

# Contenido de ácido elálgico en frutillas de Coronda (Santa Fe)

Williner, María R.<sup>1</sup>; Pirovani, María E.<sup>2</sup>; Güemes, Daniel R.<sup>2</sup>

1- Cátedra de Química Analítica II, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, C.C. 242, 3000 Santa Fe, Argentina.

2- Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, C.C. 266, 3000 Santa Fe, Argentina.

**RESUMEN:** El ácido elálgico es el principal compuesto fenólico en frutillas. El interés en el mismo se ha incrementado en los últimos años debido a sus propiedades nutraceuticas.

El objetivo de este estudio fue determinar el contenido de ácido elálgico en frutillas, comparado con el de otras frutas de consumo masivo, y evaluar la variabilidad en función del grado de madurez para las diferentes variedades cultivadas en Argentina.

Las frutillas mostraron niveles de ácido elálgico entre 0,16 y 2,07 mg g<sup>-1</sup> peso seco, los que resultaron ser significativamente mayores que los de otras frutas.

El contenido de ácido elálgico en las frutillas inmaduras (0 % de su superficie de color rojo) fue mayor que en las intermedias (50% color rojo) y en estas últimas mayor que en las maduras (100 % color rojo). La variedad "Camarosa" presentó el contenido más elevado de ácido elálgico en las frutillas maduras (0,50 mg g<sup>-1</sup> peso seco), mientras que la variedad "Milsei" exhibió el menor (0,16 mg g<sup>-1</sup> peso seco).

**Palabras claves:** ácido elálgico, frutillas, variedades, madurez.

**SUMMARY:** Ellagic acid content in strawberries from Coronda (Santa Fe). Williner, María R.<sup>1</sup>; Pirovani, María E.<sup>2</sup>; Güemes, Daniel R.<sup>2</sup>. Ellagic acid is the main phenolic compound in the strawberries. Interest in ellagic acid has increased during the past few years due to its nutraceutical properties.

The objective of this study was to determine the ellagic acid content in strawberries compared with other common fruits and to evaluate the cultivar variability of selected cultivars widely grown in Argentina, and the effects of ripening stage.

Strawberries showed significantly higher levels of ellagic acid content than many fruits of economic importance, ranging from 0.16 to 2.07 mg g<sup>-1</sup> dry weight.

The ellagic acid content of green fruit was higher than in mid-ripe fruit and the latter was higher than in full ripe fruit. Cultivar "Camarosa" contained the highest amounts of ellagic acid in ripe strawberries (0.50 mg g<sup>-1</sup> dry weight), while "Milsei" exhibited the lowest (0.16 mg g<sup>-1</sup> dry weight).

**Key Words:** Ellagic acid, strawberries, cultivars, maturity.

## Introducción

Se define como nutraceutico o alimento funcional a cualquier alimento o ingrediente de alimentos que pueda proporcionar un beneficio fisiológico adicional, más allá de los beneficios nutricionales básicos conocidos (1). Estos alimentos pueden tener origen animal (pescado, productos lácteos, etc.) o vegetal, en cuyo caso el compuesto biológicamente activo recibe el nombre de fitoquímico (2). Entre es-

tos últimos está el ácido elálgico, producto de la hidrólisis de los elagitaninos. El interés en este fenólico natural radica en su actividad como antioxidante, anticancerígeno y antimutagénico (3, 4, 5).

Las frutillas presentan una gran capacidad antioxidante debido a la presencia de ácido ascórbico, antocianinas y compuestos fenólicos (6, 7). El ácido elálgico es el principal compuesto fenólico, ya que representa aproximadamente un 51% del total (8).

El contenido de ácido elálgico en frutillas depende del cultivar, la especificidad tisular, el grado de madurez de la fruta, y factores ambientales como la temperatura, amplitud del día y enfermedades de la planta (4, 9). Incluso lo afecta también el empleo de diferentes tipos de cobertura plástica usada para cubrir el lomo en el campo (10).

Enviar correspondencias a:

Mag. Alim. María Rosa WILLINER

Cátedra de Química Analítica II

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (U.N.L.)

Ciudad Universitaria, Paraje "El Pozo" 3000 Santa Fe - Argentina.

Teléfono: 54-342-4575211. Fax: 54-342-4575221

E-Mail: williner@fbc.unl.edu.ar

Maas *et al.* (9), informaron que la pulpa de frutilla madura contenía de 0,43 a 4,64 mg g<sup>-1</sup> de peso seco (1,5 mg g<sup>-1</sup> de peso seco en promedio) medido en 35 variedades y 15 clones, mientras que la pulpa de fruta verde varió entre 1,32 y 8,43 mg g<sup>-1</sup> de peso seco (3,36 mg g<sup>-1</sup> de peso seco en promedio).

En la actualidad, científicos de Maryland y Mississippi (EE.UU.), están estudiando la genética de diferentes variedades de frutillas, esperando producir frutas con mayor contenido de ácido elálgico. Además, en otros centros de investigación, se está estudiando lo relacionado a la biodisponibilidad del mismo, para de esa manera poder establecer pautas u orientaciones sobre raciones recomendadas para asegurar un cierto nivel de ácido elálgico en la ingesta (11).

El objetivo del presente trabajo se orientó a:

a- valorar la importancia del aporte de ácido elálgico por parte de la frutilla respecto a otras frutas de consumo masivo, ofrecidas en el mercado, tales como ananá, banana, ciruela, kiwi, mandarina, manzana roja, manzana verde, naranja y pera.

b- cuantificar el ácido elálgico en frutillas de distintas variedades y grados de madurez de plantaciones comerciales de la zona de Coronda (Provincia de Santa Fe), utilizándose la técnica espectrofotométrica de Wilson-Hagerman, específica para ácido elálgico (12).

## Materiales y Métodos

### Frutas de consumo masivo

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

### Frutillas

Todas las frutillas utilizadas (*Fragaria x ananassa* var. Chandler, Camarosa, Sweet Charly, Oso Grande y Milsei) fueron recolectadas en un mismo establecimiento, localizado en Coronda, provincia de Santa Fe (principal zona productora del país), desde agosto a noviembre de 1999.

Las frutillas fueron cosechadas y clasificadas como inmaduras (0 % de su superficie de color rojo), intermedias (50 % color rojo) y maduras (100 % co-

lor rojo). Todas fueron transportadas hasta el laboratorio (distante aproximadamente 40 km) y colocadas durante la noche bajo refrigeración (4 °C) hasta procesarlas para los análisis.

### 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 trituraron en procesadora hasta obtener un puré lo más homogéneo posible.

En el caso de las frutillas, se realizó el mismo procedimiento, obteniéndose un *pool* de pulpa y aquenios, a partir de diez frutillas (aproximadamente 80 g).

### Determinación de ácido elálgico por el método de Wilson-Hagerman

#### Fundamento de la técnica

Es un método espectrofotométrico para la determinación cuantitativa de ácido elálgico basado en la formación del p-Nitrosufenol del producto de nitrosilación del ácido elálgico. El método es selectivo, con reacción positiva para ácido elálgico, pero no para una variedad de otros compuestos fenólicos comunes en plantas, incluidos galotaninos, proantocianidinas, fenilpropanoides, flavonoides y ácido gálico.

#### Hidrólisis

Una cantidad perfectamente pesada de muestra (alrededor de 0,5 g) se colocó en un tubo de análisis, se le agregaron 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, se congeló en un baño de hielo seco/2-propanol, se le realizó vacío con ayuda de una bomba y luego se selló a la llama, quedando convertido el tubo en una ampolla. Esta ampolla se llevó a 100 °C en estufa durante un tiempo apropiado (12-15 h) para que se produzca la hidrólisis.

#### Lavado

Luego, la muestra se enfrió a temperatura ambiente, se abrió la ampolla y se colocó en un baño a 4 °C durante 10 minutos. Se centrifugó y el sobrenadante fue sifoneado y desechado. El residuo se lavó 2 veces con 5 ml de solvente de lavado [acetona/H<sub>2</sub>O/HCl concentrado (70/30/1, v/v/v)],

siempre a 4 °C. Por último, se secó bajo una corriente de N<sub>2</sub>. El residuo se disolvió con 5 ml de piridina.

### Reacción de color

Se centrifugó para recuperar el sobrenadante de piridina, donde está disuelto el ácido elálgico. Se colocaron 2,10 ml de dicho sobrenadante en un tubo de vidrio seco. Se agregaron 0,10 ml de HCl concentrado, se mezcló y se colocó el tubo en un baño a 30 °C. Se agregaron 0,10 ml de NaNO<sub>2</sub> al 1 % en H<sub>2</sub>O, se mezcló rápidamente y se midió inmediatamente la absorbancia a 538 nm. Luego de incubar durante 36 minutos a 30 °C, se midió nuevamente la absorbancia. La concentración de ácido elálgico en las muestras es proporcional a la diferencia entre la absorbancia a los 36 minutos y la absorbancia inicial.

Los resultados se refirieron a los sólidos secos de la frutilla y se expresaron como [mg de ácido elálgico . g<sup>-1</sup> de sólidos secos de frutilla].

### Validación

Los límites de detección y cuantificación de la técnica obtenidos fueron 0,09 mg l<sup>-1</sup> y 0,31 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente.

El porcentaje de recuperación (R) se evaluó agregando estándar puro, antes de la extracción e hidrólisis (entre un 80-100 % del contenido de ácido elálgico estimado en las muestras de frutillas) y fue determinado por triplicado. La recuperación del estándar de ácido elálgico en frutillas fue 62 %. El valor de recuperación se encuentra dentro de lo esperado para este tipo de analito. En efecto, Häkkinen y otros (13), hallaron que el porcentaje de recuperación de fenólicos en frutillas, como el ácido elálgico, varía entre el 42 y 82 %. En los cálculos de los resultados finales no fue tenida en cuenta la recuperación.

Para evaluar la repetitividad del método (incluyendo extracción e hidrólisis de la muestra, más el análisis espectrofotométrico), se analizaron por triplicado muestras de frutillas verdes y de frutillas maduras y se expresó como desviación estándar relativa (RSD). Los valores resultantes fueron:

$$RSD_{\text{frutillas verdes}} = 6,20 \%$$

$$RSD_{\text{frutillas maduras}} = 7,62 \%$$

Los resultados obtenidos se hallan dentro de los valores aceptables para un micronutriente como el ácido elálgico. Quatrocchi et al. (14), indican 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% ó mayores. Además, es lógica la mayor dispersión en las frutas maduras, pues evaluar esta condición en función de la coloración es bastante subjetivo.

### Instrumento

Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Turner Modelo 390 (Barnstead/Thermolyne - Sybron International, EE.UU.) usando cubetas de vidrio, ya que la piridina disuelve a las de plástico.

### Reactivos

El ácido elálgico fue obtenido de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico. La piridina debió usarse bajo campana por sus vapores irritantes.

### Análisis estadísticos

Los resultados fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) y al test de diferencia de medias LSD para determinar diferencias significativas entre los promedios de los tratamientos. Se consideraron valores estadísticamente significativos a  $P \leq 0,05$ .

## Resultados y Discusión

### Contenido de ácido elálgico en diferentes frutas

Los contenidos de ácido elálgico medidos en frutas de consumo masivo, se muestran en la Tabla 1. Hay una gran diferencia en el contenido de ácido elálgico presente en las frutillas, respecto a las restantes frutas evaluadas. Las frutillas mostraron, sin lugar a dudas, el contenido más alto (aproximadamente 7-8 veces), mientras en ninguna de las otras frutas el valor superaba los 0,07 mg g<sup>-1</sup> peso seco.

**Tabla 1.** Contenido de ácido elálgico en frutas de consumo masivo.

Frutas	Ácido elálgico (mg g <sup>-1</sup> peso seco)
Ananá	0,06 <sup>a</sup> ± 0,01
Banana	0,02 <sup>d</sup> ± 0,003
Ciruela	0,07 <sup>c</sup> ± 0,005
Frutilla	<b>0,50<sup>b</sup> ± 0,06*</b>
Kiwi	ND
Mandarina	0,04 <sup>a</sup> ± 0,01
Manzana roja	ND
Manzana verde	0,07 <sup>a</sup> ± 0,03
Naranja	ND
Pera	0,04 <sup>a</sup> ± 0,01

Promedio de 2 a 6 medidas ± SD.

(\*) Para frutillas: promedio de 24 determinaciones de la variedad Camarosa, 100 % color rojo ± SD.

ND: No detectado

Letras diferentes indican diferencias significativas a P ≤ 0,05

Incluso en las muestras de kiwi, manzanas rojas y naranjas, no fue detectado este nutraceutico.

Según los resultados obtenidos, se puede decir que las frutillas podrían contribuir aportando ácido elálgico en forma significativa en la dieta. No obstante, hay que tener en cuenta que aunque se ha demostrado que este nutraceutico proveniente de frambuesas tiene efectos anticancerígenos, se debería estu-

diar más profundamente respecto de su liberación en intestino y los procesos de absorción y metabolismo (15).

#### Contenido de ácido elálgico en frutillas

Los valores promedios del contenido de ácido elálgico para las diferentes variedades y en diferentes grados de madurez se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Contenido de ácido elálgico en frutillas de Coronda (Santa Fe, Argentina)\*, según la variedad y grado de madurez

Variedad	Ácido elálgico (mg g <sup>-1</sup> peso seco) **		
	0 % rojo	50 % rojo	100 % rojo
Camarosa	1,36 ± 0,07	0,87 ± 0,06	0,50 ± 0,06
Sweet Charly	1,25 ± 0,07	0,63 ± 0,09	0,42 ± 0,05
Chandler	2,07 ± 0,10	1,08 ± 0,11	0,46 ± 0,07
Oso Grande	0,99 ± 0,16	0,48 ± 0,11	0,20 ± 0,04
Milsei	1,60 ± 0,09	0,46 ± 0,04	0,16 ± 0,03

(\*) Las muestras fueron tomadas en Agosto, Septiembre, Octubre y Noviembre (Año 1999), dependiendo del periodo de madurez de cada variedad.

(\*\*) Promedio de 9 a 24 medidas ± SD.

Se puede observar que la variedad Chandler, que presenta el mayor contenido de ácido elálgico en las frutas inmaduras, no necesariamente es la de mayor contenido cuando la fruta madura.

#### Influencia de la variedad

Existen diferencias significativas ( $P \leq 0,001$ ) entre las distintas variedades. Los cultivares "Chandler" y "Camarosa" presentan el contenido de ácido elálgico más elevado cuando son considerados todos los grados de madurez, mientras que las variedades "Milsei" y "Oso Grande" exhiben los más bajos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Contenido promedio de ácido elálgico en las diferentes variedades de frutillas, considerando todos los grados de madurez juntos

Variedad	N° de Muestras	Ácido elálgico (mg g <sup>-1</sup> peso seco)
Chandler	44	1,21 <sup>a</sup>
Camarosa	70	0,91 <sup>b</sup>
Sweet Charly	45	0,78 <sup>c</sup>
Milsei	27	0,75 <sup>c</sup>
Oso Grande	45	0,56 <sup>d</sup>

Diferentes letras indican diferencias significativas a  $P \leq 0,05$ .

#### Influencia del grado de madurez

Existen diferencias significativas ( $P \leq 0,001$ ) entre los distintos grados de madurez. En las cinco variedades estudiadas, el contenido de ácido elálgico

en frutillas inmaduras (0% de color rojo) fue mayor que en las intermedias (50% de color rojo) y en estas últimas mayor que en las maduras (100% de color rojo) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Contenido promedio de ácido elálgico para diferentes grados de madurez, considerando todas las variedades juntas.

Madurez	N° de Muestras	Ácido elálgico (mg g <sup>-1</sup> peso seco)
0 % color rojo	77	1,42 <sup>a</sup>
50 % color rojo	77	0,72 <sup>b</sup>
100 % color rojo	77	0,37 <sup>c</sup>

Diferentes letras indican diferencias significativas a  $P \leq 0,05$ .

## Conclusiones

Las frutillas mostraron niveles de ácido elálgico significativamente mayores, en un orden de aproximadamente 7 y 8 veces más, que muchas frutas de consumo masivo.

Para las frutillas producidas en la zona de Coronda, se verificó que el contenido de ácido elálgico difiere según la variedad y grado de madurez, siendo el contenido mayor en las verdes que en las maduras. Cuando se consideró el contenido de ácido elálgico en frutillas maduras, la variedad Camarosa mostró el contenido más elevado.

Así, el consumo de frutilla que siempre se asoció con buena salud, pues es rica en ácido fólico, vitamina C (más que la naranja), fibra dietaria y potasio, renueva su interés por la presencia de ácido elálgico.

La ingesta de las frutillas como fuente de ácido elálgico es una oportunidad para aumentar su consumo y, como consecuencia, su producción, lo que beneficiaría a la provincias productoras y en definitiva al país.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado en parte por un Proyecto CAI+D de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe - Argentina) y a través de una Beca de la Subsecretaría de Cultura de la Provincia de Santa Fe, en el área Ecología y Ciencias Naturales. Los autores agradecen a la Sra. Norma Czerweny (Coronda, Santa Fe, Argentina) por proporcionar las frutillas utilizadas en este estudio.

## Nota

Información contenida en el presente trabajo, ha sido presentada en el "V Encuentro Bromatológico Latinoamericano", desarrollado en la ciudad de Córdoba, los días 17, 18, y 19 de mayo de 2000, bajo el título "Efecto de la variedad y grado de madurez en el contenido de ácido elálgico en frutillas".

El trabajo "Determinación de ácido elálgico en frutas por la técnica espectrofotométrica de Wilson-Hagerman", ha sido presentado en el "II Encuentro Bioquímico del Litoral", que se llevó a cabo en Santa Fe, los días 15, 16, y 17 de junio de 2000.

## Bibliografía

- 1- Witwer, RS. 1999. Marketing bioactive ingredients in foods products. *Food Technol.* 4, 53: 50-58.
- 2- Hasler, CM. 1998. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. *Food Technol.* 11, 52: 63-70.
- 3- Maas, JL; Galletta, GJ; Stoner, GD. 1991. Ellagic acid, an anticarcinogenic in fruits, especially in strawberries: A review. *HortScience* 1, 26: 10-14.
- 4- Wang, S; Maas, J; Payne, J; Galletta, G. 1994. Ellagic acid content in small fruits, mayhaws, and other plants. *Small Fruit & Viticulture.* 4, 2: 39-49.
- 5- 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. *J. Agric. Food Chem.* 10, 48: 4565-4570.
- 6- 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. *J. Agric. Food Chem.* 7, 46: 2686-2693.
- 7- Kalt, W; Forney, CF; Martin, A; Prior, RL. 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4638-4644.
- 8- Häkkinen, SH; Heinonen, IM; Kärenlampi, SO; Mykkänen, HM; Ruuskanen, J; Törrönen, AR. 1999. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Res. Inter.* 32: 345-353.
- 9- Maas, JL; Wang, SY; Galletta, GJ. 1991. Evaluation of strawberry cultivars for ellagic acid content. *HortScience* 1, 26: 66-68.
- 10- Wang, S; Galletta, G; Camp, M; Kasperbauer, M. 1998. Mulch types affect fruit quality and composition of two strawberry genotypes. *HortScience.* 4, 33: 636-640.
- 11- 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.
- 12- Wilson, TC; Hagerman, AE. 1990. Quantitative determination of ellagic acid. *J. Agric. Food Chem.* 8, 38: 1678-1683.
- 13- Häkkinen, SH; Kärenlampi, SO; Heinonen, IM; Mykkänen, HM; Törrönen, AR. 1998. HPLC Method for Screening of Flavonoids and Phenolic Acids in Berries. *J. Sci. Food Agric.* 77: 543-551.
- 14- Quattrocchi, OA; Abelaira, SI; Laba, RF. 1992. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Sarro S.A., Buenos Aires.
- 15- Stoner, GD; Mukhtar, H. 1995. Polyphenols as cancer chemo-preventive agents. *J. Cellular Biochem., Supplement* 22: 169-180.