42	16.07	29.56	31.97
2	1	Sin Acondicionam.	36.69	20.15	10.64	27.73	22.91
		Envadas en PVC	35.82	22.33	12.12	28.07	25.52
		Mínim. Procesadas	38.97	24.86	14.46	29.81	28.90
	2	Sin Acondicionam.	39.58	20.14	11.68	29.07	23.57
		Envadas en PVC	38.15	21.87	12.16	28.07	25.14
		Mínim. Procesadas	37.19	22.90	12.17	26.68	26.10
7	1	Sin Acondicionam.	38.43	20.58	11.96	29.62	23.84
		Envadas en PVC	38.85	21.06	12.04	29.05	24.38
		Mínim. Procesadas	38.60	22.37	14.43	31.82	26.58
	2	Sin Acondicionam.	37.93	19.22	9.97	27.01	21.69
		Envadas en PVC	39.17	20.99	11.47	28.10	23.97
		Mínim. Procesadas	37.72	20.51	10.62	26.92	23.19

ND: No determinada

TABLA 3.33

ANOVA para la claridad (L*) en frutillas en función del tipo de presentación, tiempo de almacenamiento y bloque

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F	Probabilidad (P justo)
Efectos principales					
A: Presentación	86.8026	2	43.4013	3.768	0.0239
B: Tiempo	40.2393	2	20.1196	1.747	0.1757
C: Bloque	63.3874	1	63.3874	5.503	0.0195
Error	4561.2115	396	11.5182		
Total	5052.4886	409			

TABLA 3.34

Magnitud de L* en frutillas para las distintas presentaciones

Presentación	N° de Mediciones	L*
Sin acondicionamiento	138	37.88a
Envasada en PVC	142	37.79a
Mínimamente Procesadas	130	38.91b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Como ya dijo, el tiempo de almacenamiento no fue un factor significativo sobre la claridad de las frutillas en las distintas presentaciones. Los valores de L* en frutillas para los distintos días durante el tiempo de almacenamiento se muestran en la Tabla 3.35.

TABLA 3.35

Magnitud de L* en frutillas para los distintos días

Días	N° de Mediciones	L*
0	113	38.45a
2	153	37.73a
7	144	38.40a

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

El test de diferencia de medias para el valor L* en frutillas para los distintos bloques, que significan experiencias en diferentes muestreos (fechas) (Tabla 3.36), indica diferencias posiblemente tanto por la variabilidad propia de los productos vegetales como por la preselección subjetiva de frutillas realizada para la conformación de los lotes.

TABLA 3.36

Magnitud de L* en frutillas para los distintos bloques

Bloques	N° de Mediciones	L*
1	219	38.64a
2	191	37.75b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Para el análisis del valor Hue (ángulo de tono), también se realizó un ANOVA por variables, que se presenta en la Tabla 3.37. Las fuentes de variación consideradas fueron las mismas que en el caso anterior. Se ve que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el tipo de presentación y muy significativas ($p \leq 0.001$) entre los bloques, y no existen diferencias significativas cuando se considera el tiempo de almacenamiento.

TABLA 3.37

ANOVA para el ángulo de tono (Hue) en frutillas en función del tipo de presentación, tiempo de almacenamiento y bloque

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F	Probabilidad (P justo)
Efectos principales					
A: Presentación	317.5813	2	158.7906	4.933	0.0077
B: Tiempo	24.4537	2	12.2268	0.380	0.6842
C: Bloque	389.0805	1	389.0805	12.088	0.0006
Error	12746.136	396	32.1872		
Total	13668.796	409			

Del análisis del test de diferencia de medias para Hue (Tabla 3.38), se observa un aumento con el tratamiento (lavado y corte). El incremento del valor Hue es concomitante con la disminución del color rojo (correspondiente a un ángulo de 0°). Esto significaría que el lavado y corte afectarían la pureza del color rojo de la frutilla. El valor del Hue se mantuvo constante (Hue_{prom} = 28.6) durante los 7 días que duró la experiencia.

TABLA 3.38

Magnitud de Hue en frutillas para las distintas presentaciones

Tratamiento	N° de Mediciones	Hue
Sin acondicionamiento	138	27.91a
Envasada en PVC	142	27.90a
Mínimamente Procesadas	130	29.98b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

El test de diferencia de medias para el valor Hue en frutillas para los distintos bloques (Tabla 3.39), muestra la variabilidad lógica.

TABLA 3.39

Magnitud de Hue en frutillas para los distintos bloques

Bloques	N° de Mediciones	Hue
1	219	29.70a
2	191	27.49b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Por último, se realizó un ANOVA por variables evaluando la saturación del color (Chroma) (Tabla 3.40). Las fuentes de variación consideradas fueron las mismas que anteriormente. Se ve que existen diferencias muy significativas ($p \leq 0.001$) en el tipo de presentación y el tiempo de almacenamiento, y diferencias significativas cuando se consideran los bloques.

TABLA 3.40

ANOVA para la saturación (Chroma) en frutillas en función del tipo de presentación, tiempo de almacenamiento y bloque

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F	Probabilidad (P justo)
Efectos principales					
A: Presentación	1232.7161	2	616.3580	28.262	P < 0.0001
B: Tiempo	882.0055	2	441.0027	20.221	P < 0.0001
C: Bloque	99.1889	1	99.1889	4.548	0.0336
Error	8636.2752	396	21.8088		
Total	11020.489	409			

TABLA 3.41

Magnitud del Chroma en frutillas para las distintas presentaciones

Tratamiento	N° de Mediciones	Chroma
Sin acondicionamiento	138	23.95a
Envasada en PVC	142	25.08b
Mínimamente Procesadas	130	28.49c

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En el test de diferencia de medias para el Chroma para las distintas presentaciones (Tabla 3.41), se observa un aumento en la saturación, lo que significa que el color es más vivido. Estos resultados indicarían que la protección dada por el envase (especialmente respecto a la deshidratación) influiría en este parámetro, a lo que se le sumaría, en el caso de las mínimamente procesadas, el lavado.

En el test de diferencia de medias para el Chroma para los distintos días (Tabla 3.42), se ve que el valor disminuye con el paso del tiempo. Esto indicaría que con el transcurso de los días el color rojo característico de las frutillas se va apagando.

TABLA 3.42

Magnitud del Chroma en frutillas para los distintos días

Tiempo (días)	N° de Mediciones	Chroma
0	113	28.24a
2	153	25.36b
7	144	23.92c

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

El test de diferencia de medias para el valor Chroma en frutillas para los distintos bloques pone de manifiesto la variabilidad de los diferentes lotes (Tabla 3.43).

TABLA 3.43

Magnitud del Chroma en frutillas para los distintos bloques

Bloques	N° de Mediciones	Chroma
1	219	26.40a
2	191	25.28b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Se concluye, por lo tanto, que el corte y el lavado afectan el color de las frutillas.

La claridad (L*) aumenta en las mínimamente procesadas, seguramente por la acción del cloro sobre los pigmentos y porque el lavado remueve la suciedad de la superficie. En las envasadas en PVC no existe diferencia en la claridad con las sin acondicionar pues al igual que éstas, no fueron lavadas. El tiempo de almacenamiento no afecta este parámetro.

El ángulo de tono (Hue) aumenta en las mínimamente procesadas, lo que significa que la pureza de color rojo disminuye. En las envasadas en PVC se mantiene constante respecto a las sin envasar. No es afectado por efecto del tiempo de almacenamiento.

La saturación (Chroma) aumenta en las envasadas en PVC respecto a las sin acondicionar y más aún en las mínimamente procesadas, lo que indica que el lavado las favorece (probablemente por remoción de la tierra o suciedad de la superficie), siendo el color en estos casos más vívido. Lo contrario ocurre por efecto del tiempo, ya que a medida que éste transcurre el color de las frutillas se va apagando.

Pérdida de peso: para medir la pérdida de humedad, que afecta el aspecto de la fruta por disminución de la turgencia celular, se evaluó la pérdida de peso. En la Tabla 3.44 se indican los valores promedio del porcentaje de pérdida de peso en cada bloque en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento. En la Tabla 5.22 del Anexo A se muestran los valores individuales.

En general para frutillas (Olías *et al.*, 1995) se considera que pérdidas de peso de tan sólo un 5 % son suficientes para marchitar y arrugar al producto, afectando la calidad comercial sensorial del producto. En función de estos criterios, vemos que sólo la fruta sin

envasar (sin acondicionar), es decir, sin ninguna barrera para protegerla de la deshidratación, alcanza valores cercanos al 5 % después de 7 días de almacenamiento a 4 °C.

En el caso de las frutillas envasadas en PVC o las mínimamente procesadas en PET la pérdida de peso es menor, pues se minimiza la pérdida por evaporación,.

TABLA 3.44

Pérdida de peso en frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento

		% Pérdida de peso	
Tipo de Presentación	**Bloque**	**Día 2**	**Día 7**
Sin acondicionamiento	1	1.62	4.22
	2	2.21	4.83
Envasada en PVC	1	0.07	0.20
	2	0.44	0.45
Mínimamente procesadas	1	0.01	0.06
	2	0.07	0.22

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.

Aroma y *off*-odors: los resultados obtenidos para cada bloque se presentan en las Tablas 3.45 y 3.46, y en las Tablas 5.24 y 5.25 del Anexo A, los respectivos datos individuales.

En las frutillas sin acondicionar se observa que el tiempo de almacenamiento afecta el aroma, pues al segundo día se observa una disminución que se mantiene hasta el final de la experiencia. No aparecen *off-odors* en ningún momento porque al estar en una atmósfera normal las frutillas no son afectadas en este aspecto.

En las envasadas en PVC, el aroma característico a frutillas se mantiene a lo largo de la experiencia y no hay desarrollo de *off-odors* pues en ningún momento se alcanzan niveles bajos de O_2, ni deterioro microbiano.

El mínimo procesamiento afecta el aroma de las frutillas. Esto puede verse ya en el día inicial de la experiencia pues disminuye la intensidad del mismo. La aparición de *off-odors* ya puede percibirse en el día 2 de las experiencias, estando siempre presente en el día 7, a pesar de no alcanzarse en ningún momento porcentajes muy bajos de O_2.

TABLA 3.45

Aroma de frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento

		Aroma		
Tipo de Presentación	**Bloque**	**Día 0**	**Día 2**	**Día 7**
Sin acondicionamiento	1	Muy Bueno	Bueno	Bueno
	2	Muy Bueno	Bueno	Bueno
Envasada en PVC	1	Muy Bueno	Muy Bueno	Muy Bueno
	2	Muy Bueno	Muy Bueno	Muy Bueno
Mínimamente procesadas	1	Bueno	Bueno	Pobre
	2	Bueno	Bueno	Bueno

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.

TABLA 3.46

***Off*-odors en frutilla en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento**

		Off-odors		
Tipo de Presentación	**Bloque**	**Día 0**	**Día 2**	**Día 7**
Sin acondicionamiento	1	Nada	Nada	Nada
	2	Nada	Nada	Nada
Envasada en PVC	1	Nada	Nada	Nada
	2	Nada	Nada	Nada
Mínimamente procesadas	1	Nada	Nada	Poco
	2	Nada	Poco	Poco

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.

Composición gaseosa en los envases: como las frutillas, al igual que todos los vegetales, siguen respirando después de cosechadas, es importante controlar la atmósfera que tendrán los distintos envases, por acción de la respiración de la fruta y en función de la distinta permeabilidad de los mismos. Para el caso de la frutilla se recomienda que la composición de la atmósfera sea de 5-10 % de O_2 y de 15-20 % de CO_2 (Sanz *et al.*, 1999).

Al disminuir el % de O_2 disminuye la tasa respiratoria y se retarda la senescencia, siempre y cuando el fruto se mantenga respirando en forma aeróbica, de lo contrario de producen injurias en la fruta y se desarrolla *off*-odors (del Valle y Palma, 1997; Brody, 1998). Las atmósferas elevadas en CO_2 disminuyen el ablandamiento de las frutillas (Rosen y Kader, 1989) y disminuyen la incidencia de *Botritis* (Namesny, 1999).

En la Tabla 3.47 se presentan los valores promedio del % de CO_2 y del % de O_2, según el tipo de presentación y tiempo de almacenamiento, para ambos bloques. En la Tabla 5.25 del Anexo A se presentan los datos individuales.

TABLA 3.47

Composición gaseosa promedio en los distintos envases

		% promedio de CO_2		% promedio de O_2	
Tipo de Presentación	**Bloque**	**Día 2**	**Día 7**	**Día 2**	**Día 7**
Envasada en PVC	1	1.01 (n=4)	3.04 (n=4)	18.91 (n=4)	19.38 (n=4)
	2	0.81 (n=4)	1.66 (n=4)	18.07 (n=4)	18.94 (n=4)
Mínimamente procesadas	1	2.86 (n=4)	10.28 (n=4)	17.40 (n=4)	16.42 (n=4)
	2	2.13 (n=3)	4.08 (n=4)	17.45 (n=3)	19.41 (n=4)

Se realizó un ANOVA por variables para el % CO_2 (Tabla 3.48) y para el % O_2 (Tabla 3.52). Para el % CO_2 se vió que existen diferencias muy significativas ($p \leq 0.001$) en el tipo de presentación y el tiempo de almacenamiento, y existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los bloques.

En la Figura 3.6, se presenta un gráfico de barras que representa la evolución de la atmósfera del bloque 1 en función de los dos tipos de envases empleados.

En el test de diferencia de medias para el % CO_2, en los envases para las distintas presentaciones (Tabla 3.49) existen diferencias, siendo mayor el porcentaje en los envases PET. Para los distintos días (Tabla 3.50), se demuestra que la atmósfera se modifica en relación al día cero, aumentando el % CO_2 en el día 2 y más aún en el día 7. Los valores logrados de CO_2 en ningún caso alcanzan a los recomendados en la bibliografía para frutillas. Existen diferencias para los distintos bloques (Tabla 3.51)

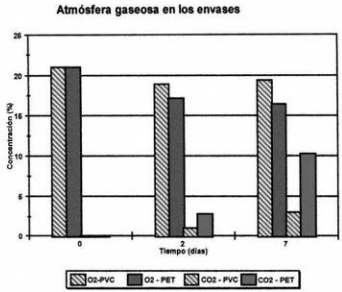


Figura 3.6 Composición de la atmósfera en función de los dos tipos de envases empleados

TABLA 3.48

ANOVA del % CO_2 en los envases en función del tipo de presentación, tiempo de almacenamiento y bloque

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F	Probabilidad (P justo)
Efectos principales					
A: Presentación	53.4463	1	53.4463	19.398	0.0001
B: Tiempo	186.6622	2	93.3311	33.874	P< 0.0001
C: Bloque	23.7085	1	23.7075	8.605	0.0054
Error	115.7208	42	2.7553		
Total	381.5444	46			

TABLA 3.49

% CO_2 en los envases para las distintas presentaciones

Tratamiento	N° de Muestras	% CO_2
Envasada en PVC	24	1.09a
Minimamente Procesadas	23	3.22b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

TABLA 3.50

% CO_2 en los envases para los distintos días

Tiempo (días)	N° de Muestras	% CO_2
0	16	0.00a
2	15	1.70b
7	16	4.77c

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

TABLA 3.51

% CO_2 en los envases para los distintos bloques

Bloques	N° de Muestras	% CO_2
1	24	1.44a
2	23	2.87b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Holcroft y Kader (1999) encontraron que el contenido de ácido elágico en frutillas conservadas a 5 °C disminuía a medida que la concentración de CO_2 aumentaba, en experiencias realizadas a los 5 y 10 días de almacenamiento, notando que entre los días 5 y 10 no había diferencias. En la presente tesis también se detecta una disminución del

contenido de ácido elágico, mayor aún a la hallada por dichos investigadores, en función del aumento en la concentración de CO_2. Este descenso en el contenido de ácido elágico en frutillas sometidas a la presencia de CO_2 se manifiesta ya en el día 2 de la experiencia, manteniéndose constante hasta el final de la misma.

En el ANOVA para el % O_2 de la Tabla 3.52 se observa que existen diferencias significativas según el tipo de presentación, diferencias muy significativas ($p \leq 0.001$) según el tiempo de almacenamiento y no existen diferencias entre los bloques.

En el test de diferencia de medias para el % O_2, en los envases para las distintas presentaciones (Tabla 3.53) existen diferencias, pues disminuye el porcentaje en los envases PET. Para los distintos días (Tabla 3.54), se demuestra que la atmósfera se modifica en relación al día cero, pero el % O_2 en los días 2 y 7 se mantiene constante. Para los distintos bloques no existen diferencias.

TABLA 3.52

ANOVA del % O_2 en los envases en función del tipo de presentación, tiempo de almacenamiento y bloque

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F	Probabilidad (P justo)
Efectos principales					
A: Presentación	6.7273	1	6.7273	6.127	0.0174
B: Tiempo	81.1203	2	40.5302	36.940	P< 0.0001
C: Bloque	1.0977	1	1.0977	1.000	0.3337
Error	46.1156	42	1.0980		
Total	134.7048	46			

TABLA 3.53

% O_2 en los envases para las distintas presentaciones

Tratamiento	N° de Muestras	% O_2
Envasada en PVC	24	19.55a
Mínimamente Procesadas	23	18.79b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

TABLA 3.54

% O_2 en los envases para los distintos días

Tiempo (días)	N° de Muestras	% O_2
0	16	21.00a
2	15	17.98b
7	16	18.54b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Si bien con el paso del tiempo se logró disminuir el % de O_2 en los envases, más aún en las celdillas PET, en ningún caso se llegó al porcentaje recomendado por los distintos autores.

Evaluación integral: en estas primeras experiencias, se observa que en relación a las frutillas sin acondicionar, las envasadas en PVC no presentan alteración respecto al contenido de ácido elágico, manteniendo la calidad nutracéutica. En cuanto a la calidad sensorial, se comprobó que los sólidos solubles, la claridad y pureza del color permanecieron inalterados, mejorando, incluso, un aspecto del color (Chroma) que resultó se más vívido. También se mantuvo el aroma característico de las frutillas.

Las mínimamente procesadas, en cambio, mostraron una disminución en el contenido de ácido elágico respecto a las frutillas sin acondicionar. También disminuyeron los sólidos solubles. En cuanto al color, si bien con el lavado se logra un color más vívido, también es más claro, disminuyendo la pureza del mismo. Otro aspecto negativo es que con el paso del

tiempo, el aroma disminuye notablemente y aparecen *off-odors*. Por lo tanto, se puede decir que el mínimo procesamiento afecta la calidad nutracéutica y sensorial de las frutillas.

El tiempo de almacenamiento afecta el contenido de ácido elágico en las frutillas, disminuyéndolo, pero en menor grado que el mínimo procesamiento.

Como en estos estudios se sugiere que el procesamiento afectaría la calidad de las frutillas, particularmente al contenido de ácido elágico, en las experiencias posteriores se tuvo como objetivo evaluar el efecto del corte y de distintos tipos de lavado sobre el nutracéutico de interés.

3.7 CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS EN FUNCIÓN DEL CORTE Y LAVADO

En las experiencias realizadas se evaluó la reducción del contenido de ácido elágico en el día de procesamiento, en frutillas:

- Enteras sin lavar
- Enteras lavadas con agua destilada
- Enteras lavadas con agua clorada
- Cortadas sin lavar
- Cortadas lavadas con agua destilada
- Cortadas lavadas con agua clorada

Se trabajó con un diseño de bloques completos al azar. Se realizaron 4 repeticiones que se tratan estadísticamente como bloques. Los resultados promedios se presentan en la Tabla 3.55 y los valores individuales de cada muestra se presentan en la Tabla 5.26 del Anexo A.

Con los 108 datos se realizó un ANOVA por variables con interacción, que se presenta en la Tabla 3.56. Las variables consideradas fueron corte, tipo de lavado y bloque.

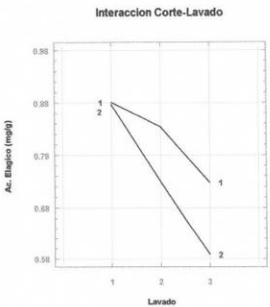
Del análisis del ANOVA, surge que no existen interacciones significativas entre corte-bloque y lavado-bloque, pues en ambos casos se obtuvo $p > 0.05$. Esto significaría que en todos los bloques (4 repeticiones), el efecto del corte y del lavado sobre la pérdida del ácido elágico tuvo similar tendencia. En cambio, sí existe interacción entre corte-lavado, pues en el

caso de las frutillas sin lavar, el corte no incide, siendo el contenido de ácido elágico el mismo tanto en las enteras sin lavar como en las cortadas sin lavar. Cuando se aplican los distintos tipos de lavados, se observa que el corte adquiere importancia. Estos resultados pueden visualizarse en las gráficas de las tres interacciones posibles, que se presentan en la Figura 3.7.

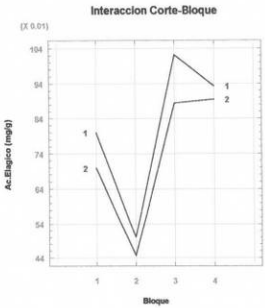
Si se analizan por separado los efectos principales: corte, tipo de lavado y bloque, se ve que existen diferencias muy significativas en los tres casos ($p \leq 0.001$).

Con los resultados del test de diferencia de medias para los distintos cortes, presentados en la Tabla 3.57, se demuestra que existe diferencia entre el contenido de ácido elágico en frutillas enteras y frutillas cortadas, pues el corte produce una disminución en el contenido.

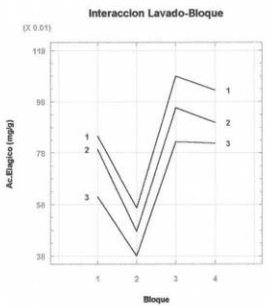
Con el test de diferencia de medias para los distintos tipos de lavado, presentado en la Tabla 3.58, se concluye que existe una disminución en el contenido de ácido elágico al lavar las frutillas con agua, siendo menor aún en las lavadas con agua clorada. Estos resultados nos indican que el lavado produciría un efecto de lixiviación y cuando es con agua clorada, posiblemente se produciría la oxidación del ácido elágico. Estos efectos serían más acentuados en las frutillas cortadas que en las enteras, debido a la rotura celular que produce el corte.



A



B



C

Figura 3.7 Interacciones entre tipo de corte, tipo de lavado y bloque. En A y B: 1. Enteras, 2. Cortadas. En C: 1. Sin lavar, 2. Lavadas con agua y 3. Lavadas con agua clorada

TABLA 3.55

Contenido de ácido elágico en frutillas en función del corte y tipo de lavado

Corte	Lavado	Bloque	Ácido elágico (mg/g peso seco)
Enteras	Sin lavar	1	0.87 (n=5)
		2	0.53 (n=5)
		3	1.10 (n=5)
		4	1.03 (n=3)
Enteras	Lavadas con agua destilada	1	0.84 (n=5)
		2	0.51 (n=5)
		3	1.10 (n=5)
		4	0.86 (n=3)
Enteras	Lavadas con agua clorada	1	0.69 (n=5)
		2	0.45 (n=5)
		3	0.87 (n=5)
		4	0.91 (n=3)
Cortadas	Sin lavar	1	0.82 (n=5)
		2	0.60 (n=5)
		3	1.06 (n=5)
		4	1.02 (n=3)
Cortadas	Lavadas con agua destilada	1	0.75 (n=5)
		2	0.43 (n=5)
		3	0.82 (n=5)
		4	1.14 (n=3)
Cortadas	Lavadas con agua clorada	1	0.52 (n=5)
		2	0.31 (n=5)
		3	0.78 (n=5)
		4	0.72 (n=3)

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.
n: número de muestras

TABLA 3.56

ANOVA para el contenido de ácido elágico en frutillas en función del corte y tipo de lavado

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F	Probabilidad (P justo)
Efectos principales					
A: Corte	0.1753	1	0.1753	23.930	P < 0.0001
B: Lavado	0.8429	2	0.4215	57.523	P < 0.0001
C: Bloque	4.0048	3	1.3349	182.198	P < 0.0001
Interacciones					
AB	0.0890	2	0.0445	6.077	0.0033
AC	0.0393	3	0.0131	1.790	0.1548
BC	0.0381	6	0.0063	0.868	0.5219
Error	5.9375	107			
Total					

TABLA 3.57

Contenido de ácido elágico en frutillas enteras y frutillas cortadas

Tratamiento	N° de Muestras	Ácido elágico (mg/g peso seco)
Enteras	54	0.81a
Cortadas	54	0.73b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

TABLA 3.58

Contenido de ácido elágico en frutillas en función de los distintos tipos de lavado

Tratamiento	N° de Muestras	Ácido elágico (mg/g peso seco)
Sin lavar	36	0.88a
Lavadas con agua destilada	36	0.78b
Lavadas con agua clorada	36	0.66c

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En el test de diferencia de medias para los distintos bloques, presentado en la Tabla 3.59, hay diferencia entre algunos y en otros no. Como ya se señaló anteriormente, esto puede deberse a la gran variabilidad que puede existir en el contenido de este nutracéutico, debido a factores ambientales.

TABLA 3.59

Contenido de ácido elágico en frutillas en función de los distintos bloques

Bloques	N° de Muestras	Ácido elágico (mg/g peso seco)
1	30	0.75a
2	30	0.47b
3	30	0.95c
4	18	0.91c

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En la Figura 3.8 se representa el porcentaje de conservación de ácido elágico en las frutillas en función del corte y del lavado efectuado. Se puede apreciar claramente la disminución que se produce por los efectos ya mencionados.

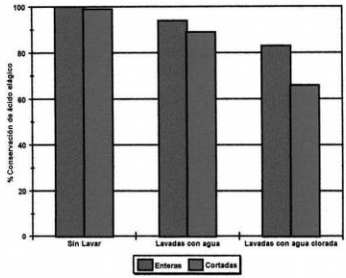


Figura 3.8 Porcentaje de conservación de ácido elágico en frutillas en función del corte y lavado

Como análisis complementarios se determinaron el pH y los sólidos solubles, para evaluar someramente la calidad sensorial luego de los diversos tratamientos. Los resultados promedio para los distintos bloques se presentan en la Tabla 3.60.

Se realizó un ANOVA por variables (corte, lavado, bloque) para los sólidos solubles. Los resultados se presentan en la Tabla 3.61.

De los resultados del análisis de varianza para el contenido de sólidos solubles en frutillas exhibidos en la Tabla 3.61, se infiere que existen diferencias significativas por acción del corte ($p \leq 0.05$), y diferencias muy significativas por efecto del lavado y de los bloques ($p \leq 0.001$).

TABLA 3.60

Sólidos solubles y pH promedio de frutillas en función del corte y tipo de lavado

Corte	Lavado	Bloque	°Brix	pH
Enteras	Sin lavar	1	8.7	3.09
		2	8.0	2.90
		3	9.6	3.16
		4	9.8	3.12
Enteras	Lavadas con agua destilada	1	8.6	3.09
		2	7.7	2.79
		3	9.2	3.17
		4	9.4	3.12
Enteras	Lavadas con agua clorada	1	8.2	3.09
		2	7.2	2.79
		3	9.0	3.17
		4	9.0	3.13
Cortadas	Sin lavar	1	8.6	3.07
		2	8.0	2.90
		3	10.0	3.16
		4	9.8	3.12
Cortadas	Lavadas con agua destilada	1	8.0	3.07
		2	7.2	2.79
		3	9.0	3.07
		4	9.2	3.12
Cortadas	Lavadas con agua clorada	1	7.2	3.07
		2	6.8	2.90
		3	8.8	3.17
		4	8.8	3.12

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.

TABLA 3.61

ANOVA para el contenido de sólidos solubles en frutillas en función del corte y tipo de lavado

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F	Probabilidad (P justo)
Efectos principales					
A: Corte	0.3750	1	0.3750	8.217	0.0107
B: Lavado	3.5325	2	1.7662	38.702	P < 0.0001
C: Bloque	14.2417	3	4.7472	104.021	P < 0.0001
Error	0.7758	17	0.0156		
Total	18.9250	23			

TABLA 3.62

Sólidos solubles en frutillas en función del corte

Tratamiento	N° de Muestras	°Brix
Enteras	12	8.70a
Cortadas	12	8.45b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

TABLA 3.63

Sólidos solubles en frutillas en función del lavado

Tratamiento	N° de Muestras	°Brix
Sin lavar	8	9.06a
Lavadas con agua	8	8.54b
Lavadas con agua clorada	8	8.12c

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

TABLA 3.64

Sólidos solubles en frutillas en función de los distintos bloques

Bloque	N° de Muestras	°Brix
1	6	8.22a
2	6	7.48b
3	6	9.27c
4	6	9.33c

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Del test de diferencia de medias para los sólidos solubles en frutillas en función del corte se demuestra que las frutillas enteras mantienen más elevados los sólidos solubles. Como se sabe, el corte en los productos mínimamente procesados produce generalmente un aumento en la intensidad respiratoria, lo que significa que los azúcares presentes se irán consumiendo por la cinética respiratoria.

Analizando el test de diferencia de medias para los sólidos solubles en frutillas en función de los lavados, se observa claramente una disminución por efecto del mismo, y esa disminución es más notoria cuando se hace el lavado con agua clorada.

La diferencia de medias para los sólidos solubles en frutillas en función de los bloques es por la variabilidad normal de las frutillas cosechadas en diferentes épocas.

De estos estudios se concluye que el corte y lavado provocan una disminución de la calidad nutracéutica y sensorial de las frutillas, siendo más acentuada esta pérdida cuando se emplea agua clorada.

3.8 CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO EN FRUTILLAS MÍNIMAMENTE PROCESADAS EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO CON UNA SOLUCIÓN ANTIOXIDANTE

Como el lavado con agua clorada disminuye considerablemente el contenido de ácido elágico en las frutillas, especialmente sobre las cortadas, se evaluó cómo afecta el tratamiento con una solución antioxidante a la preservación de ácido elágico. Se trabajó con una solución de $CaCl_2$ 1 %, ácido ascórbico 1% y ácido cítrico 0,5 %, similar a la utilizada en la industria, para inhibir el pardeamiento y mantener la firmeza.

El $CaCl_2$ retarda el ablandamiento y retiene la vitamina C, y al igual que el ácido ascórbico y el ácido cítrico, reduce el amarronamiento (Watada, 1997; Rosen y Kader, 1989).

Se realizaron varias experiencias en las que se evaluó el contenido de ácido elágico en frutillas cortadas:

- Sin lavar
- Lavadas con agua destilada
- Lavadas con agua clorada
- Tratadas con solución antioxidante

Se trabajó con un diseño de bloques completos al azar, donde cada bloque correspondió a un momento diferente de realización de la experiencia. Los resultados promedio se presentan en la Tabla 3.65 y los individuales, en la Tabla 5.27 del Anexo A.

Se realizó un ANOVA por variables con interacción, que se presenta en la Tabla 3.66. Las variables consideradas fueron tipo de tratamiento y bloque (repeticiones de experiencias).

De los valores obtenidos, surge que no existe interacción significativa entre tratamiento y bloque, pues se obtuvo $p > 0.05$, vale decir que en todas las repeticiones la tendencia del efecto de los tratamientos es la misma. Este resultado se puede visualizar en la gráfica de interacción, que se presenta en la Figura 3.9.

Si se analizan por separado los efectos principales, se observa que en el tipo de tratamiento existen diferencias muy significativas ($p \leq 0.001$). Entre los bloques no hay diferencia significativa, pues en este caso en particular, el contenido de ácido elágico en frutillas en las dos experiencias fue similar.

TABLA 3.65

Contenido de ácido elágico promedio en frutillas en función del lavado y el tratamiento con una solución antioxidante

Tratamiento	Bloque	Ácido elágico (mg/g peso seco)
Sin lavar	1	1.06 (n=5)
	2	1.02 (n=3)
Lavadas con agua	1	0.82 (n=5)
	2	1.14 (n=3)
Lavadas con cloro	1	0.78 (n=5)
	2	0.72 (n=3)
Tratadas con solución antioxidante	1	1.19 (n=8)
	2	1.12 (n=4)

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.
n: indica el número de muestras

TABLA 3.66

ANOVA para el contenido de ácido elágico en frutillas en función del lavado y el tratamiento con una solución antioxidante

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F	Probabilidad (P justo)
Efectos principales					
A: Tratamiento	0.8190	3	0.2730	41.673	P < 0.0001
B: Bloque	0.0007	1	0.0007	0.109	0.7474
Interacciones					
AB	0.0478	3	0.0159	2.431	0.0861
Error	0.1834	28	0.0065		
Total	1.1853	35			

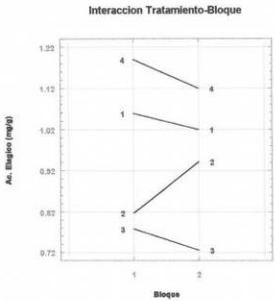


Figura 3.9 Interacción entre tipo de tratamiento y bloque. 1. Sin lavar, 2. Lavadas con agua destilada, 3. Lavadas con agua clorada y 4. Tratadas con solución antioxidante

Con los resultados del test de diferencia de medias para los distintos tipos de tratamientos presentados en la Tabla 3.67, se demuestra que existe diferencia entre el contenido de ácido elágico en frutillas cortadas sin lavar, lavadas con agua, lavadas con cloro, y tratadas con solución antioxidante.

TABLA 3.67

Test de diferencia de medias para el contenido de ácido elágico en frutillas cortadas en función de los distintos tipos de lavado y tratamiento con una solución antioxidante

Tratamiento	N° de Muestras	Ácido elágico (mg/g peso seco)
Sin lavar	8	1.04a
Lavadas con agua destilada	8	0.88b
Lavadas con agua clorada	8	0.75c
Tratadas con solución antioxidante	12	1.15d

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En la Figura 3.10 se grafica el porcentaje de conservación de ácido elágico en frutillas cortadas en función de los tipos de lavado y del tratamiento con una solución antioxidante.

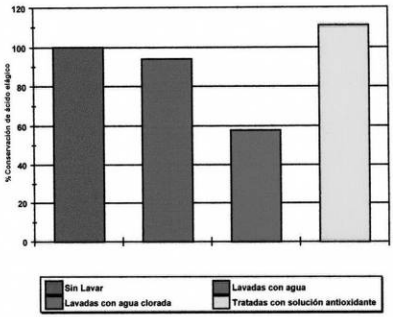


Figura 3.10 Porcentaje de conservación de ácido elágico en frutillas cortadas en función de los tipos de lavado y del tratamiento con una solución antioxidante

En la Tabla 3.67 y en la Figura 3.10 se observa claramente una disminución en el contenido de ácido elágico cuando las frutillas son lavadas con agua destilada, y más aún cuando son lavadas con agua clorada frente a las sin lavar. En el caso de las frutillas lavadas con agua destilada, la disminución puede deberse a un efecto de lixiviación del líquido sobre la fruta cortada y en el caso de las frutillas lavadas con agua clorada se podría sumar el poder oxidante del cloro que acentúa aún más la degradación del ácido elágico. Pero también se observa que en las frutillas tratadas con solución antioxidante, el ácido elágico no es afectado, incluso los valores son mayores estadísticamente a los de las frutillas sin lavar. Este último resultado nos podría indicar que la solución antioxidante protege al ácido elágico, frente a las sin tratar, que al ser procesadas hasta puré para poder realizar la determinación espectrofotométrica podrían perder parte del ácido elágico presente en la frutilla. Otra posibilidad podría ser que se produzca alguna interferencia por parte del antioxidante en la detección de este fitoquímico. Para estudiar esta posibilidad, se realizó otra experiencia que consistió en determinar el contenido de ácido elágico en una matriz vegetal. Para eso se

trabajó con una fruta en la que de antemano se sabe que el contenido es mínimo, tratada con la solución antioxidante, lo cual se detalla en el punto 3.8.

Para evaluar la calidad sensorial se determinaron los sólidos solubles en frutillas para cada tipo de tratamiento. Los resultados se presentan en la Tabla 3.68.

TABLA 3.68

Sólidos solubles en frutillas mínimamente procesadas en función de los distintos tipos de lavado y del tratamiento con una solución antioxidante

Tratamiento	Bloque	°Brix
Sin lavar	1	10.0
	2	9.8
Lavadas con agua destilada	1	9.0
	2	9.2
Lavadas con agua clorada	1	8.8
	2	8.8
Tratadas con solución antioxidante	1	9.0
	2	9.0

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.

Se realizó un ANOVA de una vía (Tabla 3.69) y el test de diferencia de medias para los distintos tratamientos (Tabla 3.70) para analizar el comportamiento de los sólidos solubles.

De los test de diferencia de medias de los sólidos solubles se ve que el lavado de las frutillas cortadas ocasiona la pérdida de sólidos solubles, principalmente cuando se usa agua clorada. Cuando se tratan las frutillas con solución antioxidante, el comportamiento es similar al del agua destilada. Eso sugiere que la solución antioxidante provocaría lixiviación de los sólidos solubles, al igual que el agua destilada, pero protegería la pérdida de nutrientes respecto de la acción nociva del agua clorada.

TABLA 3.69

ANOVA para el contenido de sólidos solubles en frutillas en función del tipo de lavado y del tratamiento con una solución antioxidante

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	F	Probabilidad (P justo)
Efectos principales					
A: Lavado	1.4000	3	0.4667	35.000	0.0078
B: Bloque	0.0000	1	0.0000	0.000	1.0000
Error	0.0400	3	0.0133		
Total	1.4400	7			

TABLA 3.70

Test de diferencia de medias para los sólidos solubles en frutillas en función de los distintos tipos de lavado y del tratamiento con una solución antioxidante

Tratamiento	N° de Muestras	°Brix
Sin lavar	2	9.9a
Lavadas con agua destilada	2	9.1b
Lavadas con agua clorada	2	8.8c
Tratadas con solución antioxidante	2	9.0b

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

3.9 EVALUACIÓN DE INTERFERENCIAS EN LA REACCIÓN DE WILSON-HAGERMAN POR EFECTO DEL TRATAMIENTO CON UNA SOLUCIÓN ANTIOXIDANTE

A fin de determinar si el mayor contenido de ácido elágico detectado en frutillas tratadas con un solución antioxidante respecto a las frutillas sin ningún tipo de tratamiento, se debía a alguna interferencia (por parte de los productos utilizados) en la reacción de Wilson-Hagerman, se procedió a determinar el contenido de ácido elágico en bananas sin tratar (cuyo contenido en ácido elágico es despreciable) como así también en bananas cortadas en rodajas y tratadas con la misma solución antioxidante que las frutillas. Cabe aclarar que la función de la banana es proveer una matriz vegetal para evaluar la presencia de alguna interferencia.

Todas las muestras superaron el límite de cuantificación del método (LQD = 0.30 ppm). El contenido de ácido elágico promedio en las bananas en función del tratamiento se presentan en la tabla 3.71, los datos individuales se presentan en la Tabla 5.29 del Anexo A.

TABLA 3.71

Contenido promedio de ácido elágico en bananas en función del tratamiento con una solución antioxidante.

Tratamiento	Ácido elágico* (mg/g peso seco)
Sin tratar	0.02 ± 0.003
Cortadas y tratadas con solución antioxidante	0.03 ± 0.004

(*) Valores promedios ± s

Como se ve en los resultados, el contenido de ácido elágico es mayor en las bananas tratadas con la solución antioxidante. La diferencia es de 0.01 mg/g peso seco. Si consideramos ambas matrices vegetales (frutilla y banana), podríamos decir que la interferencia, de existir, debería ser la misma en los dos casos (tener en cuenta que los resultados siempre se expresan en base seca), es decir, por cada gramo de peso seco de cualquier matriz se detectaría 0.01 mg de interferencia. En las frutillas, sin embargo, el incremento fue de 0.11 mg/gr peso seco. Por lo tanto hay 0.10 mg/gr peso seco que no se deben a interferencias de la reacción espectrofotométrica.

Se podría deducir, por lo tanto, que el aumento en el contenido de ácido elágico detectado en las frutillas tratadas con solución antioxidante se debería a que ésta solución protegería al ácido elágico cuando las frutillas son procesadas hasta puré, en la preparación de las muestras para la determinación espectrofotométrica de Wilson-Hagerman.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Respecto a la técnica analítica utilizada

El método espectrofotométrico de Wilson-Hagerman para la cuantificación de ácido elágico en frutillas, es una técnica laboriosa en las etapas preparativas (previo a la reacción especifica de color) que exige suma atención en cada una de ellas. Aún así fue la elegida, ya que la técnica alternativa (HPLC) exige similar preparación de la muestra y la disponibilidad del instrumento.

Los parámetros de validación del método estudiados fueron: la linealidad, referida a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta, la precisión, la exactitud, y la sensibilidad a través de la evaluación de los límites de detección y de cuantificación.

En cuanto a la linealidad de las curvas de calibrado, en todos los casos se obtuvieron coeficientes de correlación adecuados ($r > 0.9983$) y los análisis de varianza indicaron que la adopción del modelo lineal fue adecuada para representar la dependencia de la concentración del analito con su absorbancia.

La precisión respecto al sistema resultó aceptable para determinaciones por triplicado (RSD < 4.24 %), y en cuanto al método, por tratarse de un micronutriente, los resultados obtenidos también resultaron adecuados (RSD < 8 %).

Respecto a la exactitud del método, expresada a través del porcentaje de recuperación, se encontró que los valores están dentro de lo esperado para este tipo de analito (% R ≡ 62 %).

En cuanto a la sensibilidad del método, el límite de detección y el de cuantificación fueron de 0.09 ppm y 0.31 ppm, respectivamente.

Se encontró que los tiempos empleados para cada etapa de la secuencia utilizada en la técnica de análisis provocaba diferencias en los resultados, de modo que para que los mismos sean comparables, se adoptó un esquema de tareas durante 3 días consecutivos, el que se respetó a lo largo de todo el trabajo.

Se demostró además, que la solución antioxidante utilizada para proteger a la frutilla del amarronamiento y del ablandamiento no producía interferencias.

Respecto al ácido elágico en frutillas

Se demostró la importancia de la contribución de la frutilla en el aporte de ácido elágico (103 % del aporte diario recomendado) cuando se compara con igual peso de otras frutas.

Se comprobó que las semillas de frutillas contienen más ácido elágico que la pulpa, tal como lo hallaron otros investigadores.

Para las frutillas producidas en la zona de Coronda, se encontró que el contenido de ácido elágico difiere según la variedad y grado de madurez, siendo el contenido mayor en las verdes que en las maduras, mientras que las variedades Chandler, Camarosa y Sweet Charly presentaron niveles más elevados que las variedades Oso Grande y Milsei.

A través del estudio del ácido elágico en frutillas variedad Camarosa, en distintas fechas de cosecha durante dos temporadas, quedó demostrada la importante variabilidad de las frutas debida a factores ambientales. Se observó también, una disminución en el contenido de ácido elágico en los meses de mayor producción.

Cuando se evaluó el contenido de ácido elágico en función del tipo de presentación, se observó que en relación a las frutillas sin acondicionar, las envasadas en PVC no presentaron alteración respecto al contenido de ácido elágico, manteniendo la calidad nutracéutica. En cuanto a la calidad sensorial, se comprobó que los sólidos solubles, la claridad (L*) y pureza (Hue) del color permanecieron inalterados y fue mejor, incluso, la saturación del color

(Chroma) que resultó ser más vívido. Además, se mantuvo el aroma característico de las frutillas.

Las frutillas mínimamente procesadas, en cambio, mostraron una disminución del 28 % en el contenido de ácido elágico respecto a las frutillas sin acondicionar. También disminuyeron los sólidos solubles. En cuanto al color, el procesamiento permitió obtener frutillas mas vívidas (mayor saturación), pero menos rojas (mayor ángulo de tono) y mas claras (mayor claridad), seguramente por acción del cloro sobre los pigmentos. Otro aspecto negativo fue que el aroma disminuyó notablemente y aparecieron, con el paso del tiempo, *off-odors*. Por lo tanto, se puede decir que el mínimo procesamiento afectó la calidad nutracéutica y sensorial de las frutillas.

El tiempo de almacenamiento afectó el contenido de ácido elágico en las frutillas, disminuyéndolo.

Cuando se evaluó el contenido de ácido elágico en frutillas en función del corte y del lavado, se concluyó que los mismos provocaron una disminución de la calidad nutracéutica y sensorial de las frutillas, siendo más acentuada esta pérdida cuando se empleó agua clorada, pues al efecto de lixiviación de los lavados sumó su acción oxidante.

Se estudió en las frutillas mínimamente procesadas el efecto del tratamiento de una solución antioxidante similar a las utilizadas en la industria, para inhibir el pardeamiento y mantener la firmeza, compuesta por 1 % de $CaCl_2$, 1% de ácido ascórbico y 0,5 % de ácido cítrico. Se detectaron, en las frutillas cortadas y tratadas con esta solución, valores superiores a los de las frutillas sin lavar. Esta aparente paradoja se podría explicar ya que la solución antioxidante protegería al ácido elágico en el momento en que se procesan las frutillas hasta puré para realizar la determinación de este nutracéutico. Lo mismo ocurrió con los sólidos solubles, que si bien sufren cierto grado de lixiviación, son protegidos de la oxidación. Por lo que se sugiere que el tratamiento con esta solución antioxidante mejora la calidad nutracéutica y conserva la calidad sensorial de las frutillas.

Como actividad futura, sería conveniente seguir profundizando el estudio sobre cómo es afectado el ácido elágico por las distintas condiciones de conservación durante la postcosecha y comercialización (temperatura, atmósferas, etc). Respecto a las frutillas mínimamente procesadas resultaría interesante estudiar la preservación del ácido elágico cuando las mismas son solamente despalilladas, lavadas y tratadas con solución antioxidante,

evitando la operación de corte. Ello es posible porque la frutilla es una fruta de pequeño tamaño y puede perfectamente presentarse para el consumo como tal.

También resulta de interés, en función de los resultados obtenidos, estudiar la acción de diferentes soluciones antioxidantes sobre frutillas y evaluar el efecto de otros agentes sanitizantes como H_2O_2, ozono o ácido paracético que representan alternativas en la preparación de frutas y hortalizas minimamente procesadas.

ANEXOS

TABLA 5.1

Valores individuales de la curva de calibrado N°1

Absorbancia neta (ΔA_{538})	Concentración (ppm)
0.065	
0.070	1.5
0.065	
0.132	
0.125	3
0.137	
0.265	
0.253	6
0.266	
0.415	
0.414	9
0.412	
0.552	
0.582	12
0.571	
0.678	
0.673	15
0.726	
0.817	
0.839	18
0.867	
0.953	
0.954	21
0.932	
1.090	
1.106	24
1.081	
1.222	
1.174	27
1.225	
1.376	
1.380	30
1.395	

TABLA 5.2

Valores individuales de la curva de calibrado N°2

Absorbancia neta (ΔA_{538})	Concentración (ppm)
0.066	
0.058	1.5
0.061	
0.142	
0.133	3.0
0.134	
0.255	
0.251	6.0
0.251	
0.386	
0.407	9.0
0.395	
0.554	
0.522	12.0
0.521	
0.703	
0.716	15.0
0.701	
0.782	
0.761	18.0
0.766	
0.952	
0.964	21.0
0.866	
1.116	
1.089	24.0
1.062	
1.228	
1.233	27.0
1.229	
1.336	
1.332	30.0
1.364	

TABLA 5.3

Valores individuales de la curva de calibrado N°3

Absorbancia neta (ΔA_{638})	Concentración (ppm)
0.078	
0.078	1.5
0.080	
0.136	
0.136	3.0
0.139	
0.288	
0.268	6.0
0.258	
0.439	
0.445	9.0
0.438	
0.607	
0.594	12.0
0.605	
0.748	
0.699	15.0
0.745	
0.902	
0.894	18.0
0.900	
1.053	
1.061	21.0
1.057	
1.192	
1.159	24.0
1.175	
1.300	
1.301	27.0
1.301	
1.441	
1.441	30.0
1.441	

TABLA 5.4

Valores individuales para el cálculo de RSD para la concentración 15 ppm de las curvas de calibrado 1, 2 y 3

Curva	Promedio	s	RSD
1	15.16	0.643	4.24
2	15.67	0.352	2.24
3	14.96	0.561	3.75

TABLA 5.5

Valores individuales para el cálculo de RSD del método para frutillas verdes y maduras

Frutillas	Ácido elágico (mg/g peso seco)	Promedio	s	RSD
Verdes	1.23	1.21	0.075	6.20 %
	1.12			
	1.27			
	1.24			
	1.10			
	1.28			
Maduras	0.92	0.84	0.064	7.62 %
	0.86			
	0.82			
	0.75			
	0.83			

TABLA 5.6
Contenido de ácido elágico, con el ΔA y su correspondiente concentración obtenida de gráfica, para frutas de consumo masivo

Fruta	ΔA	C gráfica	Acido elágico (mg/g peso seco)
	0.053	1.03	0.06
Ananá	0.066	1.31	0.08
	0.030	0.53	0.03
	0.016	0.23	0.00*
	0.076	1.52	0.03
	0.044	0.83	0.02
Banana	0.048	0.92	0.02
	0.035	0.64	0.02
	0.046	0.87	0.02
	0.002	-0.07	0.00*
	0.090	1.82	0.08
Ciruela	0.057	1.11	0.06
	0.061	1.20	0.07
	0.060	1.18	0.06
Kiwi	0.004	-0.03	0.00*
	0.006	0.01	0.00*
	0.053	1.03	0.04
Mandarina	0.002	-0.07	0.00*
	0.000	-0.12	0.00*
	0.014	0.19	0.01*
Manzana Roja	0.019	0.30	0.02*
	0.002	-0.07	-0.01*
	0.014	0.19	0.01*
	0.028	0.49	0.04
Manzana Verde	0.067	1.33	0.10
	0.002	-0.07	-0.01*
	0.000	-0.12	-0.01*
Pera	0.036	0.66	0.05

	0.031	0.55	0.04
	0.353	7.69	0.77
	0.386	8.41	0.69
Frutilla	0.356	7.75	0.71
	0.422	9.20	0.77
	0.378	8.24	0.82
	0.453	9.88	0.83

* Muestras a descartar, pues su C gráfica son inferiores al límite de cuantificación

TABLA 5.7

Contenido de ácido elágico para distintos grados de madurez en frutillas variedad Camarosa

		Acido elágico (mg/g peso seco)		
Pool	**N° de determinación**	**0 % color rojo**	**50 % color rojo**	**100 % color rojo**
	1	2.53	1.87	1.43
1	2	-	-	1.19
	3	1.99	1.64	1.16
	1	0.94	0.63	0.48
2	2	1.23	0.46	0.18
	3	1.12	0.58	0.51
	4	1.27	0.44	0.28
3	5	1.24	0.95	0.41
	6	1.10	0.59	0.49
	7	1.28	1.03	0.27
4	8	0.99	1.37	0.21
	9	1.09	1.00	0.11
	10	0.99	0.67	0.24
5	11	1.84	1.01	0.29
	12	1.63	0.86	0.13
	13	0.94	0.68	0.13
6	14	1.06	0.67	0.15
	15	0.84	0.62	0.13
	16	1.23	1.22	0.81
7	17	1.18	0.63	0.86
	18	1.42	0.81	0.99
	19	1.68	0.96	0.71
8	20	1.93	1.00	0.37
	21	1.95	1.30	0.39

TABLA 5.8

Contenido de ácido elágico para distintos grados de madurez en frutillas variedad Chandler

		Acido elágico (mg/g peso seco)		
Pool	**N° de determinación**	**0 % color rojo**	**50 % color rojo**	**100 % color rojo**
1	1	2.19	1.00	0.17
	2	2.72	1.30	0.27
	3	2.12	1.12	0.29
2	4	2.05	1.04	0.27
	5	2.85	1.24	0.28
	6	2.10	1.19	-
3	7	2.28	0.67	0.61
	8	1.75	2.00	1.11
	9	1.78	1.86	0.71
4	10	2.34	0.95	0.45
	11	1.94	0.41	0.70
	12	1.87	1.28	0.70
5	13	1.59	0.64	0.20
	14	1.97	0.80	0.49
	15	1.54	0.64	0.19

TABLA 5.9

Contenido de ácido elágico para distintos grados de madurez en frutillas variedad Sweet Charly

		Acido elágico (mg/g peso seco)		
Pool	**N° de determinación**	**0 % color rojo**	**50 % color rojo**	**100 % color rojo**
1	1	1.05	0.15	0.16
	2	1.18	0.34	0.15
	3	1.11	0.32	0.22
2	4	1.18	0.45	0.46
	5	1.77	0.24	0.19
	6	1.45	0.59	0.30
3	7	1.10	0.78	0.54
	8	1.65	1.63	0.60
	9	1.54	0.65	0.61
4	10	1.32	0.69	0.70
	11	1.22	0.72	0.50
	12	1.42	0.66	0.70
5	13	1.07	0.79	0.32
	14	0.78	0.84	0.41
	15	0.94	0.61	0.42

TABLA 5.10

Contenido de ácido elágico para distintos grados de madurez en frutillas variedad Oso Grande

		Acido elágico (mg/g peso seco)		
Pool	**N° de determinación**	**0 % color rojo**	**50 % color rojo**	**100 % color rojo**
1	1	0.67	0.26	0.06
	2	0.56	0.25	0.10
	3	0.14	0.34	0.07
2	4	0.41	0.37	0.17
	5	0.98	0.19	0.16
	6	0.37	0.16	0.24
3	7	0.55	0.17	0.08
	8	0.54	0.08	0.12
	9	0.56	0.20	0.11
4	10	1.94	0.83	0.17
	11	1.64	0.48	0.28
	12	1.71	0.58	0.18
5	13	2.15	0.83	0.35
	14	1.37	1.71	0.45
	15	1.26	0.90	0.51

TABLA 5.11

Contenido de ácido elágico para distintos grados de madurez en frutillas variedad Milsei

		Acido elágico (mg/g peso seco)		
Pool	**N° de determinación**	**0 % color rojo**	**50 % color rojo**	**100 % color rojo**
1	1	1.21	0.37	0.14
	2	1.39	0.39	0.22
	3	1.62	0.38	0.15
2	4	1.35	0.27	0.24
	5	1.59	0.69	0.22
	6	1.55	0.50	0.24
3	7	1.96	0.52	0.02
	8	1.83	0.47	0.03
	9	1.92	0.53	0.15

TABLA 5.12

Valores de sólidos solubles y pH para la variedad Camarosa en distintos grados de madurez

	0 % color rojo		50 % color rojo		100 % color rojo	
Pool	°Brix	pH	°Brix	pH	°Brix	pH
1	5.8	3.50	7.2	3.50	7.4	3.60
2	6.2	3.47	7.2	3.49	7.6	3.57
3	6.4	3.46	7.6	3.56	8.0	3.57
4	6.0	3.19	7.4	3.10	9.6	3.32
5	6.0	3.19	7.6	3.09	9.8	3.39
6	6.2	3.41	7.6	3.30	8.4	3.61
7	5.4	2.92	6.2	3.02	8.6	3.10
8	6.0	2.48	7.6	2.38	8.8	2.57

TABLA 5.13

Valores de sólidos solubles y pH para la variedad Chandler en distintos grados de madurez

	0 % color rojo		50 % color rojo		100 % color rojo	
Pool	°Brix	pH	°Brix	pH	°Brix	pH
1	5.2	3.20	6.5	3.29	6.8	3.58
2	5.0	3.38	6.2	3.39	6.6	3.58
3	5.6	2.92	7.2	2.84	8.0	3.10
4	5.8	2.92	7.0	2.83	8.0	3.12
5	5.8	2.56	7.8	2.46	8.4	2.56

TABLA 5.14

Valores de sólidos solubles y pH para la variedad Sweet Charly en distintos grados de madurez

	0 % color rojo		50 % color rojo		100 % color rojo	
Pool	°Brix	pH	°Brix	pH	°Brix	pH
1	6.8	3.67	8.2	3.67	8.0	3.77
2	6.6	3.39	7.6	3.30	8.4	3.50
3	6.0	3.11	7.0	3.11	7.4	3.14
4	6.0	3.12	7.0	3.10	7.6	3.15
5	6.5	2.66	8.0	2.67	8.8	2.86

TABLA 5.15

Valores de sólidos solubles y pH para la variedad Oso Grande en distintos grados de madurez

	0 % color rojo		50 % color rojo		100 % color rojo	
Pool	°Brix	pH	°Brix	pH	°Brix	pH
1	5.4	3.41	6.2	3.31	6.4	3.41
2	5.2	3.41	5.8	3.31	6.4	3.50
3	5.0	3.41	6.3	3.31	6.7	3.41
4	5.8	3.41	6.8	3.30	7.4	3.51
5	6.0	2.48	7.0	2.65	8.0	2.94

TABLA 5.16

Valores de sólidos solubles y pH para la variedad Milsei en distintos grados de madurez

	0 % color rojo		50 % color rojo		100 % color rojo	
Pool	°Brix	pH	°Brix	pH	°Brix	pH
1	5.2	3.20	7.5	3.09	8.0	3.29
2	5.1	3.28	7.2	3.09	8.4	3.29
3	5.4	3.31	6.8	3.30	7.2	3.39

TABLA 5.17

Contenido de ácido elágico en frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento

		Ácido elágico (mg / gr peso seco)		
Presentación	**Bloque**	**Día 0**	**Día 2**	**Día 7**
Sin acondicionamiento	1	0.67	0.72	0.64
		0.78	0.64	0.62
		0.62	0.60	0.60
		0.68	0.79	0.51
Envasada en PVC	1	0.67	0.43	0.61
		0.78	0.44	0.46
		0.62	0.41	0.51
		0.68	0.48	0.45
Mínimamente procesadas	1	0.48	0.20	0.29
		0.42	0.28	0.43
		0.50	0.30	0.29
		0.40	0.35	0.37
Sin acondicionamiento	2	1.58	1.05	1.34
		1.24	0.92	1.27
		2.30	0.98	0.99
		1.50	1.08	1.35
		1.30		
		1.55		
Envasada en PVC	2	1.58	1.17	1.18
		1.24	0.92	1.19
		2.30	1.19	1.03
		1.50	1.09	1.01
		1.30		
		1.55		
Mínimamente procesadas	2	1.31	0.98	1.25
		0.94	1.03	1.12
		0.90	0.96	0.75
		0.85	1.09	1.36
		1.11		
		1.01		

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.

TABLA 5.18

pH de cada *pool* de frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento

Tipo de Presentación	Bloque	pH		
		Día 0	Día 2	Día 7
Sin acondicionamiento	1	2.98	3.07	2.94
		2.98	3.07	3.05
	2	3.27	3.19	3.18
		3.27	3.09	3.28
Envasada en PVC	1	2.98	3.07	3.05
		2.98	3.07	3.02
	2	3.27	3.17	3.28
		3.27	3.09	3.28
Mínimamente procesadas	1	2.98	3.18	3.16
		2.98	3.07	3.09
	2	3.27	3.30	3.39
		3.27	3.20	3.39

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.

TABLA 5.19

Sólidos solubles de cada *pool* de frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento

		°Brix		
Tipo de Presentación	**Bloque**	**Día 0**	**Día 2**	**Día 7**
Sin acondicionamiento	1	7.8 7.8	9.0 8.8	9.2 9.0
	2	7.6 7.6	8.0 8.2	8.6 8.6
Envasada en PVC	1	7.8 7.8	8.2 8.0	8.6 8.8
	2	7.6 7.6	8.0 7.6	8.6 8.6
Mínimamente procesadas	1	7.6 7.6	8.2 8.0	7.6 7.8
	2	7.4 7.4	7.8 7.6	7.0 7.0

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.

TABLA 5.20

Color en frutilla en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento para el bloque 1

Día	Tipo de Presentación	Color				
		L*	a*	b*	Hue	Chroma
		34.81	24.19	11.16	24.77	26.64
		27.00	22.99	10.71	24.98	25.36
		40.90	27.10	15.49	29.75	31.21
		39.77	24.30	12.05	26.38	27.12
		37.62	21.60	9.75	24.29	23.70
		30.73	23.86	13.15	28.86	27.24
		38.73	16.85	6.87	22.18	18.20
		42.89	25.99	19.29	36.58	32.37
		46.33	20.78	19.37	42.99	28.41
		38.95	21.50	7.46	19.14	22.76
		37.49	23.35	13.86	30.69	37.15
		41.04	26.53	15.94	31.00	30.95
	Sin	31.76	19.94	7.67	21.04	21.36
0	Acondicionamiento	41.14	25.13	16.95	34.00	30.31
		41.35	23.39	16.26	34.81	28.49
		38.65	17.71	7.81	23.80	19.36
		36.86	20.67	8.54	22.45	22.36
		40.72	22.77	14.66	32.77	27.08
		40.09	23.85	15.25	32.60	28.31
		38.85	19.03	8.73	24.64	20.94
		40.84	24.90	13.64	28.71	28.39
		36.07	19.93	8.36	22.76	21.61
		37.52	21.79	9.93	24.50	23.95
		42.81	22.77	18.56	39.18	29.38
		41.64	20.84	11.64	29.19	23.87
		36.61	23.18	13.79	30.75	26.97
		37.53	19.51	8.57	23.71	21.31
		38.10	22.36	11.52	27.26	25.15
		39.05	25.80	11.51	24.04	28.25
		41.14	29.01	18.19	32.09	34.24
		36.30	20.70	9.14	23.82	22.63
		38.57	16.83	7.27	23.36	18.33
		36.33	15.11	4.00	14.83	15.63
0	Envasadas en PVC	33.66	20.23	9.59	25.36	22.39
		40.77	26.20	15.47	30.56	30.43
		48.67	20.88	22.32	46.91	30.56
		43.38	26.95	20.13	36.76	33.64

0	Envasadas en PVC	38.81	23.41	12.00	27.14	26.31
		36.05	19.75	7.27	20.21	21.05
0	Mínimamente Procesadas	ND	ND	ND	ND	ND
2	Sin Acondicionamiento	33.86	21.78	9.66	23.92	23.83
		33.69	22.08	9.91	24.17	24.20
		33.35	30.39	9.31	17.03	31.78
		35.01	20.37	10.27	26.76	22.81
		37.09	22.40	14.75	33.36	26.82
		33.70	19.23	9.21	25.59	21.32
		38.36	21.64	14.13	33.14	25.84
		41.93	19.62	16.65	40.32	25.73
		36.35	15.63	7.27	24.94	17.24
		33.97	16.26	6.10	20.56	17.37
		36.34	21.17	11.48	28.47	24.08
		36.99	19.02	8.99	25.30	21.04
		36.16	17.52	6.89	21.47	18.83
		39.76	21.72	10.94	26.73	24.32
		35.55	18.17	8.93	26.17	20.25
		34.69	21.89	9.67	23.83	23.93
		37.65	10.31	10.16	44.58	14.47
		34.06	17.43	7.24	22.56	18.87
		35.53	23.08	14.05	31.33	27.02
		32.46	23.68	18.18	37.51	29.85
		37.92	19.70	11.00	29.18	22.56
		38.68	19.75	10.56	28.13	22.40
		38.04	19.52	11.29	30.04	22.55
		39.30	19.49	9.79	26.67	21.81
		40.71	20.56	12.16	30.60	23.89
		35.73	16.59	6.51	21.43	17.82
		36.93	21.93	9.40	23.20	23.86
		39.97	22.73	14.65	32.80	27.04
		38.60	21.12	8.38	21.64	22.72
		38.24	19.84	11.63	30.38	23.00
2	Envasadas en PVC	32.83	21.89	9.50	23.46	23.86
		36.10	19.07	9.66	26.86	21.38
		38.02	26.32	12.77	25.88	29.25
		34.12	21.61	12.36	29.77	24.90
		30.70	24.71	10.78	23.57	26.96
		33.32	26.80	14.38	28.22	30.41
		31.82	25.52	13.39	27.69	28.82
		36.62	27.69	21.63	38.00	35.14

		40.27	22.80	14.34	32.17	26.93
		36.25	21.63	8.88	22.32	23.38
		38.49	15.43	8.31	28.31	17.53
		40.49	14.33	7.48	27.56	16.16
		36.40	20.67	10.31	26.51	23.10
		33.72	21.21	8.95	22.88	23.02
		39.13	17.04	8.69	27.02	19.13
		44.61	22.40	19.84	41.53	29.92
		42.93	19.62	16.89	40.72	25.89
		36.29	20.04	9.50	25.36	22.18
2	Envasadas en PVC	34.44	16.99	6.33	20.43	18.13
		37.49	21.75	13.02	30.91	25.35
		34.39	28.86	14.78	28.82	30.66
		36.26	25.44	13.48	27.92	28.79
		32.99	15.61	6.97	24.06	17.10
		33.42	23.95	14.63	31.42	28.06
		33.59	28.18	15.03	28.07	31.94
		34.67	20.54	9.52	24387	22.64
		33.45	21.17	16.40	37.76	26.78
		34.61	10.13	8.04	21.77	21.68
		35.34	24.59	16.31	33.56	29.51
		30.54	21.78	8.99	22.43	23.56
		34.72	27.67	11.02	21.72	29.78
		35.89	32.44	16.63	27.14	36.45
		38.14	21.16	11.13	27.74	23.91
		39.18	26.25	17.80	34.14	31.72
		39.96	30.80	20.25	33.32	36.86
		41.03	28.14	17.95	32.53	33.38
		40.40	25.67	15.23	30.68	29.85
		34.68	22.75	9.79	23.28	24.77
		40.85	21.32	16.27	37.35	26.82
		39.83	26.48	13.86	27.63	29.89
		41.46	25.45	16.44	32.86	30.30
		37.97	27.47	13.36	25.94	30.55
		40.49	26.07	15.99	31.52	30.58
		38.96	28.93	18.17	32.13	34.16
		38.60	26.83	14.26	27.99	30.38
	Mínimamente	35.79	29.46	13.97	25.37	32.60
2	Procesadas	45.55	23.02	22.45	44. 28	32.15
		33.64	16.82	4.58	15.2 3	17.43
		31.95	27.75	11.49	22.49	30.03
		39.82	22.98	14.25	31.80	27.04
		43.19	20.76	16.34	38.21	26.42
		39.81	24.46	15.12	31.72	28.76

		38.00	20.62	8.92	23.39	22.47
		38.99	26.37	14.07	28.08	28.89
	Mínimamente	42.40	24.68	17.85	35.88	30.46
2	Procesadas	40.02	26.11	13.95	28.11	29.60
		39.60	24.00	13.81	29.92	27.69
		40.84	19.71	13.95	35.29	24.15
		43.02	24.61	20.96	40.42	32.33
		35.90	21.16	8.54	21.98	22.82
		35.57	22.57	9.89	23.66	24.64
		38.62	23.39	12.75	28.59	26.64
		34.12	26.75	12.52	25.08	29.53
		38.30	23.81	14.01	30.47	27.63
		39.53	27.23	13.87	26.99	30.56
		37.80	28.11	14.56	27.38	31.66
		38.66	14.61	7.40	26.86	16.38
		37.56	14.92	7.78	27.54	16.83
		41.13	23.49	16.78	35.54	28.87
		36.01	19.62	10.09	27.22	22.06
		36.53	19.94	9.09	24.51	21.91
		40.90	21.98	18.17	39.58	28.52
		37.86	21.37	10.65	26.49	23.88
		36.34	23.39	12.46	27.04	26.50
		37.77	25.09	16.06	32.62	29.79
7	Sin Acondicionamiento	37.14	22.67	13.25	30.31	26.26
		35.51	21.10	8.85	22.75	22.88
		39.06	18.22	11.11	31.37	21.34
		37.01	18.66	7.34	21.47	20.05
		39.14	22.43	11.13	26.39	25.04
		41.87	24.64	18.45	36.83	30.78
		40.80	23.53	15.78	33.85	28.33
		39.64	18.53	12.41	33.81	22.30
		41.11	20.40	13.43	33.36	24.42
		38.86	20.76	11.32	28.60	23.65
		35.80	16.18	7.63	25.25	17.89
		36.32	20.69	11.89	29.88	23.86
		36.49	17.05	8.44	26.34	19.02
		36.45	15.98	6.99	23.63	17.44
7	Envasadas en PVC	38.70	17.33	7.41	23.15	18.85
		39.91	24.35	18.11	36.64	30.35
		39.40	27.38	18.06	33.41	32 .8 0
		40.83	24.47	17.53	35.62	30.10
		37.58	20.29	9.24	24.48	22.29
		41.54	25.18	18.15	35.78	31.04
		35.93	19.84	7.89	21.69	21.35

		40.46	16.73	12.52	36.81	20.90
		37.01	21.85	9.36	23.19	23.77
		44.47	20.62	17.63	40.53	27.13
		39.35	19.93	9.00	2 4.30	21.87
		33.86	16.97	6.79	21.81	18.28
		34.58	19.45	7.83	21.93	20.97
		41.51	23.45	16.80	35.62	28.85
	Envasadas en PVC	36.07	19.82	8.90	24.18	21.73
7		40.21	27.53	16.15	30.40	31.92
		39.08	24.37	14.56	30.86	28.39
		40.46	19.64	8.73	23.97	21.49
		41.92	24.28	15.93	33.27	29.04
		43.93	21.73	18.70	40.71	28.67
		35.61	16.31	7.40	24.40	17.91
		39.19	24.45	13.46	28.83	27.91
		36.90	19.40	8.41	23.44	21.14
		37.57	22.22	12.06	28.49	25.28
		40.35	24.04	13.01	28.42	27.33
		41.59	17.90	10.67	30.80	20.84
		36.85	20.60	9.03	23.67	22.49
		36.81	20.92	10.86	27.43	23.57
		42.27	19.24	13.90	35.85	23.74
		37.61	19.55	8.78	24.19	21.43
		32.82	22.86	12.47	28.61	26.04
		40.26	22.33	16.10	38.79	27.53
		35.44	21.82	10.60	25.91	24.26
		40.55	27.43	19.54	35.46	33.68
		33.75	18.33	8.27	24.28	20.11
		33.38	27.50	16.95	31.65	32.30
		30.24	30.50	14.98	26.16	33.98
		42.4	22.28	16.90	37.18	27.96
		36.45	21.33	13.03	31.42	24.99
		37.69	16.56	9.53	29.92	19.11
	Mínimamente	44.40	24.00	20.31	40.24	31.44
7	Procesadas	43.26	27.90	22.90	39.38	36.09
		37.07	19.97	8.75	23.66	21.80
		37.26	19.14	10.27	28.22	21.72
		44.29	20.84	17.18	39.50	27.01
		39.32	23.55	13.18	29.23	26.99
		37.14	24.54	11.99	26.04	27.31
		41.12	21.52	12.04	29.23	24.66
		33.40	28.10	17.94	32.56	33.34
		40.53	15.55	10.09	32.98	18.54
		40.83	21.45	16.47	37.52	27.04

		34.76	23.32	10.28	23.79	25.49
		40.65	22.24	14.92	33.86	16.78
	Mínimamente	43.80	21.02	17.60	39.94	27.42
7	Procesadas	42.49	22.71	18.42	39.05	29.24
		38.49	20.04	10.57	27.81	22.66
		44.67	20.43	18.82	42.65	27.78
		37.79	17.03	8.66	26.95	19.11
		37.02	18.91	10.67	29.43	21.71
		43.07	24.42	18.57	37.25	30.68
		33.25	28.58	15.45	28.40	32.49

ND: No determinado

TABLA 5.21

Color en frutilla en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento para el bloque 2

		Color				
Día	**Tipo de Presentación**	**L***	**a***	**b***	**Hue**	**Chroma**
0	Sin Acondicionamiento	34.93	19.83	7.35	20.34	21.15
		37.06	26.15	13.71	27.67	29.53
		33.72	22.39	9.23	22.40	24.22
		33.47	22.18	12.32	29.05	25.37
		37.39	17.57	8.19	24.99	19.39
		41.33	24.48	19.28	38.22	31.16
		36.40	28.52	16.41	29.92	32.90
		37.01	19.23	8.23	23.17	20.92
		39.22	24.25	13.29	28.72	27.65
		32.99	24.33	13.27	28.61	27.71
		34.32	20.47	10.96	28.17	23.22
		33.11	21.91	10.25	25.07	24.19
		34.78	23.32	9.37	21.89	25.13
		35.88	23.39	10.34	23.85	25.57
		38.16	25.29	11.70	24.83	27.87
		41.17	25.53	13.74	28.29	28.99
		33.67	22.00	10.06	24.57	24.19
		34.19	26.38	11.75	24.01	28.88
		37.30	25.01	12.58	26.70	28.00
		36.74	22.60	8.84	21.36	24.27
		34.73	20.96	7.72	20.22	22.34
		35.96	21.74	9.81	24.29	23.85
		40.59	27.61	15.82	29.81	31.82
		38.35	23.07	8.94	21.18	27.74
0	Envasadas en PVC	40.29	27.97	14.83	27.93	31.66
		37.72	26.92	14.20	27.81	30.44
		35.27	19.31	5.91	17.89	19.24
		35.00	22.64	12.44	28.79	25.83
		32.37	22.54	9.54	22.94	24.48
		30.45	22.89	11.16	25.99	25.47
		36.19	29.50	16.51	29.23	33.81
		35.34	21.07	10.36	26.18	23.48
		35.93	28.03	14.06	26.64	31.36
		34.31	21.27	9.07	23.09	23.12
		28.44	28.34	13.53	25.52	31.40
		30.76	19.63	9.87	26.69	21.97
		39.19	22.14	13.59	31.54	25.98

		38.46	15.05	6.44	23.17	16.37
		35.87	22.65	10.97	25.84	25.17
	Envasadas en PVC	35.60	22.36	8.50	20.81	23.92
		34.97	25.79	15.14	30.41	29.91
		34.08	23.79	9.85	22.49	25.75
		44.62	23.75	16.90	35.43	29.15
		38.66	20.49	11.05	28.34	23.28
		36.95	18.50	7.67	22.52	20.03
		38.20	25.57	15.32	30.93	29.81
		34.21	23.42	8.42	19.77	24.89
		42.84	33.29	26.77	38.80	42.72
		31.69	26.08	12.46	25.54	28.90
		37.13	27.84	11.69	22.78	30.19
		39.51	27.21	15.21	29.20	31.17
		35.87	27.23	15.75	30.05	31.46
		45.19	25.39	18.86	36.61	31.63
		31.10	24.51	12.44	26.91	27.49
		39.56	32.03	19.55	31.40	37.52
		39.78	28.65	16.59	30.07	33.11
		37.47	25.17	10.80	23.22	27.39
		34.02	23.64	11.81	26.55	26.43
		29.04	23.44	18.31	25.76	26.03
	Mínimamente	39.36	31.68	23.24	36.26	39.29
0	Procesadas	37.46	29.66	18.67	32.19	35.05
		32.13	23.86	9.32	21.43	25.62
		36.54	20.68	9.25	24.10	22.65
		41.17	34.04	19.66	30.01	39.31
		41.00	31.33	20.66	33.40	37.53
		35.25	30.28	14.18	25.09	33.44
		32.38	21.49	8.07	20.58	22.96
		51.02	27.06	24.80	42.50	36.71
		34.41	28.72	15.22	27.92	32.50
		39.27	29.27	18.37	32.11	34.56
		38.09	23.85	15.78	33.49	28.60
		48.20	27.31	26.16	43.77	37.82
		40.42	34.37	22.92	33.70	41.31
		36.55	26.22	11.93	24.47	28.81
		53.41	16.13	26.57	58.74	31.08
		34.95	16.67	6.99	22.75	18.08
		43.88	24.79	17.43	35.11	30.30
2	Sin Acondicionamiento	39.62	24.07	9.20	20.92	25.77
		37.71	18.81	9.85	27.64	21.23
		39.88	21.99	13.72	31.96	25.92
		40.82	22.65	12.73	29.34	25.98

		37.12	16.87	6.12	19.94	17.95
		36.29	17.19	8.32	25.83	19.10
2	Sin Acondicionamiento	38.76	22.95	13.95	31.29	26.86
		36.96	15.10	7.20	25.49	16.73
		35.16	16.39	7.31	24.04	17.95
		39.89	22.80	14.30	32.10	26.91
		37.74	19.17	9.42	26.17	21.36
		42.79	23.22	15.21	33.23	27.76
		36.88	22.21	9.49	23.14	24.15
		41.18	23.92	14.36	30.98	27.90
		39.36	17.51	8.00	24.55	19.25
		38.98	23.88	13.93	30.26	27.65
		39.47	13.55	7.14	27.79	15.32
		33.78	20.29	7.93	21.35	21.78
		34.65	20.43	9.91	25.88	22.71
		32.86	17.89	6.68	20.48	19.10
		34.41	21.14	13.37	32.31	25.01
		39.94	26.97	19.51	35.88	33.29
		44.18	37.91	24.34	41.09	37.03
		38.65	24.04	13.19	28.75	27.42
2	Envasadas en PVC	36.06	18.99	9.20	25.85	21.10
		37.46	21.50	10.10	25.16	23.75
		42.30	31.19	21.60	34.70	37.94
		37.13	23.76	10.94	24.72	26.16
		35.07	20.27	8.38	22.46	21.93
		39.78	23.94	12.70	27.95	27.10
		40.89	22.40	12.69	29.53	25.74
		40.52	26.65	13.58	27.00	29.91
		37.79	14.27	6.91	25.84	15.85
		42.52	22.38	15.03	33.88	26.96
		36.63	16.02	6.03	20.63	17.12
		33.47	18.96	5.88	17.23	19.85
		32.61	22.78	7.84	18.99	24.09
		35.04	23.04	11.83	27.18	25.90
		37.78	25.57	13.17	27.25	28.76
		42.51	25.33	19.17	37.12	31.77
	Minimamente	40.23	30.77	19.80	32.76	36.59
2	Procesadas	37.70	26.42	13.57	27.19	26.70
		29.17	17.62	6.45	20.11	18.76
		34.99	25.98	14.02	28.35	28.52
		44.52	30.62	26.55	40.93	40.53
		36.05	25.57	10.23	21.81	27.54
		40.35	24.10	15.81	33.27	28.82
		40.10	22.16	12.29	29.01	25.34

	Mínimamente	35.36	18.90	7.07	20.51	20.18
	Procesadas	35.79	12.48	4.22	18.68	13.17
2		38.30	22.53	12.73	29.47	25.88
		38.82	24.00	12.00	26.56	26.83
		37.35	22.51	12.24	28.54	25.62
		36.53	15.79	6.39	22.03	17.03
		37.46	16.33	9.28	29.61	18.78
		38.42	19.58	12.08	31.67	23.01
		39.66	20.88	11.05	27.89	23.62
		36.89	16.19	7.13	23.77	17.69
		37.44	20.22	10.64	27.75	22.85
		37.37	18.94	7.98	22.85	20.55
		36.88	17.59	7.78	24.23	18.96
		37.62	17.80	8.88	26.51	19.89
		41.22	25.14	15.50	31.66	29.53
7	Sin Acondicionamiento	37.84	16.01	7.60	25.39	17.72
		37.46	18.74	9.05	25.78	20.81
		35.06	18.00	7.47	22.54	19.49
		42.62	21.22	14.66	34.64	25.79
		36.21	18.29	7.08	21.16	19.61
		37.77	23.35	12.56	28.28	26.51
		36.75	22.43	11.76	27.67	25.33
		37.34	18.56	8.33	24.17	20.34
		37.71	19.17	11.81	31.64	22.52
		40.22	21.87	12.77	30.28	25.33
		36.59	14.31	6.01	22.78	15.52
		39.80	25.33	13.47	28.00	28.69
		37.95	20.06	8.30	22.48	21.71
		41.15	18.54	11.17	31.07	21.64
		40.15	17.49	8.66	23.65	19.09
		39.27	21.02	11.80	29.31	24.11
		36.79	16.11	6.35	21.51	17.32
		38.73	16.53	8.82	28.08	18.74
7	Envasadas en PVC	41.02	2 8.71	18.69	33.06	34.26
		34.88	14.68	5.48	20.47	15.67
		38.84	19.18	10.37	28.40	21.80
		38.89	23.97	15.21	32.40	28.39
		39.20	18.87	10.22	28.44	21.46
		37.29	22.98	9.82	23.14	24.99
		41.42	23.65	15.42	33.10	28.23
		38.11	20.67	12.50	31.16	24.16
		44.64	29.65	18.54	32.02	34.97
		33.56	19.66	7.88	21.84	21.18
	Envasadas en PVC	38.11	18.15	9.97	28.78	20.71

		41.20	22.72	13.44	30.61	26.40
		40.08	22.24	12.30	28.95	25.41
		40.42	20.16	12.29	31.37	23.61
		40.30	21.40	12.58	30.45	24.82
		38.28	24.79	15.88	32.64	29.44
		41.72	17.29	9.84	39.64	19.89
		43.92	17.99	10.73	30.81	20.95
		37.56	22.81	10.73	25.19	25.21
		43.56	19.10	12.16	32.48	22.64
		34.31	19.96	7.10	19.58	21.19
		35.91	14.36	4.92	18.91	15.18
	Mínimamente	41.72	25.25	14.26	29.46	29.00
7	Procesadas	36.53	16.31	6.82	22.69	17.68
		41.39	24.52	15.05	31.54	28.77
		39.49	19.86	10.42	28.68	22.43
		42.11	15.60	10.52	33.99	18.82
		29.25	19.02	6.39	18.57	20.06
		40.14	23.47	16.16	34.55	28.50
		37.83	21.67	12.15	29.28	24.84
		35.41	23.31	11.75	26.75	26.10
		33.58	27.87	9.53	20.97	26.63
		26.28	18.92	6.84	19.88	20.12

TABLA 5.22

Pérdida de peso en frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento

		% Pérdida de peso	
Tipo de Presentación	**Bloque**	**Día 2**	**Día 7**
Sin acondicionamiento	1	1.62	4.35
		1.64	3.95
		1.61	4.35
	2	2.23	4.98
		2.28	4.57
		2.13	4.95
Envasada en PVC	1	0.08	0.20
		0.05	0.21
		0.08	0.19
	2	0.46	0.43
		0.43	0.48
Mínimamente procesadas	1	0.03	0.08
		0.00	0.02
		0.00	0.07
	2	0.08	0.25
		0.06	0.19

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.

TABLA 5.23

Aroma de frutillas en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento

		Aroma		
Tipo de Presentación	**Bloque**	**Día 0**	**Día 2**	**Día 7**
Sin acondicionamiento	1	Muy Bueno	Bueno	Bueno
		Muy Bueno	Bueno	Bueno
		Muy Bueno	Bueno	Bueno
	2	Muy Bueno	Bueno	Bueno
		Muy Bueno	Bueno	Bueno
		Muy Bueno	Bueno	Bueno
Envasada en PVC	1	Muy Bueno	Muy Bueno	Muy Bueno
		Muy Bueno	Muy Bueno	Muy Bueno
		Muy Bueno	Muy Bueno	Muy Bueno
	2	Muy Bueno	Muy Bueno	Muy Bueno
		Muy Bueno	Muy Bueno	Muy Bueno
		Muy Bueno	Muy Bueno	Muy Bueno
Mínimamente procesadas	1	Bueno	Bueno	Pobre
		Bueno	Bueno	Pobre
		Bueno	Bueno	Pobre
	2	Bueno	Bueno	Bueno
		Bueno	Bueno	Bueno
		Bueno	Bueno	Bueno

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.

TABLA 5.24

***Off*-odors en frutilla en función del tipo de presentación y tiempo de almacenamiento**

		Off-odors		
Tipo de Presentación	**Bloque**	**Día 0**	**Día 2**	**Día 7**
Sin acondicionamiento	1	Nada	Nada	Nada
		Nada	Nada	Nada
		Nada	Nada	Nada
	2	Nada	Nada	Nada
		Nada	Nada	Nada
		Nada	Nada	Nada
Envasada en PVC	1	Nada	Nada	Nada
		Nada	Nada	Nada
		Nada	Nada	Nada
	2	Nada	Nada	Nada
		Nada	Nada	Nada
		Nada	Nada	Nada
Minimamente procesadas	1	Nada	Nada	Poco
		Nada	Nada	Poco
		Nada	Nada	Poco
	2	Nada	Muy Poco	Muy Poco
		Nada	Muy Poco	Muy Poco
		Nada	Muy Poco	Muy Poco

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.

TABLA 5.25

Composición gaseosa en los distintos envases en función del tiempo de almacenamiento

		% CO_2		% O_2	
Tipo de Presentación	**Bloque**	**Día 2**	**Día 7**	**Día 2**	**Día 7**
Envasada en PVC	1	1.10	3.56	18.59	18.99
		1.00	2.91	18.69	18.26
		0.93	2.84	19.34	20.09
		1.00	2.87	19.03	20.19
	2	0.87	2.30	16.69	18.25
		0.96	1.99	16.70	19.60
		0.73	1.22	19.34	20.19
		0.69	1.15	19.55	17.74
Mínimamente procesadas	1	3.49	9.24	18.22	17.18
		2.97	11.62	17.04	16.27
		2.05	9.13	17.69	16.42
		2.94	11.15	16.67	15.81
	2	2.17	3.09	18.31	19.28
		2.55	4.84	16.38	21.27
		1.68	3.99	17.66	18.86
			4.39		18.25

Frutillas variedad Camarosa, 100 % color rojo.

TABLA 5.26

Contenido de ácido elágico en frutillas en función del corte y tipo de lavado

Corte	Lavado	Bloque	Ácido elágico (mg/g peso seco)
Enteras	Sin lavar	1	0.91
			0.80
			0.79
			0.91
			0.95
Enteras	Lavadas con agua	1	0.92
			0.86
			0.82
			0.75
			0.83
Enteras	Lavadas con cloro	1	0.54
			0.89
			0.68
			0.76
			0.60
Cortadas	Sin lavar	1	0.75
			0.96
			0.82
			0.81
			0.77
Cortadas	Lavadas con agua	1	0.89
			0.74
			0.70
			0.72
			0.72
Cortadas	Lavadas con cloro	1	0.42
			0.63
			0.44
			0.57
			0.57

TABLA 5.26

(continuación)

Enteras	Sin lavar	2	0.62 0.54 0.51 0.42 0.58
Enteras	Lavadas con agua	2	0.61 0.49 0.48 0.50 0.50
Enteras	Lavadas con cloro	2	0.46 0.49 0.41 0.44 0.45
Cortadas	Sin lavar	2	0.56 0.77 0.52 0.54 0.60
Cortadas	Lavadas con agua	2	0.39 0.39 0.52 0.49 0.39
Cortadas	Lavadas con cloro	2	0.36 0.35 0.25 0.29 0.29

TABLA 5.26

(continuación)

Enteras	Sin lavar	3	1.17 1.01 1.10 1.05 1.17
Enteras	Lavadas con agua	3	1.12 1.06 1.09 1.08 1.13
Enteras	Lavadas con cloro	3	0.91 0.93 0.82 0.88 0.82
Cortadas	Sin lavar	3	1.02 1.11 1.01 1.07 1.09
Cortadas	Lavadas con agua	3	0.88 0.75 0.76 0.91 0.79
Cortadas	Lavadas con cloro	3	0.82 0.73 0.78 0.80 0.76

TABLA 5.26

(continuación)

			0.96
Enteras	Sin lavar	4	1.18
			0.95
			0.84
Enteras	Lavadas	4	0.72
	con agua		1.02
			0.75
Enteras	Lavadas	4	0.93
	con cloro		1.05
			0.87
Cortadas	Sin lavar	4	1.07
			1.12
			0.94
Cortadas	Lavadas	4	0.97
	con agua		0.91
			0.74
Cortadas	Lavadas	4	0.75
	con cloro		0.68

TABLA 5.27

Contenido de ácido elágico en frutillas en función del lavado y del tratamiento con una solución antioxidante

Lavado o tratamiento	Bloque	Ácido elágico (mg/g peso seco)
Sin lavar	1	1.02
		1.11
		1.01
		1.07
		1.09
Lavadas con agua	1	0.88
		0.75
		0.76
		0.91
		0.79
Lavadas con cloro	1	0.82
		0.73
		0.78
		0.80
		0.76
Lavadas con solución antioxidante	1	1.12
		1.20
		1.21
		1.17
		1.21
		1.28
		1.10
		1.23
Sin lavar	2	0.87
		1.07
		1.12
Lavadas con agua	2	0.94
		0.97
		0.91
Lavadas con cloro	2	0.74
		0.75
		0.68

		1.25
Lavadas con solución antioxidante	2	0.91
		1.26
		1.06

TABLA 5.28

Contenido de ácido elágico en bananas en función del corte y el tratamiento con una solución antioxidante

Tratamiento	Ácido elágico (mg/gr peso seco)
	0.02
Enteras sin tratar	0.02
	0.02
	0.02
	0.04
Cortadas y tratadas con solución antioxidante	0.03
	0.03
	0.03

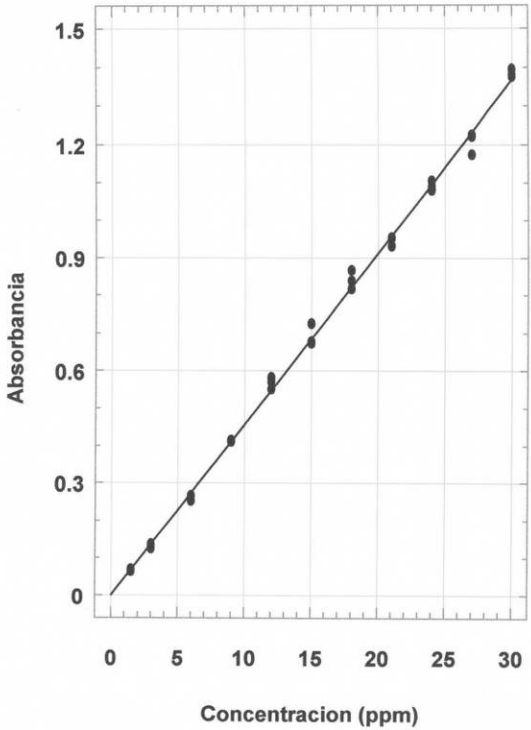


Figura 5.1 Curva de Calibrado

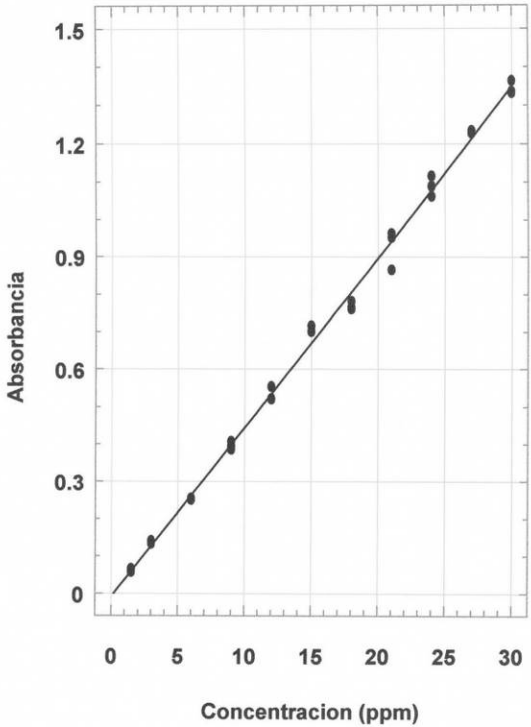


Figura 5.2 Curva de Calibrado N°2

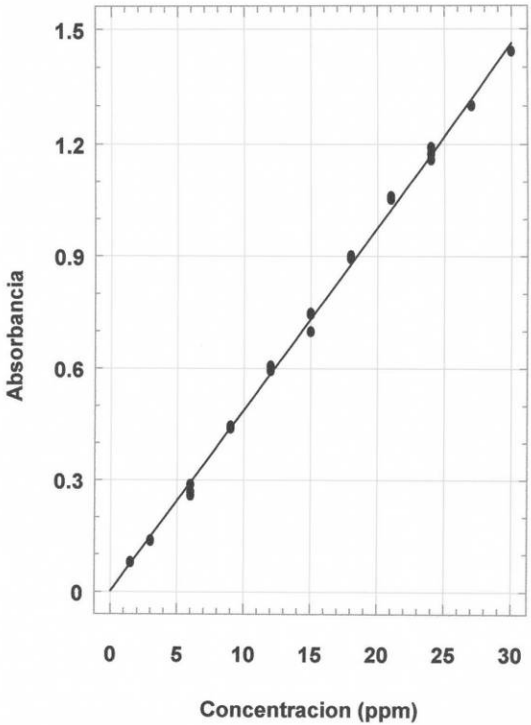


Figura 5.3 Curva de Calibrado N°3

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alzamora, SM. **1997**. "Preservación I. Alimentos conservados por factores combinados" en Temas en tecnología de alimentos. Volumen 1. CYTED, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Instituto Politécnico Nacional. Editado por José Miguel Aguilera.

- Alzamora, SM. **2000**. "Las tecnologías emergentes". Enfasis Alimentación. 5:98-104.

- Ancos B, González EM, Cano MP. **2000**. "Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruits". Journal of Agricultural Food Chemistry. 48(10): 4565-4570.

- Anónimo. **1994**. "Precise color communication". Manual: Color control from feeling to instrumentation. Minolta Co., Ltd.

- Anónimo.**1996**. "University of California patented strawberry varieties". Fruit and nut cultivars patented by the University of California. Disponible en: http://fruitsandnuts.ucdavis.edu/ patent. Acceso:25/03/00.

- Anónimo. **1999a.** "Los fitonutrientes. Nutrimentos del futuro?". Disponible en: http:// www.trends-online.com. Acceso: 11/02/99.

- Anónimo. **1999b.** "A lesson in strawberry history". Disponible en: http://www.barc.gov/ psi/fl/strawb.htm. Acceso: 01/03/99.

- Anónimo. **1999c**. "Alimentos de Santa Fe". Ministerio de Agricultura, Ganadería, Industria y Comercio del Gobierno de la Provincia de Santa Fe.

- Anónimo. **2000**. "Strawberry - Fragaria X ananassa Duch.". Disponible en: http://www.uga.edu/ hortcrop/rieger/strawbry. Acceso: 05/07/00.

- Anónimo. **2001**. "Phytochemicals. Another good reason to eat 5-9 servings of fruits and vegetables every day!". Dole Company. Disponible en: http://www.dole5aday.com/ phytochem/index.html. Acceso: 23/04/01.

- Applegate L. **1999**. "Phyting Phoods". Disponible en: http://www.runnersworld.com/nutrition/ nuphytos.html. Acceso: 12/03/98

- Arcuri P. **1999**. "Animal Science 625. Nutritional toxicology. Phenolic toxicants". Disponible en: http://www.abc.cornell.edu. Acceso: 08/09/99

- Barch DH, Rundhaugen LM, Stoner GD, Pillay NS y Rosch WA. **1996**. "Structure-function relationships of dietary anticarcinogen ellagic acid". Carcinogenesis. 17(2): 265-269. Disponible en: http://www.oup.co.uk/jnls/ list/carcin/hdb/Volume-17/Issue-02. Acceso: 21/10/98.

- Bennett L. **1999**. " Ellagic acid hailed as most potent way to fight cancer". Disponible en: http://members tripod.com. Acceso: 10/05/00.

- Brody AL. **1998**. "Minimally processed foods demand maximum research and education". Food Technology. 52(5): 62-68.

- Buscher. **1999**. "Fruits and vegetables". Natrol Company. Disponible en: http://www.natural-land.com. Acceso: 10/05/00.

- Cannas A. **1998**. "Tannins: fascinating but sometimes dangerous molecules". Department of Animal Science. Cornell University. Disponible en: http://www.ansci.cornell.edu. Acceso: 24/03/98.

- Caragay AB. **1992**. "Cancer-preventive foods and ingredients". Food Technology. 46(4): 65-68.

- Cedar D. **1999**. "Phytochemicals". Nutrition Center. Disponible en: http://www.wellweb.com. Acceso: 26/03/00.

- Christopher JR. **2000**. "Let's make our foods be our medicine and our medicine be our food". Herbs First. Disponible en: http://www.herbsfirst.com/ NewsLetters/0999food. Acceso: 26/03/00.

- Constantinou A, Stoner GD, Mehta R, Rao K, Runyan C, Moon R. **1995**. "The dietary anticancer agent ellagic acid is a potent inhibitor of DNA topoisomerases in vitro". Nutrition Cancer. 23(2): 121-130. Disponible en: http://www.avicenna.com/Scripts/cqcgi. Acceso: 23/02/98.

- Cozzi R, Ricordy R, Bartolini F, Ramadori L, Perticone P, De Salvia R.**1995**. "Taurine and ellagic acid: twodifferently-acting natural antioxidants". Environmental Molecular Mutagen. 26(3): 248-254. Disponible en: http://www.avicenna.com/Scrips/cqcgi. Acceso: 23/02/98.

- Czerweny P. **2000**. *Comunicación personal.* Coronda, Santa Fe.

- Dao T. **1996**. "Taking a Closer Look at Phytochemicals". American Institute for Cancer Research. Disponible en: http://www.vhl.org/newsletter/ vhl1996. Acceso: 17/11/98.

- del Valle JM, Palma MT. **1997**. "Preservación II. Atmósferas controladas y modificadas" en Temas en tecnología de alimentos. Volumen 1. CYTED, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Instituto Politécnico Nacional. Editado por José Miguel Aguilera.

- Diario El Litoral. **2000**. "Comercio exterior. Radiografía del sector". Suplemento económico. Página 5.

- Fenema O. **1996**. "Food Chemistry". 3th Edition. University of Wisconsin-Madison. Madison, Wisconsin. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. Basel. Hong-Kong.

- Funt RC, Bash WD, Schwartz SJ, Collier J, Wenneker G. **1997**. "Small fruit cultivar characteristics for ellagic acid and nutraceutical development". Proc. Fruit, Vegetable, Roadside Marketing and Ohio Wine Producers Conf. p. 14-18.

- Funt RC, Schwartz SJ, Bash WD. **2000**. "Evaluation of Ellagic Acid Content of Ohio Berries". Department of Food Science and Technology. The Ohio State University. Final Report.

- García JM, Medina RJ, Olías JM. **1998**. "Quality of strawberries automatically packed in different plastic films". Journal of Food Science. 63(6): 1037-1041.

- Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR. **1998**. "HPLC Method for Screening of Flavonoids and Phenolic Acids in Berries". Journal Science Food Agricultural. 77: 543-551.

- Häkkinen SH, , Heinonen IM, Kärenlampi SO, Mykkänen HM, Ruuskanen J, Törrönen AR. **1999**. "Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries". Food Research International. 32: 345-353.

- Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Mykkänen HM, Heinonen IM, Törrönen AR. **2000**. "Ellagic acid content in berries: influence of domestic processing and storage". European Food Research Technology. 212(1): 75-80.

- Hasler, CM. **1998**. "Functional foods: their role in disease prevention and health promotion". Food Technology. 52(11): 63-70.

- Holcroft DM, Kader AA. **1999**. "Carbon dioxide-induced changes in color and anthocyanin synthesis of stored strawberry fruit". HortScience 34(7): 1244-1248.

- Hoover DG. **1997**. "Minimally processed fruits and vegetables: by nonthermal physical treatments". Food Technology. 51(6): 66-71.

- Howard LA, Wong AD, Perry AK, Klein BP. **1999**. " β-carotene and ascorbic acid retention in fresh and processed vegetables". Journal of Food Science. 64(5): 929-936.

- Itoh T, Shirakami S, Yoshida T. **1998**. "Chemistry of artificial ellagitannins: simple synthesis of ferrocenyl ellagitannin". The 3rd tannin conference plant polyphenols chemistry and biology. 20-25 julio de 1998, The Riverhouse, Bend, Oregon. Disponible en : http://sci.ed.okayamau.ac.jp/ sci/org/Act/USA98/ Polyphenol98. Acceso: 17/03/00.

- Kader A, Mitcham B. **1996**. "Standardization of Quality" en Fresh-cut Products: Maintaining Quality and Safety. Postharvest Horticulture Series N° 10.

- Kalt W, Forney CF, Martin A, Prior RL. **1999**. "Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits". Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47:4638-4644.

- Khanduja KL, Gandhi RK, Pathania V, Syal N. **1999**."Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercitin in mice". Food and Chemical Toxicology. 37(4): 313-318. Disponible en: http://www.elsevier.com/cdweb/views. Acceso: 01/04/00.

- Lin TY, Vine RP. **1990**. "Identification and reduction of ellagic acid in muscardine grape juice". Journal of Food Science. 55(6): 1607-1609.

- Little TM, Hills IJ. **1976**. "Métodos estadísticos para la investigación en agricultura". Editorial Trillas. México.

- Loarca-Pina G, Kuzmicky PA, de Mejía EG, Kado NY. **1998**. "Inhibitory effects of ellagic acid on the direct-acting mutagenicity of aflatoxin B_1 in the Salmonella microsuspension assay". Mutat Research. 398(1-2): 183-187. Disponible en: http://www.mediko.de/news. Acceso: 08/05/00.

- Maas JL, Galletta GJ, Stoner GD. **1991a**. "Ellagic acid, an anticarcinogenic in fruits, especially in strawberries: A review". HortScience 26(1): 10-14.

- Maas JL, Wang SY, Galletta GJ. **1991b**. "Evaluation of strawberry cultivars for ellagic acid content". HortScience 26(1): 66-68.

- McCarthy MA, Matthews RH. **1994**. "Nutritional Quality of Fruits and Vegetables Subject to Minimal Processes" en Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables. Ed: Robert Wiley.

- Namesny A. **1999**. "Post-recolección de Hortalizas. Vol. III. Hortalizas de fruto". Compendios de Horticultura. Ediciones de Horticultura, S. L. Reus, España.

- Nunes MC, Brecht JK, Morais AM, Sargent SA. **1998**. "Controlling temperature and water loss to maintain ascorbic acid levels in strawberries during postharvest handling". Journal of Food Science. 63(6): 1033-1036.

- Olías JM, Sanz C, Pérez AG. **1995**. "Acondicionamiento post-recolección del fresón de Huelva para consumo en fresco". Instituto de la Grasa, C.S.I.C. Colección Huelva Verde, Caja Rural de Huelva.

- Olías Jimenez JM. **1999**. *Comunicación personal.* Director del Instituto de la Grasa. Sevilla. España.

- Olías JM, Sanz C, Pérez AG. **2000**. "Postharvest handling of strawberries for fresh market". Crop management and postharvest handling of horticultural products. Volume I. Qualily management. Science Publishers, Inc.

- Petek D. **1999 a**. "New study is underway to evaluate red raspberry ellagic acid in prevention of cervical cancer". Washington Red Raspberry Commission, Washington, DC. Disponible en: http://www.red-raspberry. com. Acceso: 29/10/99.

- Petek D. **1999b**. "Medical research confirms: eating red raspberry may be one of the most potent ways to fight cancer". Washington Red Raspberry Commission, Washington, DC. Disponible en: http://www.red-raspberry. com. Acceso: 29/10/99.

- Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G, Mainland CM. **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): 2686-2693.

- Quattrocchi OA, Abelaira SI, Laba RF. **1992**. "Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica". Artes Gráficas Sarro S.A., Buenos Aires.

- Rosen JC, Kader AA. **1989**. "Postharvest Physiology and Quality Maintenance of Sliced Pear and Strawberry Fruits". Journal of Food Science. 54(3): 656-659.

- Sahasrabudhe K. **1997**. "Syntesis and biological studies of Coriariin A and its analogs". Pennsylvania State University. Disponible en: http://www.chem.psu.edu. Acceso: 25/02/98.

- Sambandam A. **1997**. "Synthesis of plant polyphenols via biomometic oxidative coupling". Pennsylvania State University. Disponible en: http:// www.chem.psu.edu. Acceso: 25/02/98.

- Sanz C, Pérez AG, Olías R, Olías JM. **1999**. "Quality of strawberries packed with perforated polypropylene". Journal of Food Science. 64(4): 748-752.

- Scaglia E, Kirschbaum D, Martínez Novillo J, Rodríguez J, Mintzer R. **1995**. "Producción de hortalizas en invernáculo. Módulo 4: Cultivo de la frutilla." PROCADIS. INTA.

- Sistrunk WA, Wang RD, Morris JR. **1983**. "Effect of combining mechanically harvested green and ripe puree and sliced fruit, processing methodology and frozen storage on quality of strawberries". Journal of Food Science.48: 1609-1616.

- Sloan E. **1999**. "The new market: foods for the Not-So-Healthy". Food Technology. 53(2): 54-60.

- Smith RS. **1997**. "Total synthesis and biological assays of Agimoniin". Pennsylvania State University. Disponible en: http:// www.chem.psu.edu. Acceso: 25/02/98.

- Stanley D. **1997**. "Boosting ellagic acid in strawberries". Agricultural Research. Disponible en: http:// www.ars.usda.gov/is/pr/ellagic0897.html. Acceso: 24/02/98.

- Stansbury J. **1998**. "The anti-cancer diet". Disponible en: http:// www. naturopathic.org/ articles.lay/anticancer.diet.JS.html. Acceso: 26/02/99.

- Vance R. **1998**. "Effect of dietary factors on mutagenesis, metabolism, and binding to DNA of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene7,8-dihydrodiol". Dissertation Abstract. Disponible en: http://www.ucollege.edu/mathsci/ vancedis.html. Acceso: 12/02/98.

- Wang S, Maas J, Payne J, Galletta G. **1994**. "Ellagic Acid Content in Small Fruits, Mayhaws, and Other Plants". Journal of Small Fruit and Viticulture. 2(4): 39-49.

- Wang S, Galletta G, Camp M, Kasperbauer M. **1998**. "Mulch types affect fruit quality and composition of two strawberry genotypes". HortScience. 33(4): 636-640.

- Watada AE. **1997**. "Quality Maintenance of Fresh-cut Fruits and Vegetables". Foods and Biotechnology. 6(4): 229-233.

- Webb D, Yeykal T. **1998**. "Healthy living. The real cancer miracle". American Institute for Cancer Research, Washington, DC. Disponible en: http://www.healthydeas.com. Acceso: 26/02/99.

- Wiley, RC. **1994**. " Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables". Chapman and Hall. New York.

- Wilson TC, Hagerman AE. **1990**. "Quantitative determination of ellagic acid". Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38(8): 1678-1683.

- Witwer RS. **1999**. "Marketing bioactive ingredients in foods products". Food Technology. 53(4): 50-58.