

**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 Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

**EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS A  
PARTIR DEL RESIDUO AGROINDUSTRIAL DE  
FRUTILLA (*FRAGRARIA X ANANASSA*)**

por

Ing. Alim. Johan Esteban VILLAMIL GALINDO

Directora de Tesis: Mg. Andrea M. PIAGENTINI

Co-Director de Tesis: Dr. Franco Van de Velde

Miembros del Jurado:

**INSTITUTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
(FIQ-UNL)**

**- 2021 -**

***When I was a young man, I wanted to change the world.***

***I found it was difficult to change the world, so I tried to change  
my nation.***

***When I found I couldn't change the nation, I began to focus on my  
town. I couldn't change the town and as an older man, I tried to  
change my family.***

***Now, as an old man, I realize the only thing I can change is  
myself, and suddenly I realize that if long ago I had changed  
myself, I could have made an impact on my family. My family and  
I could have made an impact on our town. Their impact could  
have changed the nation and I could indeed have changed the  
world.***

***Author: Unknown Monk 1100 A.D.***

***A Dios, mis padres y a mi familia.  
En memoria de mi abuelo José Galindo.***

**La presente tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a reuniones científicas:**

**Publicaciones:**

Villamil-Galindo, E., Van de Velde, F., Piagentini, A.M., EXTRACTS FROM STRAWBERRY BY-PRODUCTS RICH IN PHENOLIC COMPOUNDS REDUCE THE ACTIVITY OF APPLE POLYPHENOL OXIDASE, *LWT Food Science and Technology* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110097>.

**Presentaciones a reuniones científicas:**

- XXI Congreso latinoamericano y del caribe de ciencia y tecnología de alimentos y XVII Congreso argentino de ciencia y tecnología de alimentos  
Fecha: 20-noviembre- 22 noviembre-2019  
Lugar: Universidad Católica, Buenos aires, Argentina  
Título de trabajo presentado: INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN EN LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS A PARTIR DEL RESIDUO DEL ACONDICIONAMIENTO DE FRUTILLAS VARIEDAD 'FESTIVAL'
- XXI Congreso latinoamericano y del caribe de ciencia y tecnología de alimentos y XVII Congreso argentino de ciencia y tecnología de alimentos  
Fecha: 20-noviembre- 22 noviembre-2019  
Lugar: Universidad Católica, Buenos aires, Argentina  
Título de trabajo presentado: INHIBICIÓN DE LA ENZIMA POLIFENOLOXIDASA DE MANZANA 'RED DELICIOUS' MEDIANTE UN EXTRACTO POLIFENÓLICO OBTENIDO A PARTIR DE RESIDUOS DEL ACONDICIONAMIENTO DE FRUTILLA
- II Congreso argentino de biología y tecnología poscosecha  
Tipo de evento: Congreso  
Fecha: 11-septiembre- 13 septiembre-2019  
Lugar: Nodo tecnológico Santiago del Estero, Argentina  
Título de trabajo presentado: IMPACTO DEL SOLVENTE Y LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN EN LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS A PARTIR DE RESIDUOS DEL PROCESAMIENTO DE FRUTILLAS Y MANZANAS.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesores de tesis: Mag. Andrea Piagentini y el Dr. Franco Van de Velde. Por confiar en mí abriéndome las puertas del laboratorio, además, por brindarme sus conocimientos y orientación para seguir formándome en el mundo académico.

A todos los que hacen parte del Instituto de Tecnología de los Alimentos (ITA-FIQ), por sus colaboraciones, compañía y enseñanzas. Orgulloso de hacer parte de esta familia

Para el grupo de Conservación de Alimentos del ITA, a la Mag. Mariel Pirovani, Cecilia Fenoglio, Charito Vignatti, Roberto Ceruti, quienes me acogieron, y sin sus colaboraciones esto no sería posible.

Al grupo de Microbiología de Alimentos (ITA-FIQ) por su amable colaboración con los análisis y disposición para ayudarme con este trabajo.

A la Ing. Maria del Huerto Sordo del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Coronda, por su amable colaboración suministrando los subproductos del acondicionamiento industrial de frutilla, además de abrirnos las puertas de sus campos para conocer los cultivos de este fruto.

A mis queridos chenchinis (Gladys, Dina, Paula, Mayu, Juan, Franco y Jani) por formar esa amistad incondicional y ser un pilar fundamental en este tramo de mi vida a pesar de estar lejos de casa.

A la Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química, por otorgarme las herramientas para obtener una excelente formación de calidad, adicionalmente por brindarme todos los espacios necesarios para llevar a cabo este trabajo.

A todo el personal no docente de la Facultad de Ingeniería Química-UNL, especialmente al personal de servicios generales que, sin su importante labor, sería muy difícil llevar a cabo nuestros trabajos.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, Argentina) por su financiación a través del PICT-2017-406.

Al ingeniero Jesús Antonio Galvis, por la motivación y colaboración prestada para poder realizar este posgrado.

A mi hermosa familia, quienes son el motor de mi vida, en especial a mis padres y mis hermanos Cris y Sebas, por su amor incondicional que rompe fronteras y que me hace sentirlos cerca, por todos sus esfuerzos. A mi abuela Ruby por ser un apoyo incansable y ser una constante motivación para sacar todo esto adelante. A mis abuelos Zoila y Gerardo por su cariño y apoyo.

A todos mis seres queridos que me acompañan desde el cielo y no pudieron ver este logro en vida (Jairo, Noel, Hernando, José Vargas), especialmente a mi Abuelo José Galindo quien siempre me apoyó y me motivó para salir adelante y buscar nuevos retos.

A todos mis amigos en Colombia que a pesar del tiempo y la distancia nunca me han dejado de apoyar y siempre me esperan con los brazos abiertos, una cerveza y un balón de futbol.

A mi novia Fernandita, por tanto amor, paciencia y cariño.

A todos y cada uno MIL GRACIAS.

# INDICE DE CONTENIDOS

---

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

### Contenido

ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
ABREVIATURAS .....	xv
RESUMEN .....	xviii
1. INTRODUCCIÓN .....	21
1.1. Consideraciones generales .....	21
1.2. Generalidades sobre el cultivo y mercado de frutillas .....	22
1.3. Subproductos del procesamiento agroindustrial de frutillas .....	25
1.4. Compuestos Fenólicos .....	27
1.4.1. Compuestos fenólicos presentes en la frutilla.....	30
1.4.2. Compuestos fenólicos presentes en la parte no comestible de la frutilla .....	32
1.5. Especies reactivas al oxígeno (ROS) y capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos .....	33
1.6. Efectos de los compuestos fenólicos de frutilla en la salud.....	35
1.7. Actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos.....	36
1.8. La polifenoloxidasasa (PPO) y la calidad de las frutas y hortalizas frescas .....	38
1.8.1. Compuestos fenólicos como sustratos de las enzimas PPO .....	39
1.8.2. Control del pardeamiento .....	39
1.8.3. Clasificación de inhibidores .....	40
1.8.4. Cinética de inhibición enzimática.....	41
1.9. Proceso de extracción de compuestos antioxidantes de una matriz alimentaria .....	43
1.9.1. Disolventes.....	44
1.9.2. Relación Solvente-Sólido .....	46
1.9.3. Temperatura y tiempos de extracción.....	47
1.9.4. Tamaño de partícula .....	48
1.9.5. Influencia del pH.....	48
1.9.6. Determinación de Compuestos Fenólicos.....	48
1.10. Extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industrialización de frutas y hortalizas .....	49
1.11. OBJETIVOS .....	51
1.11.1. Objetivo general .....	51
1.11.2. Objetivos específicos.....	51
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	53



2.1. Material Vegetal.....	53
2.2. Almacenamiento y preparación de las muestras.....	53
2.3. Extracción de compuestos fenólicos.....	54
2.3.1. Diseño experimental.....	54
2.3.2. Ensayos de extracción .....	55
2.4. Determinaciones analíticas.....	58
2.4.1. Contenido de fenoles totales (FT) .....	58
2.4.1.1. Curva estándar con ácido gálico.....	58
2.4.1.2. Medición de compuestos fenólicos totales.....	59
2.4.2. Contenido de Flavonoides totales.....	59
2.4.3. Perfil de compuestos fenólicos .....	61
2.4.3.1. Equipo y software.....	62
2.4.3.2. Condiciones cromatográficas .....	62
2.4.3.3. Identificación de los compuestos fenólicos .....	62
2.4.3.4. Cuantificación de los compuestos fenólicos .....	62
2.4.4. Capacidad antioxidante mediante el método del radical DPPH* .....	65
2.4.5. Capacidad antioxidante mediante el método del poder antioxidante de reducción del hierro (FRAP) .....	68
2.4.6. Actividad antibacteriana .....	70
2.4.7. Ensayo de inhibición de la enzima polifenol oxidasa (PPO) de manzana ( <i>Malus domestica</i> cv. 'Red Delicious') .....	70
2.4.7.1. Extracción de la enzima PPO .....	71
2.4.7.2. Determinación de la actividad de la enzima PPO .....	71
2.4.7.3. Determinación de los parámetros cinéticos de la PPO de manzana .....	73
2.4.7.4. Efecto del extracto acuoso del tejido residual de frutilla como inhibidor de la PPO de manzanas 'Red Delicious' .....	74
2.4.7.5. Determinación del tipo de inhibición enzimática.....	75
2.4.7.6. Determinación de la constante de inhibición (Ki) .....	77
2.5. Análisis Estadístico.....	78
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	81
3.1. Efecto de las variables de extracción sobre el contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de los extractos .....	81
3.2. Contenido de fenoles totales de los extractos del residuo vegetal de la industrialización de frutilla .....	83
3.3. Contenido de flavonoides totales de los extractos del residuo vegetal de la industrialización de frutilla .....	89
3.4. Perfil de compuestos fenólicos de los extractos del residuo vegetal de la industrialización de frutillas.....	94

3.5. Capacidad antioxidante de los extractos del residuo vegetal de la industrialización de frutilla .....	107
3.6. Estudio de correlación entre los compuestos fenólicos extraídos y la actividad antioxidante.....	115
3.8. Inhibición de la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO) de manzana ‘Red Delicious’ .....	120
3.8.1. Parámetros cinéticos de la enzima PPO de manzana ‘Red Delicious’ .....	120
3.8.2. Efecto inhibitor del extracto del residuo de la industrialización de frutilla sobre la actividad de la enzima PPO.....	123
3.8.3. Tipo de Inhibición ejercida por el extracto del residuo de la industrialización de frutilla sobre la PPO .....	124
3.8.4. Constantes de inhibición (K <sub>i</sub> ).....	126
4. CONCLUSIONES.....	129
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	133

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.1.</b> CALENDARIO PRODUCTIVO DE FRUTILLAS EN ARGENTINA.....	24
<b>TABLA 1.2.</b> COMPOSICIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN FRUTILLA (GIAMPIERI ET AL., 2012). .....	31
<b>TABLA 1.3.</b> PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE INHIBIDORES REVERSIBLES E IRREVERSIBLES. .	43
<b>TABLA 1.4.</b> PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS SOLVENTES USADOS EN LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS .....	45
<b>TABLA 1.5.</b> EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES DE ALGUNOS SUB-PRODUCTOS.....	49
<b>TABLA 2. 1</b> DISEÑO EXPERIMENTAL.....	54
<b>TABLA 2. 2</b> FACTORES Y NIVELES DE CADA ENSAYO DE EXTRACCIÓN .....	55
<b>TABLA 3.1.</b> PROPIEDADES SOLVATOCRÓMICAS DE LAS MEZCLAS DE SOLVENTES EXTRACTANTES UTILIZADOS .....	81
<b>TABLA 3. 2</b> ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) MULTIFACTORIAL.....	82
<b>TABLA 3. 3</b> CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (FT) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA PARA LA EXTRACCIÓN EN UNA ETAPA. ....	84
<b>TABLA 3.4.</b> CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (FT) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA PARA LA EXTRACCIÓN EN DOS ETAPAS.....	86
<b>TABLA 3.5.</b> CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (FT) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA PARA LOS DIFERENTES SISTEMAS DE EXTRACCIÓN. ....	89
<b>TABLA 3.6.</b> CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES (FVT) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA PARA LA EXTRACCIÓN EN UNA ETAPA. ....	90
<b>TABLA 3.7.</b> CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES (FVT) EN EL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA PARA LA EXTRACCIÓN EN DOS ETAPAS.....	92
<b>TABLA 3.8.</b> CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES (FVT) EN EL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA PARA LOS DIFERENTES SISTEMAS DE EXTRACCIÓN. ....	94
<b>TABLA 3.9.</b> TIEMPOS DE RETENCIÓN Y LONGITUDES DE ONDA DE DETECCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DEL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLAS. ....	96
<b>TABLA 3.10.</b> ANÁLISIS DE LA VARIANZA MULTIFACTORIAL PARA EL PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA. ....	96
<b>TABLA 3.11.</b> CONTENIDO DE TETRAGALOIL-GLUCOSA (1) EN EL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLAS PARA LOS DISTINTOS SISTEMAS DE EXTRACCIÓN.....	97
<b>TABLA 3.12.</b> CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO PENTÓSIDO (2) EN EL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLAS PARA LOS DISTINTOS SISTEMAS DE EXTRACCIÓN.....	98
<b>TABLA 3.13.</b> CONTENIDO DE AGRIMONIIN (3) EN EL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLAS PARA LOS DISTINTOS SISTEMAS DE EXTRACCIÓN. ....	100
<b>TABLA 3.14.</b> CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO (4) EN EL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLAS PARA LOS DISTINTOS SISTEMAS DE EXTRACCIÓN. ....	102
<b>TABLA 3.15.</b> CONTENIDO DE QUERCETINA-3-O-GLUCURÓNIDO (5) EN EL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLAS PARA LOS DISTINTOS SISTEMAS DE EXTRACCIÓN.....	103
<b>TABLA 3.16.</b> CONTENIDO DE KAEMPFEROL-3-O-GLUCURÓNIDO (6) EN EL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLAS PARA LOS DISTINTOS SISTEMAS DE EXTRACCIÓN.....	104
<b>TABLA 3. 17</b> CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES ANALIZADOS POR HPLC (CFT <sub>HPLC</sub> ) EN EL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLAS PARA LOS DISTINTOS SISTEMAS DE EXTRACCIÓN.....	106

<b>TABLA 3.18.</b> CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA MEDIANTE EL MÉTODO DPPH ( $CA_{DPPH}$ ) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA EN 1 ETAPA.....	108
<b>TABLA 3.19.</b> CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA MEDIANTE EL MÉTODO DPPH ( $CA_{DPPH}$ ) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA EN 2 ETAPAS.....	109
<b>TABLA 3.20.</b> CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA MEDIANTE EL MÉTODO DPPH ( $CA_{DPPH}$ ) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA PARA LOS DISTINTOS SISTEMAS DE EXTRACCIÓN.....	110
<b>TABLA 3.21.</b> CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA MEDIANTE EL MÉTODO FRAP ( $CA_{FRAP}$ ) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA PARA EXTRACCIÓN EN 1 ETAPA (1:10).....	111
<b>TABLA 3.22.</b> CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA MEDIANTE EL MÉTODO FRAP ( $CA_{FRAP}$ ) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA PARA EXTRACCIÓN EN 2 ETAPAS.....	113
<b>TABLA 3.23.</b> CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA MEDIANTE EL MÉTODO FRAP ( $CA_{FRAP}$ ) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA PARA LOS DISTINTOS SISTEMAS DE EXTRACCIÓN.....	114
<b>TABLA 3.24.</b> CORRELACIÓN DE LAS DISTINTAS RESPUESTAS ESTUDIADAS PARA EXTRACCIÓN EN 1 ETAPA SIN ÁCIDO.....	116
<b>TABLA 3.25.</b> CORRELACIÓN DE LAS DISTINTAS RESPUESTAS ESTUDIADAS PARA LA EXTRACCIÓN EN 1 ETAPA CON ÁCIDO.....	116
<b>TABLA 3.26.</b> CORRELACIÓN DE LAS DISTINTAS RESPUESTAS ESTUDIADAS PARA LA EXTRACCIÓN EN 2 ETAPAS SIN ÁCIDO.....	117
<b>TABLA 3.27.</b> CORRELACIÓN DE LAS DISTINTAS RESPUESTAS ESTUDIADAS PARA LA EXTRACCIÓN EN 2 ETAPAS CON ÁCIDO.....	117
<b>TABLA 3.28.</b> PENDIENTE PARA CADA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO.....	121
<b>TABLA 3.29.</b> PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA PPO DE MANZANA RED DELICIOUS PARA EL EXTRACTO ACUOSO DEL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA (RF) Y ÁCIDO ASCÓRBICO (AA) EN DISTINTAS CONCENTRACIONES.....	123
<b>TABLA 3.30.</b> TIPO DE INHIBICIÓN EJERCIDA POR CADA INHIBIDOR.....	125

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.1.</b> PARTES DE LA FRUITLLA (FRAGARIA X ANANASSA).....	22
<b>FIGURA 1.2.</b> PROCESO DE DESPALILLADO MANUAL. ....	27
<b>FIGURA 1.3.</b> DESPALILLADOR DE ACERO INOXIDABLE. ....	27
<b>FIGURA 1.4.</b> CLASIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES Y COMPUESTOS REPRESENTATIVOS (STOYAN Y HÖGGER, 2019).....	28
<b>FIGURA 1.5.</b> CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES QUÍMICAS TÍPICAS DE LOS FLAVONOIDES (I), ANTOCIANIDINAS (II), PROANTOCIANIDINAS (III), ÁCIDO CINÁMICO (IV) Y ÁCIDO BENZOICO (V).....	29
<b>FIGURA 2.1.</b> TEJIDO VEGETAL DESCARTADO EN EL PROCESAMIENTO DE FRUITLLA FRAGARIA x ANANASSA VARIEDAD ‘FESTIVAL’ .....	53
<b>FIGURA 2.2.</b> PROCESO DE EXTRACCIÓN EN UNA ETAPA DE COMPUESTOS FENÓLICOS A PARTIR DEL DESCARTE DE FRUTILLAS. ....	56
<b>FIGURA 2.3.</b> PROCESO DE EXTRACCIÓN EN 2 ETAPAS DE COMPUESTOS FENÓLICOS A PARTIR DEL DESCARTE DE FRUTILLAS.....	57
<b>FIGURA 2.4.</b> CURVA DE CALIBRADO CON ÁCIDO GÁLICO. ....	58
<b>FIGURA 2.5.</b> FORMACIÓN DEL COMPLEJO FLAVONOIDE-TRICLORURO DE ALUMINIO. FUENTE: AMAYA Y PORTILLO, (2013).....	60
<b>FIGURA 2.6</b> CURVA DE CALIBRADO DE FLAVONOIDES TOTALES. ....	61
<b>FIGURA 2.7,</b> CURVA DE CALIBRADO DE ÁCIDO ELÁGICO.....	63
<b>FIGURA 2.8.</b> CURVA DE CALIBRADO PARA KAEMPFEROL-3-O-GLUCÓSIDO. ....	64
<b>FIGURA 2.9.</b> CURVA DE CALIBRADO PARA QUERCETINA-3-O-GLUCOSIDO.....	65
<b>FIGURA 2.10.</b> REACCIÓN QUÍMICA ENTRE EL RADICAL DPPH* Y LA ESPECIE ANTIOXIDANTE. FUENTE: (LA ROSA TORO ET AL., 2011). ....	66
<b>FIGURA 2.11.</b> CURVA DE CALIBRADO CON TROLOX.....	67
<b>FIGURA 2.12.</b> REACCIÓN DE REDUCCIÓN DEL HIERRO (FRAP). FUENTE: (GIL ET AL., 2012)...	68
<b>FIGURA 2. 13</b> CURVA DE CALIBRADO $FeSO_4$ .....	69
<b>FIGURA 2.14</b> DETERMINACIÓN DE LAS VELOCIDADES INICIALES ( $V_0$ ) DE REACCIÓN PARA CADA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO [S] UTILIZADA. ....	72
<b>FIGURA 2.15.</b> EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCIÓN. ECUACIÓN DE MICHAELIS – MENTEN. FUENTE: TIPTON, (1996).....	73
<b>FIGURA 2.16</b> GRÁFICA DE LINEWEAVER-BURK O DEL DOBLE RECÍPROCO. FUENTE: MACÍAS ET AL. (2018). ....	74
<b>FIGURA 2.17.</b> LINEALIZACIÓN DE LINEWEAVER-BURK PARA LOS DIFERENTES TIPOS DE INHIBICIÓN FUENTE: ROTBART ET AL. (2018) .....	75
<b>FIGURA 2.18.</b> ESQUEMA DEL ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA PPO DE MANZANA ‘RED DELICIOUS’. .....	78
<b>FIGURA 3.1.</b> CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (FT) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUITLLA PARA LA EXTRACCIÓN EN UNA ETAPA.....	83
<b>FIGURA 3.2.</b> CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (FT) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUITLLA PARA LA EXTRACCIÓN EN 2 ETAPAS. ....	87
<b>FIGURA 3.3.</b> CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (FT) PARA LOS DIFERENTES SISTEMAS DE EXTRACCIÓN.....	88
<b>FIGURA 3.4.</b> CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES (FvT) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUITLLA PARA LA EXTRACCIÓN EN UNA ETAPA. ....	90
<b>FIGURA 3.5.</b> CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES (FvT) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUITLLA PARA LA EXTRACCIÓN EN DOS ETAPAS.....	91

<b>FIGURA 3.6.</b> CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES (FVT) PARA LOS DIFERENTES SISTEMAS DE EXTRACCIÓN.....	93
<b>FIGURA 3.7.</b> CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO DEL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA CON MEOH-A SIN ÁCIDO EN 1 ETAPA. (A) LONGITUD DE ONDA 254 NM. (B) LONGITUD DE ONDA 360 NM.....	95
<b>FIGURA 3.8.</b> CONTENIDO DE TETRAGALOIL GLUCOSA ISÓMERO (1).....	97
<b>FIGURA 3.9</b> CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO PENTOSIDO (2).....	99
<b>FIGURA 3.10.</b> CONTENIDO DE AGRIMONIIN (3).....	101
<b>FIGURA 3.11</b> CONTENIDO DE ÁCIDO ELÁGICO (4). ....	102
<b>FIGURA 3.12</b> CONTENIDO DE QUERCETINA-3-O-GLUCURÓNIDO (5). ....	104
<b>FIGURA 3.13.</b> CONTENIDO DE KAEMPFEROL-3-O-GLUCURÓNIDO (6). ....	105
<b>FIGURA 3.14</b> CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES ANALIZADOS POR HPLC (CFT <sub>HPLC</sub> ) EN EL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLAS PARA LOS DISTINTOS SISTEMAS DE EXTRACCIÓN.....	107
<b>FIGURA 3.15.</b> CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA MEDIANTE EL MÉTODO DPPH (CA <sub>DPPH</sub> ) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA EN 1 ETAPA. ....	108
<b>FIGURA 3.16.</b> CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA MEDIANTE EL MÉTODO DPPH (CA <sub>DPPH</sub> ) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA EN 2 ETAPAS. ....	110
<b>FIGURA 3.17.</b> CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA MEDIANTE EL MÉTODO FRAP (CA <sub>FRAP</sub> ) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA PARA EXTRACCIÓN EN 1 ETAPA. ....	111
<b>FIGURA 3.18.</b> CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA MEDIANTE EL MÉTODO FRAP (CA <sub>FRAP</sub> ) EN EL RESIDUO VEGETAL DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA PARA EXTRACCIÓN EN 2 ETAPAS. ....	112
<b>FIGURA 3.19.</b> CULTIVOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS (A) Y LISTERIA MONOCYTOGENES (B), EN PRESENCIA DEL EXTRACTO ACUOSO DEL RESIDUO DE LA INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTILLA LUEGO DE 24 H A 37°C. ....	119
<b>FIGURA 3.20.</b> ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PPO DE MANZANA RED DELICIOUS PARA DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO CATECOL (5-40 mM). ....	121
<b>FIGURA 3.21</b> DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS PARA LA ENZIMA PPO DE MANZANA 'RED DELICIOUS'.....	122
<b>FIGURA 3.22.</b> INHIBICIÓN DE LA PPO DE MANZANA 'RED DELICIOUS' CON EL EFECTO DEL INHIBIDOR (RF).....	125
<b>FIGURA 3.23.</b> COMPARACIÓN LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA PPO CON Y SIN EL INHIBIDOR (AA 0.4 MG/ML). ....	126

**ABREVIATURAS**

**[I]:** concentración de inhibidor

**[S]:** Concentración de sustrato

**A:** Agua

**AA:** Ácido ascórbico

**AC-A:** Acetona 80%

**ADHA:** Ácido dehidroascórbico

**AE:** Ácido elágico

**AF:** Ácido fórmico

**AGE:** Ácido gálico equivalente

**CA<sub>DPPH</sub>:** Capacidad antioxidante por el método de DPPH

**CA<sub>AF</sub>:** Concentración de ácido fórmico

**CA<sub>FRAP</sub>:** Capacidad antioxidante por el método de FRAP

**CBM:** Concentración bactericida mínima

**CE – ESI-TOF-MS:** Electroforesis capilar acoplada al tiempo de ionización por electropulverización espectrometría de masas en vuelo

**CE-ED:** Electroforesis capilar con detección electroquímica

**DAD:** Arreglo de diodos

**EAU:** Extracción asistida por ultrasonido

**EAU:** Extracción asistida por ultrasonido

**EC:** Extracción convencional

**EE:** Número de etapas de extracción

**EtOH-A:** Etanol 80%

**Fd:** Factor de dilución

**FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

**FT:** Fenoles totales

**FvT:** Flavonoides totales

**G.L:** Grados de libertad

**GC-FID:** Cromatografía gas-líquido con ionización de llama

**GC-MS:** Cromatografía gas-líquido combinada con espectrometría de masas

**GRAS:** Generalmente reconocido como seguro

**HPLC:** Cromatografía líquida de alto rendimiento

**HR:** Humedad relativa

**I:** Porcentaje de inhibición

**INTA:** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

**K3G:** Kaempferol-3- *O*-glucósido

**Ki:** Constante de inhibición

**Km:** Constante de Michaelis-Menten

**Km´:** Constante de Michaelis-Menten en presencia del inhibidor

**MeOH-A:** Metanol 80%

**MIC:** Concentración mínima inhibitoria

**ppm:** Partes por millón

**PPO:** Enzima Polifenol oxidasa

**PVPP:** Polivinilpolipirrolidona

**Q3G:** Quercetina-3- *O*-glucósido

**Rel Ext:** Relación de extracción

**RF:** Residuo de frutilla fresco

**ROS:** Especies reactivas al oxígeno

**RP:** Fase reversa

**St/S:** Relación Solvente-sólido

**S:** Sustrato

**SO<sub>2</sub>:** Anhídrido sulfuroso

**SST:** Sólidos solubles totales

**St:** Solvente

**TE:** Trolox equivalente

**t<sub>R</sub>:** Tiempo de retención

**TSA:** Triptona soja agar

**TSB:** Caldo triptona soja

**U:** Unidades de actividad PPO por gramo de manzana fresca

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**V<sub>max</sub>:** Velocidad máxima de la enzima PPO

**V<sub>max</sub>´:** Velocidad máxima de la enzima PPO en presencia del inhibidor

**Vo:** Velocidad inicial de la enzima PPO



**$V_o$** : Velocidad inicial de la enzima PPO en presencia del inhibidor

**Vol Ext Rxn**: Volumen del extracto en la reacción

**Vol Rxn**: Volumen final de la reacción

**$\Delta$ Abs**: Cambio de absorbancia

**$\lambda$** : Longitud de onda

## RESUMEN

El acondicionamiento industrial de frutilla genera varios residuos de la planta (pedúnculo, sépalo y restos de fruto) constituyendo hasta un 20% de la cosecha. Estos tejidos vegetales presentan un problema al no contar con una adecuada disposición final, teniendo así un impacto negativo en el ambiente. No obstante, dentro de la composición de estos tejidos vegetales podemos encontrar diversos compuestos que tienen potenciales beneficios para la salud, tal es el caso de los compuestos fenólicos, cuya extracción puede representar una opción para darle un valor agregado a estos residuos. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar el impacto de distintos sistemas de extracción usando agua y diferentes solventes orgánicos sobre el contenido de compuestos fenólicos, su capacidad antioxidante, su actividad antimicrobiana y su habilidad para inhibir la actividad de la enzima polifenol oxidasa. El estudio se realizó variando: el tipo de solvente [agua (100%) y etanol, metanol y acetona (80%)], la concentración de ácido fórmico [0 y 0,5%] y el número de etapas de extracción [1 y 2 etapas]. El contenido de fenoles (FT) y flavonoides totales (FvT) fueron determinados por técnicas espectrofotométricas, y adicionalmente se analizaron mediante HPLC-DAD. La capacidad antioxidante fue determinada mediante las técnicas DPPH ( $CA_{DPPH}$ ) y FRAP ( $CA_{FRAP}$ ). La actividad antimicrobiana del extracto acuoso del residuo de frutilla se determinó sobre las cepas de: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Newport* y *Staphylococcus aureus*. Además, se estudió la capacidad y tipo de inhibición del extracto del residuo de frutillas (RF) sobre la actividad de la enzima PPO extraída de la manzana cv `Red Delicious`. Los extractos del RF con metanol 80% acidificado en 2 etapas presentaron los mayores rendimientos para FT (15.01 mg ácido gálico equivalente <AGE>/g RF) ( $p < 0,001$ ), seguido por los extractos con acetona 80%, etanol 80% y agua. El contenido de FvT de RF con acetona 80% sin acidificar presentó el mejor rendimiento (1,9 mg quercetina/g RF), representando el 32,6% de los FT. La acidificación de acetona 80%, redujo el contenido de FvT a 1 mg quercetina/g RF, un 14,5% de los FT extraídos. La  $CA_{DPPH}$  de los extractos con metanol y acetona en 2 etapas con y sin ácido fueron 25% superiores a las obtenidas en los extractos con agua y etanol en esas condiciones, correlacionando con FT ( $R^2 > 0,8$ ) ( $p < 0,01$ ) en todos los casos. La  $CA_{FRAP}$  no presentó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los extractos de metanol y acetona en 1 etapa, con y sin agregado de ácido, siendo 35% mayor a la obtenida con etanol y agua. Además, la extracción en 2 etapas con acetona acidificada mostró 32% más  $CA_{FRAP}$  que con agua. Las extracciones con solventes verdes (agua y etanol) en 2 etapas con y sin ácido presentaron un contenido de FT similares a los obtenidos por metanol y acetona en una etapa ( $\approx 9$  mg/g RF). Se identificaron y cuantificaron seis compuestos fenólicos mayoritarios en los diferentes extractos: tetragaloil-

---

glucosa (1), ácido elágico pentósido (2), agrimoniin (3), ácido elágico libre (4), quercetin-glucurónido (5) y kaempferol-glucurónido (6). El compuesto (3) fue el mayoritario en todos los extractos, y los mejores rendimientos se obtuvieron con acetona en 2 etapas sin ácido (2,45 mg/g). Este elagitanino fue el único polifenol que correlacionó ( $R^2 > 0.80$ ,  $p < 0.05$ ) con las actividades antioxidantes. El extracto de RF (0,24 mg AGE /mL) no presentó actividad antimicrobiana sobre las cepas evaluadas en la concentración ensayada. Adicionalmente, el extracto fenólico de RF (0,24 mg AGE /mL) presentó un 30% de inhibición sobre la actividad del extracto de PPO de manzana, en una inhibición del tipo "incompetitiva". Los resultados de este trabajo muestran el potencial que tienen los tejidos vegetales, residuos del acondicionamiento industrial de frutillas como una fuente de bajo costo de compuestos fenólicos con actividad antioxidante e inhibitoria del pardeamiento enzimático.

# 1. Introducción

---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Consideraciones generales

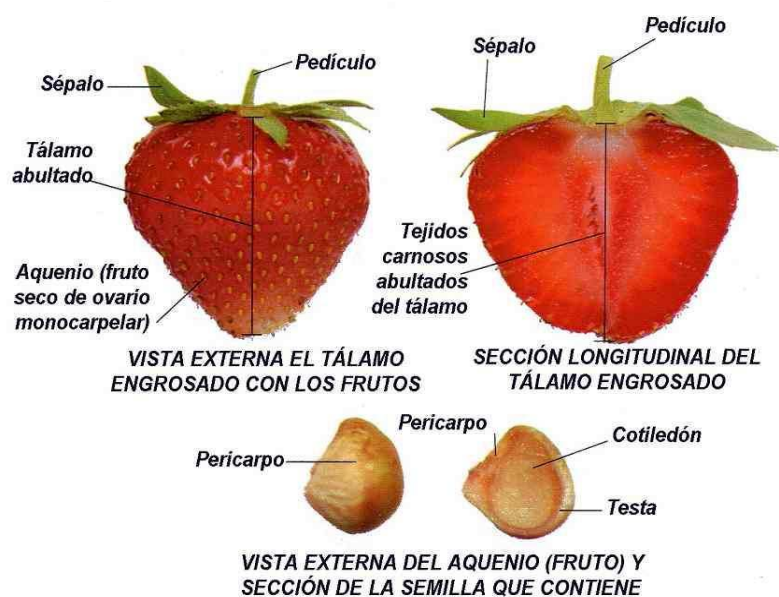
Históricamente las frutas han sido conocidas como una fuente rica en micronutrientes esenciales y fibra. Recientemente, las frutas son reconocidas además por ser una importante fuente de una amplia gama de fitoquímicos, como lo son los compuestos fenólicos o polifenoles, que individualmente o combinados pueden traer diversos beneficios a la salud de quienes los consumen (Haminiuk et al., 2012).

La extracción, identificación y cuantificación de los polifenoles ha generado un gran interés debido a que en diversos estudios se afirma que poseen propiedades promotoras para la salud, tales como antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria, antiviral, antialérgica, entre otras. Además, los compuestos fenólicos retardan los cambios oxidativos en los alimentos, mejorando así la calidad y el valor nutricional de los mismos (Harbourne et al., 2013; Huang et al., 2010; Ijaz et al., 2018; Kang-Mu et al., 2009; Rodríguez-Arzuaga y Piagentini, 2018; Franco Van De Velde et al., 2013).

Dentro de las distintas matrices vegetales en donde podemos encontrar dichos compuestos se destacan las frutas de consumo masivo, como el caso de la frutilla. Entre los compuestos fenólicos encontrados en frutilla se destacan los flavonoides del tipo antocianinas, los taninos hidrolizables (elagitaninos), algunos flavonoles (glucósidos de quercetina y kaempferol), derivados del ácido hidroxicinámico (ácido *p*-coumárico), ácido elágico y glucósidos de ácido elágico (Aaby et al., 2012; Buendía et al., 2010; Fracassetti et al., 2013). La frutilla comercial, *Fragaria × ananassa*, se originó hace aproximadamente 250 años cuando algunos clones de Sudamérica de *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana* se hibridaron accidentalmente en jardines europeos (Hancock et al., 2008). Los cultivares originarios desempeñaron un papel predominante en los programas de cultivo públicos y privados dentro de los siguientes 100 años (Hancock et al., 2005). El género *Fragaria* pertenece a la familia *Rosaceae*, una familia económicamente importante que contiene muchos cultivos (por ejemplo: *Malus*, *Pyrus*, *Prunus* y *Rubus*) y ornamentales (por ejemplo: *Rosa* y *Sorbus*). Este género es un miembro de la subfamilia *Rosoideae* y consta de aproximadamente 20 especies que pueden ser diploides, tetraploides, hexaploides u octoploides. Estas incluyen muchas especies salvajes diploides como *Fragaria nubicola* (Lindl. ex Hook. f.) *Lacaita* y *Fragaria vesca* L. y la frutilla cultivada *Fragaria × ananassa* ( $2n = 8x = 56$ ) (Sargent et al., 2006). Las *Fragarias* son plantas perennes, con hojas y flores en un mechón basal que produce tallos postrados o corredores. Las hojas son trifoliadas

con estípulas membranosas y hojuelas de serradas obovadas cuneadas. Las flores son blancas e insertadas en un cáliz persistente, con cinco brácteas, alternadas con los lóbulos del cáliz. Como una baya, los frutos se forman a partir del agrandamiento succulento del receptáculo (Gündüz, 2015).

Las frutillas pueden ser consumidas “in natura”, lo cual representa una ventaja para los consumidores debido a que no se producen pérdidas de nutrientes debido al procesamiento (Cordenunsi et al., 2005). Luego de la cosecha se recomienda almacenar las frutillas inmediatamente a bajas temperaturas, ya que las frutas poseen una vida postcosecha extremadamente corta (vida media de 2 o 3 días). Esto, por lo general, se logra por medio de la aplicación de aire forzado a 1°C (Satish Kuchi y Sai Ratna Sharavani, 2019). Luego se recomienda mantener las frutillas en condiciones atmosféricas óptimas (90-95% HR, 5-10% O<sub>2</sub> y 15-20% CO<sub>2</sub>) y temperatura adecuada (0°C) para que el producto tenga una vida útil que oscile entre los 7-10 días en fresco (Jadhav y Gurav, 2018).



**Figura 1.1.** Partes de la frutilla (*Fragaria x ananassa*)

Las frutillas en realidad no son frutas, sino el final alargado del estambre de la planta (Figura 1.1). Cuentan con más de 200 semillas en su piel, las cuales no constituyen el medio normal de reproducción del vegetal ya que ésta se reproduce por medio de un estolón (Soares, 2014). Además, pertenecen al grupo de las frutas no climatéricas, aquellas cuya maduración no presenta variaciones sustanciales en la tasa de respiración o en la síntesis de etileno (White, 2002).

## 1.2. Generalidades sobre el cultivo y mercado de frutillas

En el año 2017 hubo una producción mundial de aproximadamente 8.000.000 de toneladas de frutillas, representando un crecimiento sustancial con respecto a la producción en 2013 (4.320.690 toneladas). China es el país de mayor participación en la producción de frutillas, con un 40,3%, seguido por los Estados Unidos con 15,7%. Argentina ocupa el 34° lugar en la producción mundial de frutillas (COMTRADE, 2014). En cuanto a las exportaciones, España fue el de mayor aporte mundial con 313.256 toneladas en 2016 (FAOSTAT, 2017).

La situación de la frutilla a nivel internacional indica que la demanda en el mundo va en aumento, no sólo por sus atributos sensoriales, sino también por los beneficios que aporta a la salud (Pefaur, 2014).

En Argentina, se cultivan aproximadamente 1.300 a 1500 hectáreas de frutillas, con una producción aproximada de 45 a 52 mil toneladas anuales y la particularidad de disponer de este *berry* (frutilla) durante todo el año, debido a la diversidad de climas que el país posee. Distribuidos en Coronda (provincia de Santa Fe), Lules (provincia de Tucumán), área metropolitana de Buenos Aires (AMBA), Mar del Plata (provincia de Buenos Aires), Perico (provincia de Jujuy), Bella Vista (provincia de Corrientes) y las provincias patagónicas (en los valles con riego y cordones periurbanos de las principales ciudades) (Kirschbaum et al., 2017). Las provincias de Santa Fe, Tucumán y Buenos Aires representan alrededor del 70% de la producción total del país (Brenna, 2019). De las cuales 343 hectáreas se encuentran en la zona norte, en la provincia de Tucumán en su mayoría. En la Tabla 1.1 se presenta el calendario de producción de frutilla en Argentina.

En la provincia de Santa Fe, el cultivo de frutilla se realiza en la zona de Coronda y en la zona de La Costa, donde se ubican además numerosas agroindustrias dedicadas al procesamiento de la fruta, elaborándose pulpas, congelados, mermeladas y dulces. Los orígenes del cultivo de frutilla en la zona de Coronda datan de 1921, representando una participación porcentual respecto a la superficie nacional de 35% en los últimos años, pero que en años anteriores ha presentado valores mayores: 80% en 1997 y 83% en 1971 (Scaglia y Taborda, 2003). Se mencionan datos generales del cultivo en esta región: rendimiento promedio durante los años 1960-70: 2.000 kg. ha<sup>-1</sup> (60.000 plantas/ha con una producción de 35 g/planta); a partir de 1970 hubo un aumento en la productividad, a partir de distintas tecnologías incorporadas al cultivo. Esto ha permitido incrementos sustanciales llegando a rendimientos máximos de 65.000 kg/ha, bajo condiciones favorables en los últimos años (Pagani, 2011).

Entre las tecnologías incorporadas en el cultivo, que en forma sinérgica han generado impactos positivos en los rendimientos, se destacan: sistemas de protección contra heladas y lluvias (macro y microtúneles), desinfección de suelo, ajustes técnicos en el riego

localizado y fertilización, variedades de alta productividad, mejoramiento de la calidad del plantín, nuevas épocas de plantación y diferentes formas de producir plantines (Sordo et al., 2017).

En cuanto a las variedades, la estrategia son los sistemas multivarietales, con el objetivo de tener cantidad y calidad a lo largo de toda la campaña, priorizando la fruta de primicia. Se están usando las variedades tempranas '*Festival*', '*Splendory*', '*San Andreas*'; intermedias '*Sabrina*', '*Sahara*' y '*Benicia*'; y tardías '*Camino Real*' y '*Merced*'. Además, en menor medida, se cultivan '*Mohave*', '*Monterey*', '*Earlibrite*', '*Fortunay*' y '*Cristal*' (Kirschbaum et al., 2017).

**Tabla 1.1.** Calendario productivo de frutillas en Argentina.

Producción	Provincia / Región	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Invierno	Salta Jujuy												
	Tucumán (Pedemonte)												
	Corrientes												
	Santa Fe												
Intermedia	Buenos Aires (Norte)												
Verano	Mar del Plata												
	Mendoza												
	Patagonia												
	Tucumán (Tafí del Valle)												

Fuente: INTA EEA Famallá

La cadena productiva de la frutilla se puede dividir en tres etapas, la primera que corresponde a la siembra y cosecha, la segunda es el procesamiento industrial y la tercera que engloba la comercialización. Por un lado, la frutilla fresca es pre-enfriada, seleccionada, embalada y mantenida en frío hasta su comercialización en fresco. Otra parte es congelada en forma de bloque o a través del sistema IQF (previamente es pre-enfriada, despalillada, lavada y seleccionada) (Viteri y Ben, 2013).

La frutilla congelada en bloque o IQF es vendida a la industria alimentaria nacional o extranjera (a través de intermediarios mayoristas). Alrededor del 60% de la producción de frutillas de Coronda y el 30% de Tucumán se comercializa en estado fresco, distribuyéndose entre los diferentes mercados concentradores regionales y el Mercado Central de Buenos Aires. La fruta puede enviarse al mercado en cajas de plástico o madera de 5 Kg o embaladas en cajas de 2 Kg con 8 cubetas en cada caja (Viteri y Ben, 2013).

La calidad de la frutilla está controlada por factores genéticos y/o ambientales que producen en consecuencia variedades de tamaño, rigidez de la pulpa, forma de la fruta,



sólidos solubles totales (SST), relación SST/acidez total y cantidad de azúcar (glucosa, fructosa, sacarosa) (Hancock et al., 2008; Kirschbaum y Hancock, 2000; Satish Kuchi y Sai Ratna Sharavani, 2019). Otro criterio fundamental de calidad de la frutilla es su color, siendo las antocianinas, compuestos fenólicos del tipo flavonoides, las responsables de este. Los derivados de las antocianinas, pelargonidina y cianidina se encuentran en las frutillas en concentraciones reportadas de hasta 65 mg/100 g de fruta fresca (Crecente Campo et al., 2012).

### **1.3. Subproductos del procesamiento agroindustrial de frutillas**

La agroindustria es una actividad económica que combina el proceso productivo agrícola con el industrial, para generar alimentos o materias primas semielaboradas destinadas al mercado (Saval, 2012). En consecuencia, la agroindustria fomenta el desarrollo económico, social y ambiental, siempre y cuando se mantenga el equilibrio entre la actividad desarrollada y la protección del ambiente en cada una de las etapas del proceso, desde la manipulación de la materia prima hasta la distribución y disposición final de los subproductos o residuos generados (Vargas et al., 2013). No obstante, como resultado adicional a las actividades principales de las empresas que conforman este sector se generan subproductos o residuos agroindustriales, los cuales representan cantidades significativas y son considerados un problema ambiental (Restrepo et al., 2011). Cuando estos residuos no son debidamente dispuestos y/o no presentan un manejo adecuado, provocan alteraciones adversas en el ambiente que son perjudiciales y afectan negativamente el desarrollo de los seres vivos. Por ende, en los últimos tiempos los residuos de la agroindustria de frutas son utilizados con frecuencia para la generación de productos de valor agregado, lo que permite mitigar problemas ambientales como propagación de plagas, malos olores, contaminación de suelos y de cuerpos de agua, entre otros (Serna Cock y Torres León, 2015). Con lo anterior, los subproductos aprovechados correctamente, podrían recuperar las condiciones del ambiente alteradas por las diversas actividades humanas, mejorando la calidad de este y evitando afectaciones para la salud (Gómez-Merino et al., 2016; Radenkovs et al., 2018).

Dentro de la diversidad de los residuos agroindustriales que se generan a diario se sabe que los más utilizados para su aprovechamiento posterior son los residuos provenientes de las frutas, tales como los desechos cítricos (bagazo y cáscara) y la cáscara del plátano, entre otros (Sánchez et al., 2010). Además, se destacan el bagazo de agave en la producción de tequila (Ramírez-Cortina et al., 2012); la cachaza, el bagazo, la carbonilla, la paja y el cogollo, todos estos últimos residuos de la agroindustria de la caña de azúcar y de las calderas de los ingenios azucareros (Montenegro et al., 2014; Palma et al., 2016),

la cascarilla de arroz, el zuro de maíz (García y Vergara, 2017; Sánchez et al., 2010), la zoca de café (Aristizábal Marulanda, 2015), entre otros.

La mayoría de estos subproductos son de naturaleza lignocelulósica, posibilitando la extracción de polímeros como la celulosa y la lignina para ser utilizados como materia prima en diferentes procesos. De acuerdo con Vargas et al., (2013), esta biomasa representa un potencial energético importante para la producción de biogás y biocombustibles (Mejías-Brizuela et al., 2016). Por otro lado, Navia-Cuetia et al. (2013) trabajaron en la elaboración de compostaje con residuos de tomate; al igual que se investigó en el aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción de alimentos funcionales a través de la nutrición animal (Tamayo et al., 2011). Otro uso que tiene muy buenas perspectivas es el de obtención de ingredientes funcionales. Ricce et al., (2013) mostraron el efecto de la sustitución parcial de harina de trigo por polvos de peladilla de espárrago, brácteas de alcachofa y salvado de trigo sobre las características sensoriales del pan integral. Dentro de la caracterización de estos subproductos se han evidenciado también una cantidad considerable de compuestos bioactivos, ampliando el rango de aplicaciones de estos tejidos como materias primas. Quirós, (2016) optimizó la extracción de compuestos fenólicos a partir del residuo del proceso de mora y Dorta et al. (2014) caracterizaron los residuos del mango.

Para el caso de la frutilla, se producen residuos que son evitables y otros que no lo son. Dentro de los evitables, se contemplan las pérdidas de fruta por malos manejos durante el cultivo, cosecha, postcosecha y comercialización, que dependiendo de la región, estos pueden llegar hasta un 20% (FAO, 2019). En cuanto a los residuos inevitables tenemos principalmente la parte no comestible del fruto (el sépalo y parte del pedúnculo) que puede llegar a representar un 5% del fruto. (De Laurentiis et al., 2018) . En el caso específico de la agroindustria argentina, el INTA reporta que para el procesamiento de frutilla para la industria ya sea de pulpas, congelados u otra, previamente se debe realizar un despallado el cual se hace de forma manual (Figuras 1.2 y 1.3), y que, dependiendo del factor humano y la época del año, se llega a obtener entre 7% al inicio del periodo de cosecha hasta un 20% de subproductos inevitables al final de la temporada de cosecha.



**Figura 1.2.** Proceso de Despalillado manual.



**Figura 1.3.** Despalillador de Acero inoxidable.

#### **1.4. Compuestos Fenólicos**

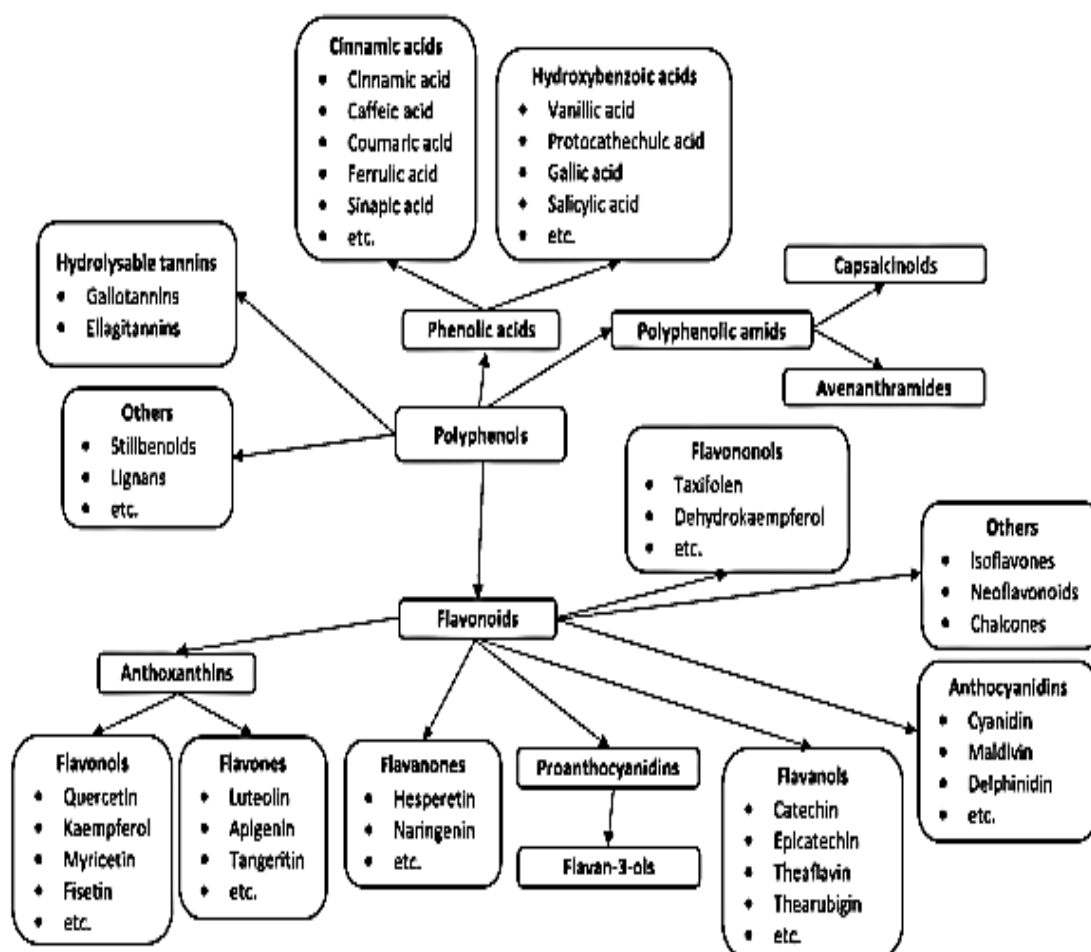
Los compuestos bioactivos más abundantes en la dieta del hombre son los compuestos fenólicos, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Dimitrios, 2006). Estas sustancias son sintetizadas durante el desarrollo normal de la planta, así como en respuesta a diferentes situaciones, como el estrés hídrico, los rayos UV, entre otros (Cisneros-Zevallos, 2003; Fernando Reyes et al., 2007), con diferentes funciones que van desde la defensa hasta la regulación del crecimiento y el color de la planta. (Bunte et al., 2019).

Una definición químicamente estricta, es que los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático que lleva uno o más sustituyentes hidroxilo, abarcando también sus derivados funcionales. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, abarcan aproximadamente 8.000 sustancias, divididas en 22 grupos. Muchos de estos compuestos presentes en los alimentos son solubles en agua o en disolventes orgánicos; la mayoría de

las plantas, si no todas, contienen polifenoles que las diferencian entre sí (Perez-Gregorio y Simal-Gandara, 2017; Quideau et al., 2011).

Dichos metabolitos muestran una amplia variedad de actividades biológicas: antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antiviral, antiproliferativa, antimutagénica, anticarcinogénica, acciones vasodilatadoras, y prevención de enfermedades coronarias y desordenes neurodegenerativos (Cartaya y Reynaldo, 2001; Colizzi, 2019; El Gharras, 2009; Huang et al., 2010; Ijaz et al., 2018).

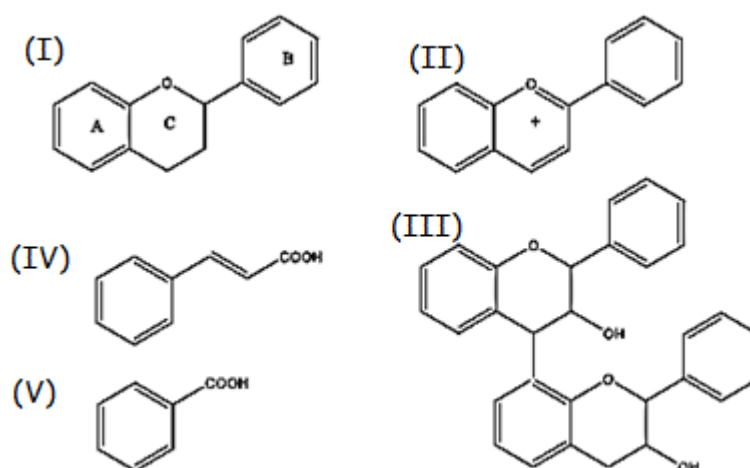
Algunos autores han clasificado los compuestos fenólicos en cinco grupos principales: taninos hidrolizables, ácidos fenólicos, amidas polifenólicas, flavonoides y otros, con sus subgrupos correspondientes basado en la composición química (Figura 1.4) (Haminiuk et al., 2012; Rong, 2010).



**Figura 1.4.** Clasificación de los polifenoles y compuestos representativos (Stoyan y Högger, 2019)

Los flavonoides, son el grupo más abundante de polifenoles, se dividen en siete subgrupos; comparten una estructura común, que consta de dos anillos aromáticos (A y B) y tres átomos de carbono que se unen entre los anillos A y B, creando un heterociclo oxigenado

denominado anillo C (Figura 1.5) (Markham, 2006). Cuando están vinculados a una o más moléculas de azúcar son conocidos como flavonoides glucósidos, y cuando no están conectados a una molécula de azúcar se llaman agliconas (Williamson, 2003). El grado de glicosilación directamente afecta la capacidad antioxidante de los flavonoides. Generalmente, las formas agliconas de miricetina y quercetina son más activas que las formas de glucósido (Cartaya y Reynaldo, 2001).



**Figura 1.5.** Características estructurales químicas típicas de los flavonoides (I), antocianidinas (II), proantocianidinas (III), ácido cinámico (IV) y ácido benzoico (V).

El segundo grupo más importante de estos fitoquímicos comprende a los ácidos fenólicos, que representan casi un tercio de los compuestos fenólicos restantes, y los cuales están presentes en las frutas en forma unida. Este grupo se divide en dos subgrupos: derivados de los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico. En contraste con otros compuestos fenólicos, estos presentan un carácter ácido debido a la presencia de un grupo carboxílico en la molécula (Rana y Gulliya, 2019). Los compuestos de ácido hidroxicinámico están presentes principalmente como derivados, teniendo un esqueleto C6- C3. Los ácidos: ferúlico, *p*-cumárico y cafeico son algunos ejemplos de esta clase. Los ácidos hidroxibenzoicos (C6-C1) se encuentran en varias frutas y en su mayoría como ésteres. Los ácidos fenólicos más comunes encontrados en frutas en esta categoría son los ácidos galico, vanílico, elágico y sirínigico (Haminiuk et al., 2012).

Por otro lado, se encuentran los taninos, estos polifenoles que se encuentran en las frutas y en su mayoría están presentes como polímeros fenólicos. Los dos tipos principales de taninos son los condensados y los hidrolizables (El Gharras, 2009). Los taninos hidrolizables son ésteres del ácido gálico o elágico a un núcleo poliol como glucosa (Ignat

et al., 2011). Por su parte, los taninos condensados o proantocianidinas son un grupo de oligómeros y polímeros con enlaces carbono-carbono o carbono-oxígeno entre subunidades de flavanoles como catequina y/o epicatequina (Schofield et al., 2001). Los taninos son sustancias astringentes y amargas de diferentes pesos moleculares, y algunos de ellos, especialmente los taninos hidrolizables, son solubles en agua.

Los estilbenos son un grupo de compuestos derivados de los fenilpropanoides caracterizados por un esqueleto 1,2-difeniletieno ( $C_6-C_2-C_6$ ) (Goyal et al., 2012). Son producidos por una gran variedad de plantas que incluyen uvas, pinos y leguminosas a través de una secuencia metabólica que es inducida en respuesta a factores de estrés bióticos o abióticos (Quideau et al., 2011),

En la naturaleza podemos encontrar varios polifenoles cuyos grupos funcionales contienen nitrógeno, a los cuales se les conoce como amidas polifenólicas (Rong, 2010). Las mismas están presentes en matrices como los chiles picantes, siendo los capsaicinoides los responsables de generar la sensación de picor al consumidor, además de presentar una considerable actividad antioxidante (Davis, et al., 2007). Otra fuente importante de este tipo de compuestos fenólicos es la avena con las avenantramidas, a las cuales Bratt et al. (2003) les reportaron la capacidad para inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Por último los lignanos, comprenden una gran variedad de estructuras individuales que en su mayoría consisten en dos restos fenilpropanoides conectados a través de sus carbonos 8 de cadena lateral (Davin y Lewis, 2003). Los lignanos son metabolizados a enterodiol y enterolactona por la microflora intestinal. (Heinonen et al., 2001). Thompson et al. (1991) confirmaron que las semillas oleaginosas (semillas de lino) son la fuente más rica de lignanos, y las algas, las leguminosas (lentejas), cereales (trigo), verduras (ajo, espárragos, zanahorias) y frutas (peras, ciruelas pasas) son consideradas como fuentes menores.

#### **1.4.1. Compuestos fenólicos presentes en la frutilla**

La planta de frutilla (*Fragaria*) incluye más de 20 especies y una gran cantidad de cultivares diferentes que podrían tener diferentes compuestos bioactivos (Gunduz y Özdemir, 2014). Este fruto contiene muchos componentes importantes de la dieta que incluyen vitaminas, minerales, folato y fibra, y son una fuente rica de compuestos fitoquímicos, en su mayoría representados por los compuestos fenólicos. (Gündüz, 2015).

El contenido de compuestos fenólicos en frutillas de diferentes variedades ha sido objeto de numerosos estudios (Aaby et al., 2007, 2012; Buendía et al., 2010; Van de Velde, et al., 2019a). Los flavonoides (principalmente antocianinas y flavonoles y flavanoles en menor proporción), seguidos por los taninos hidrolizables (elagitaninos y galotaninos) y los taninos

condensados (mezcla de oligómeros y polímeros de flavanoles), representan los compuestos fenólicos más importantes en frutilla. Por otra parte, los ácidos fenólicos (derivados de los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico), son los constituyentes menores (Tabla 1.2).

Los compuestos fenólicos, incluidas las antocianinas, presentan una fuerte actividad antioxidante, y se ha demostrado en muchos estudios que contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante total. Específicamente, las frutas ricas en fenoles conteniendo un pigmento de antocianina son a menudo las que contienen capacidades antioxidantes más altas. Además, se han establecido fuertes correlaciones entre fenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante (Gündüz, 2015). Para el caso de las frutillas de Argentina, Van De Velde et al. (2013) compararon los compuestos bioactivos de 2 cultivares de frutilla ('*Camarosa*' y '*Selva*') determinando que el cultivar '*Camarosa*' presentó el contenido más alto de antocianinas, y '*Selva*' mostró un mayor contenido de ácido elágico total.

**Tabla 1.2.** Composición de compuestos fenólicos en frutilla (Giampieri et al., 2012).

Clase	Grupo	Compuesto
-------	-------	-----------

Flavonoides	Antocianinas	Cianidina-3-glucosido
		Cianidina-3-rutinosido
		Cianidina-3-malonilglucosido
		Cianidina-3-malonylglucosido-5-glucosido
		pelargonidin-3- galactosido
		pelargonidin-3- glucósido
		pelargonidin-3-rutinosido
		pelargonidin-3-arabinosido
		pelargonidin-3,5-diglucosido
		pelargonidin-3-malonilglucosido
		pelargonidn-3-acetilglucosido
	Flavonoles	Quercetina-3-glucuronido
		Quercetina-3-malonilglucosido
		Quercetina-rutinosido
		Quercetina-glucósido
		Quercetina-glucuronido
		Kampferol-3-glucosido
		Kampferol-3-malonilglucosido
		Kampferol-coumaroil-glucosido
Flavanoles	Kampferol-glucuronido	
	Proantocianidina B1 (EC-4,8-C)	
	Proantocianidina trímero (EC-4,8-EC-4,8-C)	
	Proantocianidina B3 (C-4,8-c)	
	(b)-Catechin	
Ácido fenólicos	Ácidos hidroxicinámico	p-Coumaroil hexosa
Taninos hidrolizables	Elagitaninos	Elagitaninos
		Bis-HHDP-glucosa
		Galoil-HHDP-glucosa
		Dimero de galoil-bis-HHDP
		Sanguin H-6
		Methyl-EA-pentosa conjugada
		Ácido elágico pentosido
		Ácido elágico

#### 1.4.2. Compuestos fenólicos presentes en la parte no comestible de la frutilla

En general, los compuestos fenólicos de los residuos de frutillas son similares a los de la fruta (Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann, 2010; Zhu et al., 2015). A partir del conocimiento de la presencia de dichos compuestos bioactivos es fundamental conocer la relación entre la composición de compuestos fenólicos de estos residuos (hojas, pedúnculos, tallos, restos de fruta, etc.) y sus propiedades beneficiosas para la salud, de manera que estos subproductos puedan ser considerados como una fuente alternativa de compuestos bioactivos (Ferlemi y Lamari, 2016).



Se ha reportado que las distintas partes de la planta de frutilla poseen una alta concentración de compuestos fenólicos. Zhu et al. (2015) determinaron que el extracto etanólico del sépalo de la frutilla mostró el mayor contenido fenólico total (185,5 mg/g de extracto), seguido de los extractos etanólicos de la flor y raíz de la planta de frutilla (180-179 mg/g de extracto), respectivamente. El compuesto que predomina en el perfil fenólico es el ácido elágico, seguido de quercetin-3-*O*-glucosido. Estos resultados fueron similares a los de Wang y HsinShan (2000), quienes reportaron que las hojas de frutilla contienen muchos compuestos bioactivos que incluyen taninos, flavonoides, ácido ascórbico y aceites esenciales. Por lo tanto, optimizar el método de extracción de los compuestos fenólicos se vuelve esencial para aumentar su recuperación, tratando de preservar sus estructuras químicas nativas y su bioactividad (Zhang et al., 2015).

Por su parte, Oszmiański et al. (2011), determinaron el perfil fenólico de las hojas de frutillas variedad 'Zielona' (Polonia), siendo el compuesto predominante quercetina-3-*O*-rutinosido, representando un 50% del extracto fenólico total, seguido por los taninos hidrolizables; indicando así que según la especie se tendrán distintos compuestos fenólicos en dichas matrices vegetales. Además, Buřičová et al. (2011) detectaron (+) catequina como el compuesto fenólico dominante presente en los extractos de hojas de frutilla, estando este compuesto en cantidades muy pequeñas en los extractos de hojas de mora y frambuesa.

Asimismo, Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann (2010) estudiaron el contenido de compuestos fenólicos de hojas de frutilla blanca nativa de Chile (*Fragaria chiloensis* spp.), presentando los extractos valores de 1,99 g/ 100 g de peso seco. Este contenido fenólico se encuentra en el rango de los valores reportados para *Fragaria ananassa* Duch. cultivares 'Elsanta' (1.95 g/100 g de peso seco), 'Senga' (2.07 g/ 100 g de peso seco) y 'Dukar' (1,95 g/100 g de peso seco) obtenidos por Skupień y Oszmiański. (2004).

Todos estos antecedentes sugieren que la extracción eficiente de compuestos fenólicos bioactivos a partir de subproductos del cultivo de frutilla puede suponer una oportunidad promisoriosa para obtener compuestos bioactivos con alto valor agregado reduciendo el impacto medioambiental.

### **1.5. Especies reactivas al oxígeno (ROS) y capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos**

Las especies reactivas al oxígeno (ROS) son formas parcialmente reducidas del oxígeno (Sies, 1991). Es inevitable su formación ya que provienen de un proceso normal que ocurre

en organismos que poseen un metabolismo energético basado en reacciones de oxidación-reducción (Greene, 2002). Sin embargo, son especies muy reactivas que pueden alterar diversos componentes celulares. De forma general, pueden causar:

(1) La inhibición de enzimas que son propensas a reaccionar con estas especies. Cuando reaccionan con las proteínas pueden modificar ciertos aminoácidos y romper las cadenas polipeptídicas, además de poder modificar los lugares de señalización para la proteólisis.

(2) La acción sobre los pigmentos tales como la clorofila en donde genera su degradación.

(3) La peroxidación de lípidos: los radicales libres y también el  $H_2O_2$  reaccionan con los ácidos grasos insaturados, obteniendo hidroperóxidos de lípidos. Si se tiene presencia de iones metálicos, conduce a la producción de radicales alcoxil y peroxil que actúan en una reacción en cadena, donde se propaga por todas las membranas celulares, de esta forma se altera críticamente la estructura y funcionalidad de las células.

(4) Fragmentación del ADN producida por la reacción de los radicales hidroxilos con las bases nitrogenadas, que es un efecto de las ROS muy difícil de reparar (Greene, 2002; Jacobo-Velázquez et al., 2011).

Los antioxidantes son compuestos que tienen la propiedad de neutralizar a los radicales libres reactivos como el anión superóxido ( $-O_2$ ), el hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los cuales pueden atacar a las biomoléculas de los sistemas biológicos y llevar al desarrollo de enfermedades producto del estrés oxidativo (Chu et al., 2002). De esta forma los antioxidantes son capaces de retrasar o impedir la oxidación de lípidos, ácidos nucleicos mediante la inhibición de la iniciación o propagación de cadenas de reacciones oxidativas (Wang et al., 2016). Un inadecuado equilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes en el organismo, provoca la aparición del estrés oxidativo. Este es generado por el desbalance de especies reactivas al oxígeno (ROS) y la capacidad de un sistema biológico de reparar el daño provocado a los componentes de las células. En términos generales los antioxidantes facilitan el uso fisiológico del oxígeno por las mitocondrias de las células, lo cual ayuda a disminuir el estrés oxidativo y por consiguiente ayuda en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles (Zamora., 2007).

Los antioxidantes proporcionan un papel importante en la Sistema de defensa corporal contra especies reactivas de oxígeno (ROS) (Noipa et al., 2011). Se los puede clasificar según su mecanismo de acción, en primarios o secundarios. Los primarios deshacen las cadenas de reacciones oxidativas al bloquear la iniciación o propagación del radical libre. Por otro lado, los secundarios previenen la oxidación al retardar la reacción donde se forman los radicales libres.

Los antioxidantes se pueden encontrar de manera sintética o natural (Apak et al., 2011). Los sintéticos tales como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y el tert-butil hidroquinona (TBHQ) son los más empleados en la industria (Hou, 2003). No obstante estos compuestos tienen la desventaja de ser muy volátiles y según algunos autores se sospecha que son perjudiciales para la salud debido a que pueden causar inflamación del hígado, influir en las actividades de las enzimas hepáticas y provocar carcinogenicidad (Hou, 2003; Huang et al., 2010). En los últimos años se busca cada vez más las fuentes naturales de antioxidantes, en donde numerosos estudios revelan que los compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas y taninos, ya sea de forma independiente o en conjunto presentan una actividad importante como antioxidantes (Haminiuk et al., 2012; Rodríguez-Arzuaga y Piagentini, 2018).

Las propiedades antioxidantes de varios cultivares de frutillas rojas son bien conocidas y fueron descritos por Asami et al. (2003) y Skupień y Oszmiański (2004). Además, Tulipani et al. (2008), utilizando nueve genotipos de frutilla con la intención de determinar el efecto de los genotipos sobre la capacidad antioxidante, reportaron que la estructura genética juega un papel importante en la capacidad antioxidante de la frutilla.

Asimismo, Simirgiotis et al., (2009) compararon la actividad antioxidante entre el cultivar de frutilla roja var. 'Chandler' y la frutilla nativa blanca que crece en un mismo lugar de Chile, presentando la frutilla blanca menor capacidad antioxidante. En el caso de las distintas partes de la frutilla, Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann (2010) indicaron que el extracto de frutilla blanca mostró el mayor efecto captador de aniones superóxido a 50 mg/mL (79,3%), valor similar al encontrado para las hojas (67,60%), mientras que fue menor para el extracto de rizoma (55%). Los pigmentos como las antocianinas no contribuyen mucho a la actividad antioxidante de la frutilla blanca debido a su bajo contenido (43,6 mg/100 g base seca), en comparación con el contenido de antocianinas hallado en frutillas rojas comerciales ( $\approx$  400 mg/100 g base seca) (Silva et al., 2007).

### **1.6. Efectos de los compuestos fenólicos de frutilla en la salud**

Diversos efectos beneficiosos en la salud humana se han atribuido al consumo de frutillas. Estos beneficios se han atribuido principalmente a los compuestos fenólicos que se encuentran en grandes cantidades en estas frutas (Hannum, 2004).

Los flavonoides y el ácido ascórbico son compuestos antioxidantes que han demostrado neutralizar los efectos nocivos que se asocian con las especies reactivas al oxígeno (ROS) (Mandave et al., 2013).

También se demostró que la administración de extractos de frutilla en voluntarios sanos o en pacientes con hiperlipidemia produce una menor respuesta a la glucosa postprandial versus comida de control (Basu et al., 2014). El aumento de los niveles de glucosa postprandial está vinculado a la absorción de carbohidratos dietéticos como la maltosa y sacarosa, que se hidrolizan aún más a glucosa por la  $\alpha$ -glucosidasa intestinal antes de entrar en la circulación sanguínea. Por este motivo, la hiperglucemia postprandial puede tratarse con inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa por retraso de la absorción de glucosa, siendo los compuestos bioactivos de frutilla potenciales agentes inhibidores de la actividad de esta enzima (Feng et al., 2011). Por otra parte, se han realizado estudios en animales para evaluar la asociación entre alimentos ricos en compuestos fenólicos y acumulación amiloide y reducción del estrés oxidativo en pacientes con Alzheimer (Hu et al., 2013).

Las hojas de frutilla se utilizan en medicina tradicional como infusión para tratar la hipercolesterolemia, bajar la presión arterial y tratar una serie de otras condiciones tales como trastornos gastrointestinales y estenosis. Hay una larga lista de otros efectos reportados en la medicina popular: como diurético, fortalecer la vista y la dentición, expulsar los cálculos renales y parásitos intestinales, para tratar la anemia y la hepatitis, para fortalecer el sistema nervioso e inmunológico, para la actividad hepática, para suprimir la diarrea, para tratar la artritis y para acelerar el metabolismo (Duru, 2012). La frutilla también tiene actividades anticancerígenas (Wedge et al., 2001) y efectos antitrombóticos (Naemura et al., 2005). Por otro lado, Ibrahim y Abd El-Maksoud (2015) reportaron que el extracto de hojas de frutillas presentaba actividades antidiabética, antioxidante, antiinflamatoria y anti-apoptosis en la nefropatía diabética, mediante el uso de biomarcadores en ratas. Mudnic et al. (2009) confirmaron el efecto vasodilatador de los extractos de hoja de frutilla silvestre, viendo un potencial en el tratamiento de afecciones cardiovasculares.

### **1.7. Actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos**

Con el fin de brindar al consumidor alimentos seguros y de calidad, la industria alimentaria emplea distintos mecanismos físicos, químicos y biológicos con el fin de garantizar lo anterior. No obstante, el uso de compuestos químicos para garantizar y conservar la inocuidad de un alimento es la forma más común frente a los riesgos de contaminación biológica. Sin embargo, esto se opone a la tendencia actual de consumo hacia alimentos

más sanos y parecidos a lo natural. Por lo cual, los conservantes químicos presentan rechazo, además de que varios de estos se han vinculado con intoxicaciones y enfermedades degenerativas, como lo son los benzoatos, nitritos y nitratos, anhídrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>), y otros más (Rodríguez Saucedo, 2011). Por ello desde hace varios años se vienen buscando alternativas que satisfagan dicha necesidad sin tener algún tipo de efecto secundario.

Adicional a lo anterior, la resistencia bacteriana a los métodos de control también representa uno de los grandes retos de salud (Caniça et al., 2019). Dicha condición se conoce como la facultad de microorganismos a resistir un compuesto que inhibe su crecimiento (bacteriostático) o genera la muerte celular (bactericida), variando para cada tipo de bacteria y el medio donde se encuentre ya que situaciones adversas favorecen la generación de mecanismos de defensa por parte de las mismas (Verraes et al., 2013). En su gran mayoría, los antimicrobianos empleados en la industria únicamente presentan actividad bacteriostática o fungistática, en lugar de bactericidas o fungicidas, por ello, su aplicación sobre los alimentos es limitada, ya que algunos microorganismos no llegan a verse inhibidos o destruidos por las dosis convencionales de estos compuestos utilizados individualmente, optando por aplicar una combinación de ellos, que de esta forma mejora el espectro de cobertura en la conservación (Rodríguez Saucedo, 2011).

No obstante, el uso indebido de antibióticos y sustancias preservantes en el proceso y consumo diario favorece los mecanismos de resistencia que dificultan el control, sobre todo cuando se trata de bacterias patógenas (Macgowan y Macnaughton, 2017), pues este tipo de microorganismos tienen un alto impacto sobre la salud pública debido a sus altas tasas de mortalidad específicamente en las poblaciones vulnerables y países en desarrollo (Lima et al., 2019).

Los compuestos fenólicos además de sus ya mencionados beneficios para la salud cuentan con propiedades antimicrobianas que se han venido estudiando en extractos de distintas matrices vegetales y de manera individual para cada tipo de fenol, viendo un potencial para el control de patógenos resistentes y sus problemáticas (Camelo et al., 2013; Leyva-Jimenez et al., 2019; Salaheen et al., 2017). Esta actividad, se le atribuye a la presencia de los grupos hidroxilos en las moléculas de los compuestos fenólicos y su posición, la variación de dicho patrón de hidroxilación permitirá variar la inhibición en distintos tipos de bacterias (Oh y Jeon, 2015; Sanhueza et al., 2017).

c probaron la actividad antimicrobiana de un extracto de cascara de granada en metanol, en donde la punicalagina fue el compuesto fenólico mayoritario (16,17 mg/mL). Dicho extracto obtuvo una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 20 mg/mL y una

concentración bactericida mínima (CBM) de 30 mg/mL para *Listeria*, y 60 mg/mL para *Salmonella spp*, *E. coli* y *S. aureus*.

El orujo de arándanos y zarcas fue usado por Salaheen et al. (2014) para extraer fenoles con etanol, con el fin de estudiar la efectividad en la inhibición de *Campylobacter jejuni*. Los autores encontraron mayor potencia antimicrobiana en el orujo de arándano con una CBM de 0,5 mg/mL, mientras que el extracto de zarcas presentó una CBM de 0,8 mg/ mL, ambos con una apreciable efectividad.

El extracto fenólico del residuo del procesamiento de 10 variedades de tomate mostró una buena actividad inhibitoria para bacterias gram positivas, y la variedad con mayor composición en flavonoles presentó la mejor inactivación de *S. aureus*, *B subtilis*, y *L. monocytogenes* con una MIC de 0,625, 1,25 y 2,5 mg/mL respectivamente (Szabo et al., 2019).

Por su parte, Deng et al., (2014) estudiaron la extracción de compuestos fenólicos a partir de las hojas de arándano viendo una alta inhibición para *E. coli*, y no tanto para *L. monocytogenes*.

Por todo lo expuesto, dependiendo del perfil de compuestos fenólicos se tendrán distintas actividades antimicrobianas con un gran potencial para emplear en la industria alimentaria.

### **1.8. La polifenoloxidasas (PPO) y la calidad de las frutas y hortalizas frescas**

El color en los alimentos es un atributo de calidad para el consumidor. Se conoce que cinco causas pueden ser las responsables del cambio de color en frutas y vegetales frescos y procesados: pardeamiento u oxidación enzimática de polifenoles, reacciones de Maillard, oxidación de ácido ascórbico, caramelización y formación de polímeros oscuros por la acción oxidativa de lípidos (He y Luo, 2007; Yang et al., 2000).

El pardeamiento enzimático, es causado por la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos por acción de la enzima polifenoloxidasas (PPO), cuyo nombre corresponde a la *o*-difenoil-oxígeno-óxido-reductasa la cual tiene al ion  $\text{Cu}^{+2}$  como cofactor. Esta enzima es capaz de catalizar dos reacciones distintas: la hidroxilación de los monofenoles a los *o*-difenoles (actúa como la cresolasa) (E.C. 1.14.18.1.) y la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actúa como catecolasa) (C.E. 1.10.3.2.). Estas últimas se pueden polimerizar, formando pigmentos marrones o negros (Oliveira y Orlanda, 2017; Terefe et al., 2010). En presencia del oxígeno, la enzima oxida rápidamente los *o*-difenoles a *o*-quinonas, las cuales se condensan luego con otras sustancias tales como, aminoácidos, proteínas entre otros, obteniendo pigmentos marrones insolubles y oscuros reconocidos como melaninas (Morante Carriel et al., 2014). Este fenómeno también está involucrado con la pérdida en

el valor nutricional debido a la oxidación del ácido ascórbico presente naturalmente, ya que puede actuar como antioxidante (Pizzocaro et al., 2007).

Distintas situaciones pueden desencadenar este pardeamiento: daños fisiológicos durante la maduración, condiciones inadecuadas de almacenamiento y/o procesos tecnológicos que generen heridas o rompimientos de la superficie. La tendencia de los tejidos vegetales a pardearse varía con el estado de maduración de las frutas y vegetales, su estado fisiológico, la variedad y los tratamientos a las que son sometidos (Gil et al., 2012).

### **1.8.1. Compuestos fenólicos como sustratos de las enzimas PPO**

Los compuestos fenólicos derivan de un importante número de precursores como el acetato, piruvato, fosfoenolpiruvato, algunos aminoácidos, el acetil-coA y el malonil -coA, razón por la cual presentan gran diversidad estructural (Rong, 2010). Estos compuestos se acumulan cerca de un 97% en la vacuola de la célula y en pequeñas cantidades en los cromoplastos, citoplasma y la mitocondria celular. Sin embargo, cuando se genera una disrupción de la vacuola estos metabolitos quedan expuestos a las reacciones de formación de quinonas por la PPO (Cantos-Villar et al., 2002; Toivonen y Brummell, 2008). Las quinonas resultantes de la oxidación enzimática tienen diferentes características espectrales que dependen del fenol a partir del cual ellas se originan y el pH del medio (Robards et al., 1999). La oxidación de quinonas con otra molécula de fenol puede ser muy rápida, y depende del potencial de reducción respectiva del complejo enzima-sustrato formado (Garzón et al., 2012).

### **1.8.2. Control del pardeamiento**

El control de pardeamiento es sin duda un gran reto en la industria de frutas y vegetales. Se han reportado previamente métodos biológicos-moleculares desarrollados para el control del pardeamiento. Estas formas de control pueden dividirse en tres clases dependiendo del factor que ataquen, ya sea la enzima, el sustrato o los productos de la reacción (He y Luo, 2007). Por otra parte, el oxígeno es necesario para que estas reacciones ocurran, y por lo tanto si su eliminación es posible se pueden evitar o dominar las reacciones de pardeamiento enzimático; no obstante, no en todos los casos resulta una opción factible para retrasar el pardeamiento. La inactivación de la PPO es una operación muy usada para controlar el pardeamiento. Puede lograrse por medios físicos como son los tratamientos térmicos y de alta presión, o con la adición de agentes químicos anti-pardeamiento (Queiroz et al., 2008). Sin embargo, en varios estudios se dilucidó la resistencia térmica de la enzima en el caso de la frutilla (Terefe et al., 2010).

La acidificación, o alcalinización son frecuentemente aplicados para inhibir la actividad enzimática. La alcalinización no puede ser aplicada por ejemplo a compuestos fenólicos

por su alta sensibilidad a la oxidación a pHs alcalinos. La PPO muestra su actividad óptima a un pH entre 5 y 7 (Guerrero-Beltran et al., 2005) y la enzima parece relativamente sensible a pH ácidos. Pero, el control del pardeamiento enzimático únicamente por acidificación es muy difícil, a menos que sea a pHs muy bajos (Garzón et al., 2012).

La remoción completa del oxígeno es una forma muy satisfactoria para el control de la oxidación fenólica catalizada por la PPO, aunque este método no puede ser aplicado a tejidos frescos porque puede causar condiciones anaeróbicas y por lo tanto, cambia el metabolismo del tejido vegetal. Concerniente a los sustratos fenólicos, dos opciones han sido investigadas. La primera es la eliminación física por adsorbentes específicos como la ciclodextrina (Rocha y Morais, 2001). La segunda forma de remoción de compuestos fenólicos es por su modificación enzimática a través del uso de *o*-metil-transferasa aunque no se conoce su aplicación en alimentos. (Taranto et al., 2017).

Las *o*-quinonas pueden ser reducidas a *o*-difenoles o pueden reaccionar con otros compuestos y formar complejos no coloreados. Algunos de los compuestos reductores más usados son: el ácido ascórbico, los sulfitos, los tioles como la cisteína y los aminoácidos. (de la Rosa et al., 2011; Piagentini y Pirovani, 2017). Además, el uso de agentes antioxidantes de origen natural, tales como los extractos de salvado de arroz y yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. *Aquifoliaceae*), ambos ricos en compuestos fenólicos, retrasaron el pardeamiento enzimático de la manzana, produciendo un efecto inhibitor sobre la PPO (Rodríguez-Arzuaga y Piagentini, 2018; Sukhonthara et al., 2016).

### 1.8.3. Clasificación de inhibidores

El uso de inhibidores es restringido teniendo en cuenta consideraciones relevantes como la toxicidad, el efecto sobre las características sensoriales y el costo. Los inhibidores de pardeamiento pueden ser clasificados según el modo de acción en seis categorías:

- Agentes reductores: agentes sulfhídricos, ácido ascórbico y sus análogos, cisteína, glutatión, etc.
- Acidulantes: ácido cítrico y fosfórico.
- Agentes quelantes: fosfatos, EDTA, ácidos orgánicos, etc.
- Agentes acomplejantes: ciclodextrina
- Inhibidores de enzimas: ácidos carboxílicos aromáticos (incluidos compuestos fenólicos), alcoholes alifáticos, aniones, péptidos, resorcinol sustituido.
- Tratamientos enzimáticos: oxigenasas, *o*-metil transferasas, proteasas (Garzón et al., 2012).

La evaluación del efecto inhibitorio de compuestos naturales y no tóxicos sobre la PPO ha venido aumentando, tal es el caso de los extractos de té verde (Nirmal y Benjakul, 2011),



extracto acuoso de cebolla (Kim et al., 2005) y yerba mate (Rodríguez-Arzuaga et al., 2020). El poder inhibitorio de algunos de estos extractos como el de té verde y yerba mate se debe a su gran cantidad de compuestos fenólicos en su composición. Es por esto, que el uso de sustancias polifenólicas “mínimamente purificadas” representa una ventaja en el mercado por su bajo costo y rendimientos, además de que la precepción del consumidor es más favorable hacia estas sustancias naturales (Martín, 2011).

#### 1.8.4. Cinética de inhibición enzimática

La cuantificación de los factores que afectan la velocidad de una reacción catalizada por enzimas, se le conoce como cinética, permitiendo la caracterización de una enzima de manera individual (Eraso, 2009; Macías et al., 2018). En una reacción enzimática, a bajas concentraciones de sustrato la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de sustrato y la reacción es, por lo tanto, de primer orden con respecto del sustrato. No obstante al aumentar la concentración del sustrato se observa el fenómeno denominado saturación por el sustrato, de esta forma la velocidad es constante e independiente de la concentración del mismo, viendo así, que la reacción pasa a ser de orden cero con respecto al sustrato (Macías et al., 2018). Esto llevó a Michaelis-Menten a establecer un modelo el cual indica que, la enzima (E) reacciona, en primer lugar, con el sustrato (S) y forma el complejo enzima-sustrato (ES), que se separa después en una segunda etapa para formar enzima libre (E) y los productos (P) (Michaelis et al., 2011). Definiendo así las relaciones cuantitativas entre la velocidad de reacción ( $V_o$ ) y la concentración de sustrato [S] si se conocen la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) y la constante de Michaelis-Menten  $K_m$  en la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1.1) (Macías et al., 2018; Rotbart et al., 2018).

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Ec. 1.1.}$$

Suponiendo que las moléculas inhibitoras pueden unirse a la enzima libre (E), o al complejo enzima-sustrato, (ES), y que todos los complejos alcanzan un rápido equilibrio, puede demostrarse que la tasa de enzima inhibida, es función de la concentración de inhibidor y enzima no inhibida, y de esta forma determinar la concentración de inhibidor [I] necesaria para que la tasa de una reacción no inhibida alcance la mitad de su valor máximo (Hammes, 2007). Los compuestos que se usan como inhibidores de la actividad de la PPO tienen la capacidad de unirse reversible o irreversiblemente a las enzimas específicas, y alterar su actividad. Los inhibidores competitivos, no competitivos e incompetivos son reversibles como se observa en la Tabla 1.3 (Cox y Nelson, 2000).

#### 1.8.5. Inhibidores reversibles

##### 1.8.5.1. Inhibidores competitivos

La sustancia inhibidora puede estar o no relacionada estructuralmente con el sustrato, esta se une reversiblemente con la enzima, en o en la periferia del sitio activo. La inhibición en este caso se presentará de manera competitiva entre el sustrato y el inhibidor. Este tipo de compuestos son comunes en la naturaleza (Zhang y Wong, 2005).

Midiendo la velocidad de la enzima con el sustrato en presencia y ausencia de un inhibidor, se puede llegar a medir el efecto del inhibidor para una variedad de concentraciones de sustrato. En este caso, el inhibidor disminuye la velocidad de la enzima a bajas concentraciones de sustrato, pero no la altera mucho a concentraciones altas (Motulsky y Christopoulos, 2003). El inhibidor no altera  $V_{max}$ , pero incrementa el valor de  $K_m$  (también llamada  $K_m$  aparente). Como ejemplos encontramos fármacos anticoagulantes como el acenocumarol (Guillory, 2007).

### **1.8.5.2. Inhibidores no competitivos**

Cuando la enzima o el complejo enzima-sustrato se unen a los compuestos de forma reversible, se conocen como inhibidores no competitivos. No es completa su reversión al aumentar la concentración de sustrato puesto que el sitio de unión del inhibidor no es idéntico al sitio activo, ni lo modifica directamente. La  $K_m$  no se altera, pero  $V_{max}$  disminuye con respecto a la observada en ausencia del inhibidor (Rotbart et al., 2018) como por ejemplo en el uso de ácido cítrico como inhibidor de la PPO de manzana variedad "Princesa" (Martín, 2011).

### **1.8.5.2. Inhibidores incompetivos**

Los compuestos que se combinan reversiblemente sólo con el complejo enzima-sustrato (ES) pero no con la enzima libre, se conocen como inhibidores incompetivos o incompetivos. Este tipo de inhibición no es superada con altas concentraciones de sustrato, y la  $K_m$  aparente en presencia de un inhibidor es más pequeña que el valor de la  $K_m$  no inhibida (Zhang y Wong, 2005). Como ejemplo vemos el extracto fenólico de yerba mate en PPO de manzana variedad "Princesa" (Martín, 2011).

### **1.8.6. Inhibidores irreversibles**

Estos forman un enlace covalente, por lo general una cadena lateral de un aminoácido se asocia con la actividad catalítica de la enzima. Un inhibidor irreversible no puede ser liberado por dilución o diálisis; sus efectos no pueden ser revertidos simplemente al aumentar la concentración del sustrato. La velocidad de la reacción disminuye a un nivel que corresponde con la fracción de las moléculas de enzimas que han sido inactivadas (Tipton, 1996). La penicilina actúa de esta forma sobre las enzimas de las paredes bacterianas (Guillory, 2007)

**Tabla 1.3.** Principales diferencias entre inhibidores reversibles e irreversibles.

Ecuación básica	Constante cinética	Velocidad de inhibición	reversibilidad	
			<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Reversible $E + I \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1} E \cdot I}$	$K_i = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$	Usualmente rápida	Dilución Diálisis: Filtración gel	Eliminación de inhibidores libres
Irreversible $E + I \xrightarrow{k} E \cdot I$	k	Frecuentemente lenta	Ninguna	Síntesis de más enzima

**Tomado de:** (Tipton, 1996). E: enzima, I: inhibidor, K: constante cinética,  $K_i$ : Constante de inhibición,  $k_{(+1)(-1)}$ : constante de velocidad específica para las reacciones indicadas.

### 1.9. Proceso de extracción de compuestos antioxidantes de una matriz alimentaria

Diversos estudios previos mostraron que los métodos usados en la extracción de antioxidantes se correlacionaban con el rendimiento y la bioactividad del extracto. Por lo tanto, las condiciones en que se realiza este procedimiento se vuelve esencial para la obtención cuantitativa de dichos compuestos sin la pérdida de la capacidad antioxidante (Zhang et al., 2015). Entre los métodos tradicionales de extracción sólido-líquido encontramos, la maceración, la extracción por Soxhlet y la percolación, que se han utilizado durante varias décadas. No obstante, su metodología consume mucho tiempo y requieren cantidades relativamente grandes de solventes, además de que los rendimientos de extracción, y las actividades antioxidantes resultantes son bajas (Rodríguez-Rojo et al., 2012).

Dentro de las operaciones unitarias, la extracción sólido-líquido permite la remoción de un analito de interés (solute), que está presente en una matriz sólida utilizando un líquido (disolvente), el cual tiene la capacidad de disolver el soluto. Dentro de la operación se puede involucrar la agitación en etapas o de manera continua, dejándolos en contacto por un determinado tiempo, así, pasado el lapso se separa el disolvente con el soluto disuelto. Durante toda la operación ocurren 3 fenómenos: en primer lugar, se da el ingreso del disolvente al sustrato y luego la solubilización del soluto, el movimiento de la disolución del interior del alimento hacia su superficie, y en tercer lugar la dispersión de la disolución en el disolvente (Takeuchi et al., 2008).

La extracción es el primer y más importante paso en el aislamiento y purificación de componentes bioactivos de materiales vegetales. Se pueden aplicar varias técnicas de extracción para recuperación de compuestos fenólicos de las plantas, y en general estas

técnicas se pueden dividir en las tradicionales y las modernas. Los métodos tradicionales de extracción incluyen maceración, maceración asistida con agitación, y la extracción de Soxhlet. En los últimos años varias técnicas nuevas se han utilizado para la extracción de compuestos bioactivos incluyendo extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción con fluidos sub- y supercríticos y extracción acelerada con solventes (Khoddami et al., 2013).

Generalmente, el procedimiento de extracción es secuencial y libera sistemáticamente los compuestos fenólicos. El primer paso del procedimiento generalmente utiliza un solvente orgánico acuoso para extraer los compuestos fenólicos solubles/extraíbles (ácidos libres, ésteres libres y solubles, y glucósidos solubles) ya que dichos compuestos se extraen fácilmente con solventes orgánicos acuosos (Putnik et al., 2018; Rezaie et al., 2015). Los disolventes orgánicos más comúnmente utilizados para la extracción de compuestos fenólicos incluyen metanol, etanol, acetona y acetato de etilo (Deng et al., 2014). Sin embargo, según Mokrani y Madani, (2016), los procesos de extracción con disolventes convencionales tienen ciertas limitaciones tales como alta temperatura de extracción, menor eficiencia, bajo rendimiento de extracción, uso de grandes cantidades de solventes, resistencia a la transferencia de masa y peligros para la salud (Adjé et al., 2010; Jadhav et al., 2009).

Debido a la variedad de compuestos fenólicos que existen, y la forma en que se encuentran ligados a otros compuestos tales como carbohidratos y proteínas, resulta complejo desarrollar una extracción que garantice la recuperación total de estos metabolitos presentes en una matriz vegetal (Haminiuk et al., 2012; Mokrani y Madani, 2016).

### **1.9.1. Disolventes**

Los compuestos fenólicos comúnmente son solubles en solventes orgánicos menos polares que el agua, no obstante, esta solubilidad va a depender de las propiedades de los solventes y las interacciones que ocurren entre solvente-solvente y soluto- solvente (Kim and Lee, 2003; Rosas et al., 1995).

Los disolventes no deben considerarse únicamente como sistemas continuos, descritos por constantes físicas como la densidad, la constante dieléctrica, el índice de refracción, etc., sino como un discontinuo formado por moléculas individuales de disolvente que interactúan entre sí (Reichardt, 1984). Dentro de las interacciones no covalentes encontramos la habilidad para aceptar enlaces de hidrogeno, habilidad para donar enlaces de hidrogeno, fuerzas dipolo, la interacciones de transferencia de carga, interacciones iónicas y los efectos hidrofóbicos o solvofóbicos (Gu et al., 2004; Mabesoone et al., 2020), como se puede observar en la tabla 1.4.

Los podemos clasificar según sus propiedades en:

*Próticos polares:* se caracterizan por ser donantes de enlaces de hidrógeno y contienen principalmente grupos hidroxilo, por ejemplo, agua, alcoholes de bajo peso molecular como etanol y metanol, y las soluciones de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular (Reichardt y Welton, 2010).

*Apróticos polares:* tienen dipolos debido a enlaces polares, pero no poseen átomos de hidrógeno unidos con un átomo de alta electronegatividad que puede ser donado en un enlace de hidrógeno. La mayoría de los disolventes apróticos polares contienen un grupo carbonilo, por ejemplo, acetona y acetato de etilo (Taghizadeh et al., 2018).

*No polares:* son aquellos que poseen enlaces entre átomos con electronegatividades más o menos similares, como el carbono y el hidrógeno. Los alcanos como el hexano y el éter de petróleo son ejemplos conocidos de estos (Reichardt y Welton, 2010).

**Tabla 1.4.** Propiedades fisicoquímicas de los solventes usados en la extracción de compuestos fenólicos

Solvente	Estructura química	$E^N_T$ <sup>a</sup>	$\pi^{*a}$	$\alpha^a$	$\beta^a$	Momento dipolo <sup>b</sup>	Constante dieléctrica <sup>b</sup>	$\eta^b$	Tensión superficial <sup>c</sup>
Agua	H <sub>2</sub> O	1.00	1,09	1,17	0,47	1.87	78.36	0,89	104,70
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	0,762	0,60	0,98	0,66	1.70	32.61	0,54	31,77
Etanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	0,654	0,54	0,86	0,75	1.69	24.85	1,07	31,62
Acetona	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	0,355	0,71	0,08	0,48	2.88	20.49	0,31	33,77

$E^N_T$ : índice solvatocrómico de Reichardt;  $\pi^*$ : Índice de polaridad;  $\alpha$ : Acidez;  $\beta$ : Basicidad;  $\eta$ : Viscosidad a 25° (cP); <sup>a</sup>Bosch, E., & Rosés, M. (1992); <sup>b</sup>(Lide, 1995); <sup>d</sup>Tensión superficial del solvente a 25°C en cal/(mol Å<sup>2</sup>)

Para las frutas, en el proceso de extracción de compuestos fenólicos se usan distintos solventes como los anteriormente mencionados. Para el caso de la mora, arándanos, frutilla, champa (fruto autóctono de Colombia), y mango se reportan mejores resultados en la extracción de fenoles con el uso de etanol en primer lugar, y soluciones de etanol-agua y metanol-agua (Ćujić et al., 2016; Karvela et al., 2009; Machado et al., 2015; Muñoz et al., 2015; Sant'Anna et al., 2012; Yang et al., 2016). No obstante, el uso de ácidos (ácido

clorhídrico, acético o fórmico) muestra una ventaja adicional en los rendimientos de extracción (Saliha Şahin et al., 2013; Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann, 2010).

Para el caso del aprovechamiento de subproductos de frutas, Chan et al. (2009) compararon varios solventes tales como etanol, acetona y metanol para la extracción de compuestos fenólicos de cascara de limau purut (*Citrus hystrix*). Los investigadores concluyeron que la extracción con una solución acuosa de acetona fue ligeramente más eficiente que con soluciones acuosas de etanol y metanol, en las siguientes condiciones de extracción: 60% solvente con agua; temperatura, 25°C y tiempo extracción, 3 horas. Del mismo modo, la eficiencia de diversos disolventes tales como etanol, metanol, acetona, diclorometano, acetato etilo y hexano se evaluaron para la extracción de compuestos fenólicos de cáscara de naranja (Hegazy y Ibrahim, 2012). Según Spigno et al., (2007) las mezclas entre el agua y los alcoholes han sido más eficientes en la extracción de compuestos fenólicos en comparación con los sistemas de solvente mono componente, por esto, soluciones acuosas de etanol y metanol se utilizan comúnmente para la extracción de polifenoles del orujo de uva (Bucić-Kojić et al., 2007; Torres et al., 2003). Varias fuentes bibliográficas indican que el etanol al 50%, es el disolvente de extracción óptimo para polifenoles de orujo de uvas (Monrad et al., 2010; Srinivas et al., 2011). En el caso de las hojas de grosella negra, frambuesa, arándano, madreSelva y frutilla, el etanol al 80% arrojó mejores resultados (Oszmiański et al., 2011). La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos, clasifica a los solventes en varias clases, dentro de la clase 3 tenemos al etanol, acetona y acetato de etilo, los cuales pueden ser usados en alimentos bajo el marco de las buenas prácticas de manufactura, lo cual se conoce como GRAS (Generally Recognized as Safe). Dentro de los solventes clase 2 tenemos al metanol, hexano o acetonitrilo, que requieren condiciones especiales de manejo, debido a su toxicidad. Con esto, es claro la razón por la cual a pesar de tener buenos rendimientos de extracción el metanol queda relegado frente al etanol, que resulta ser uno de los más usados hoy en día (Vatai et al., 2009).

### **1.9.2. Relación Solvente-Sólido**

Para realizar una extracción de un soluto de una matriz sólida, debe existir una fuerza impulsora que produzca la transferencia de materia, dicha fuerza es el gradiente de concentraciones que existe entre la matriz sólida y el solvente. La misma, se puede variar modificando la relación disolvente/sólido, entre más grande sea esta se tendrá una mayor extracción de los solutos de la muestra; no obstante, si se observa el proceso a escala industrial, los costos de una amplia relación serían muy elevados, por ende, afectaría el producto final en su competitividad. Por lo anterior, es vital analizar y optimizar la relación solvente/soluto ( $St/S$ ) en cada caso de extracción (Takeuchi et al., 2008).

Estudios en cáscara de granada, nuez, kinow, hojas de moringa y aronia, evaluaron la influencia de la relación St/S en la extracción de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante en un rango de 10:1 hasta 35:1. Como era de esperarse, el aumento de la relación favoreció en todos los casos las variables de respuesta, mientras mayor sea esta relación, mejor es la transferencia de masa, puesto que así se puede aprovechar mejor la capacidad extractiva del disolvente, lo que evita la saturación temprana del mismo y por consiguiente lograr la mayor concentración del analito de interés (Castro-López et al., 2017; Čujić et al., 2016; Safdar et al., 2017; Valdés-hernández et al., 2015). Sin embargo, al intentar encontrar el óptimo mediante herramientas estadísticas tales como superficies de respuestas, se llegaban a relaciones superiores a 50:1 como en el caso de hojas de frutilla blanca chilena (Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann, 2010), lo cual complica su uso en escalas industriales. No obstante, los rendimientos también se pueden optimizar manejando variables como temperatura, pH y tiempos de extracción.

### **1.9.3. Temperatura y tiempos de extracción**

Estos factores juegan un papel fundamental en los rendimientos de extracción y en el ámbito económico si se le mira desde el proceso a gran escala. Estudios realizados en la extracción de metabolitos secundarios han establecido que el incremento de la temperatura favorece las reacciones de división y el rompimiento de la pared celular, debido a que la energía térmica aumenta la vibración molecular y por tanto la división y separación de los compuestos; lo que favorece la ruptura de fuerzas intermoleculares y de algunos enlaces. Además, el incremento de temperatura también puede contribuir a la activación de enzimas que participen de la descomposición de los compuestos complejos que crean puentes de hidrógeno con los compuestos fenólicos, facilitando la extracción de éstos. Sin embargo, puesto que los compuestos fenólicos no son los únicos compuestos en la matriz estudiada, pueden existir otras interacciones que afectan la cantidad de masa de extracto obtenida (Duque y Morales, 2005).

Por otro lado, se debe tener en cuenta en el proceso de extracción, la estabilidad de los compuestos fenólicos a las altas temperaturas. Por ejemplo, en el caso de las antocianinas, temperaturas mayores a los 50°C aceleran su proceso de degradación (Dai et al., 2009), por ende, para este tipo de compuestos se debe controlar el tiempo a bajas temperaturas.

Muñoz et al. (2015) determinó una temperatura óptima de extracción a 70°C para compuestos fenólicos en champa (fruta autóctona de Colombia), pasando de un 26% de rendimiento a 20°C a más del 50% a los 70°C. Para los subproductos como cáscara y pulpa de mandarina, limón y naranja con la técnica de maceración para la obtención de compuestos fenólicos, se determinaron los parámetros adecuados con la utilización de:

etanol al 80% como disolvente a 70°C durante 3 horas (Juhaimi, 2014). En orujo de uva, el aumento del tiempo tuvo una correlación positiva con el contenido de fenoles y su capacidad antioxidante (Putnik et al., 2016).

#### **1.9.4. Tamaño de partícula**

Los rendimientos finales en el proceso de extracción también se pueden ver afectados por el tamaño de partícula; estos mejoran a medida que disminuye el tamaño de partícula (Bucić-Kojić et al., 2007). Para el caso de la fruta aronia los rendimientos obtenidos con partículas de tamaño 1 y 0,75 mm fueron significativamente mayores (14.9 y 15.4 mg GAE/g de base seca, respectivamente) que aquellos obtenidos con partículas de mayor tamaño de 2, 3 y 6 mm (11.8, 11.4 y 10,5 mg de GAE/g de base seca, respectivamente). Del mismo modo, la partícula de tamaño más pequeña (0.75 mm) tuvo el mayor valor en la capacidad antioxidante (0.178%) (Ćujić et al., 2016). Por otro lado, Galván D'Alessandro et al. (2012) estudiaron la extracción en aronia, en donde ésta fue más eficiente en las frutas molidas que en las bayas cortadas por la mitad. El tamaño de partícula más pequeño tiene una superficie de contacto más alta que permite el aumento de la transferencia de masa.

Sin embargo, se ha reportado que un tamaño de partícula muy pequeño brinda coeficientes de variación altos en el resultado, esto por un posible efecto de aglomeración de partículas. Además, con los menores tamaños se extrae también una mayor cantidad de proteínas que pueden generar una interferencia en las mediciones espectrofotométricas de fenoles totales (Bucić-Kojić et al., 2007).

#### **1.9.5. Influencia del pH**

El pH de la solución extractante puede repercutir significativamente en los rendimientos de extracción y en los perfiles de los compuestos a obtener. Para el caso de las antocianinas un pH bajo las mantiene en su forma de catión flavilio o como especie quinoidal neutra, facilitando su extracción y además, ayuda a hidrolizar las paredes de los tejidos vegetales facilitando la difusión del soluto al disolvente (Takeuchi et al., 2008). Ácidos fuertes, como el HCl (Ju y Howard, 2003), en combinación con altas temperaturas. (80–120°C) se usan comúnmente para la hidrólisis de polifenoles conjugados en orujo de uva (Monrad et al., 2010). En otras frutas y hortalizas, los ácidos se utilizan para liberar ciertos polifenoles que están unidos en los complejos (Harbourne et al., 2013), también se suele usar ácido acético y/o fórmico (Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann, 2010). Se recomienda que la concentración de tales ácidos debe ser baja (menos del 1%) debido a la formación de compuestos indeseables en altas concentraciones (Kammerer et al., 2006; Srinivas et al., 2011).

#### **1.9.6. Determinación de Compuestos Fenólicos**



Finalmente, con el fin de evaluar diferentes fuentes de antioxidantes y compuestos bioactivos, es necesario la identificación y cuantificación de dichos compuestos por medio de técnicas adecuadas para proporcionar información sobre la composición general y permitir la identificación de fenoles individuales en matrices complejas (Escarpa y González, 1998).

Varias técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alto rendimiento con UV-Vis y detección por arreglos de fotodiodos (HPLC–DAD) (Chen et al., 2001; Zuo et al., 2002), cromatografía de gas-líquido con detector de ionización de llama (GC – FID) (Zuo et al., 2008), cromatografía gas-líquido combinada con espectrometría de masas (GC-MS) (Zuo et al., 2007), la electroforesis capilar con detección electroquímica (CE – ED) (Peng et al., 2008), y la electroforesis capilar acoplada al tiempo de ionización por electropulverización y espectrometría de masas (CE – ESI-TOF-MS) (Caravaca et al., 2008), se han utilizado para detectar, caracterizar y cuantificar compuestos fenólicos presentes en diferentes alimentos, medicamentos, plantas y subproductos de la industria alimentaria (Sánchez et al., 2003).

#### 1.10. Extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de la industrialización de frutas y hortalizas

Recientemente, ha aumentado mucho el interés en la recuperación de compuestos bioactivos a partir de residuos agrícolas e industriales (cáscara de granada, cáscara de nuez, orujo de manzana y uva, cáscara de plátano, semillas de sandía, entre otros), los cuales podrían utilizarse principalmente como aditivos en la industria alimentaria, pero también podrían tener aplicaciones farmacéuticas y/o cosméticas (Lizcano et al., 2012; Na et al., 2011) Como se describió previamente los tejidos vegetales residuales generados en el procesamiento de frutas, como son las semillas, cascaras, bagazos del despulpado o prensado, presentan grandes cantidades de compuestos bioactivos como las sustancias fenólicas, con un potencial para ser extraídas que debe ser optimizado para cada matriz (Ignat et al., 2011). En la Tabla 1.5 se observan distintas matrices vegetales residuales con distintos tipos de extracción y algunos de sus rendimientos de extracción obtenidos.

**Tabla 1.5.** Extracción de antioxidantes de algunos sub-productos.

Subproducto	Tipo de extracción	Polifenoles Extraídos	Referencia
Hojas de frutilla silvestre	EC- Agua (6g/100 mL), 30 min Temp. Ambiente	92,97 mg AGE/100g	Mudnic et al., (2009)
Residuo del prensado de arándano rojo	EC- EtOH 50%, 120 min (1:10) pH:2 120 min	964 mg AGE/L extracto	Roopchand et al., (2013)

Hojas de árbol de madroño	EAU- MeOH 80% (3g/80 mL) 50°C por 15 min	96,96 mg AGE/ 100g	Jurica et al., (2017)
Cáscara de Granada	EAU- 20 KHz (1:50) 25°C por 60 min	140 mg AGE/ 100g	Pan et al., (2011)
Semillas de uva molida	EAU- 56°C, EtOH 50% 29 min	5,44 mg AGE/ 100 mL extracto	(Ghafoor et al., 2009)
Hojas de frutilla	EC- (1:10) Agua 20°C por 60 min	200 mg AGE / Kg	Ibrahim y Abd El-Maksoud, (2015)

EC: Extracción convencional, EAU: Extracción Asistida por ultrasonido, EtOH: Etanol, MeOH: Metanol, AGE: ácido gálico equivalente.

Debido a que tanto el rendimiento como la bioactividad de los extractos obtenidos de los residuos agroindustriales se correlacionan con los métodos de extracción aplicados, el método de extracción utilizado en este procedimiento se convierte en parte esencial para una correcta identificación y cuantificación de los compuestos bioactivos, como de sus propiedades bioactivas, por ejemplo su capacidad antioxidante (Mercado et al., 2018; Zhang et al., 2015).

Los residuos vegetales generados por la agroindustria de la frutilla en Argentina actualmente no presentan mucha atención siendo su deposición una problemática seria para las empresas procesadoras, a su vez, el sector presenta crecimiento sostenido con el paso de los años y de esta forma lo hacen también los desechos vegetales.

Adicional a esto, el uso de distintos solventes orgánicos (metanol, etanol, acetona y sus mezclas acuosas), con variación del pH para la extracción de compuestos fenólicos a partir de subproductos de frutilla, no cuenta con resultados cuali-cuantitativos, lo cual permite abrir una puerta para el aprovechamiento de estos descartes y potenciar este sector agroindustrial específico.

## **1.11. OBJETIVOS**

### **1.11.1. Objetivo general**

El objetivo de este trabajo es estudiar el impacto de distintos sistemas de extracción del residuo agroindustrial de frutilla (*Fragaria x ananassa*) variedad 'Festival' sobre el contenido y perfil de compuestos fenólicos de los extractos, así como sobre su capacidad antioxidante, antimicrobiana e inhibitoria de la enzima PPO de manzana.

### **1.11.2. Objetivos específicos**

- Evaluar las condiciones de extracción sólido-líquido (tipo de solvente, concentración de ácido y número de etapas de extracción) sobre el rendimiento de extracción de fenoles y flavonoides totales.
- Analizar el efecto de las variables del proceso de extracción sólido-líquido sobre la capacidad antioxidante de los diferentes extractos obtenidos a partir del residuo de frutilla,
- Determinar el efecto de las condiciones de extracción sobre el perfil de compuestos fenólicos extraídos del residuo de frutilla,
- Determinar la capacidad antibacteriana y de inhibición de la PPO de manzana 'Red Delicious' de los extractos acuosos obtenidos a partir de residuos de frutilla.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Material Vegetal

La materia prima usada en este estudio es un descarte o residuo del procesamiento industrial de frutilla *Fragaria × ananassa* variedad 'Festival' (Figura 2.1). Este tejido vegetal se obtiene durante la poscosecha y acondicionamiento de las frutillas destinadas a la industria, principalmente en la etapa del despalillado manual y consta básicamente del sépalo, pedúnculo (pedicelo o pedículo), y restos de fruta (Figura 1.1).

El material vegetal utilizado en la presente tesis fue obtenido en un campo de cultivos de frutilla ubicado en la región de Coronda, (Provincia de Santa Fe, Argentina) a través de la Ing. María del Huerto Sordo del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).



**Figura 2.1.** Tejido vegetal descartado en el procesamiento de frutilla *Fragaria × ananassa* variedad 'Festival'

### 2.2. Almacenamiento y preparación de las muestras

Inmediatamente luego de recibidos los descartes del despalillado de frutilla fresca provenientes del campo de cultivo, se determinó su contenido de humedad por triplicado mediante termogravimetría utilizando un analizador de humedad RADWAG PMR 50 (Polonia) con radiador halógeno como elemento calefactor, a 80°C durante 1 hora.

Los residuos del despalillado de frutilla fresca provenientes de un mismo lote se almacenaron a -18°C hasta su procesamiento (no más de 4 meses). El material vegetal se almacenó en bolsas de polietileno de 40 µm, conteniendo entre 300 y 500 g cada una. Antes de cada ensayo de extracción, las muestras se molieron en un mortero de porcelana con el uso de CO<sub>2</sub> para mantener la temperatura por debajo de los 4°C y facilitar la molienda sin pérdida de compuestos bioactivos obteniendo un tamaño de partícula ≤ 1mm.

### 2.3. Extracción de compuestos fenólicos

#### 2.3.1. Diseño experimental

Los ensayos de extracción de compuestos fenólicos de los tejidos vegetales de frutilla se realizaron a través de extracciones sólido-líquido, siguiendo un diseño factorial de tres variables: tipo de solvente (4 niveles); concentración de ácido fórmico (2 niveles); y número de etapas de extracción (2 niveles). En la Tabla 2.1 se detallan los factores y niveles del diseño experimental utilizado. Todas las extracciones (16 corridas experimentales) se realizaron por duplicado manteniendo constante la temperatura de extracción a 20°C. Como respuesta del diseño se evaluó en cada extracto (variables dependientes): el contenido de fenoles totales (FT), el contenido de flavonoides totales (FvT), el perfil de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante ( $CA_{DPPH}$  y  $CA_{FRAP}$ ).

**Tabla 2.1.** Diseño experimental

<b>Factor</b>	<b>Niveles (Símbolo)</b>
<b>Solvente (St)</b>	Agua (100%) (A)
	Etanol (80:20) (EtOH-A)
	Metanol (80:20) (MetOH-A)
	Acetona (80:20) (AC-A)
<b>Concentración de ácido fórmico (<math>C_{AF}</math>) (%)</b>	0,0
	0,5
<b>Número total de etapas de extracción (EE)</b>	1 (1:10)*
	2 (1:5)

\*Relación de extracción

El etanol utilizado se define como alcohol puro y posee un 98,5% v/v de grado alcohólico y una densidad relativa (20°C/ 20°C) de 0,806 g/mL. El metanol se define como alcohol metílico y posee un 99,8% v/v de concentración y una densidad relativa (20°C/ 20°C) de 0,792 g/mL. La acetona posee una concentración de 99,5% y una densidad relativa (20°C/ 20°C) de 0,784 g/mL. Etapas de extracción: una etapa (1): tomando una parte de la muestra con 10 partes de la solución extractante (1:10 m/v), y dos etapas (2): una parte de material vegetal con 5 partes de solución extractante (1:5 m/v) y re-extracción del material vegetal luego de la centrifugación y separación del sobrenadante con otras 5 partes de solución extractante.

### 2.3.2. Ensayos de extracción

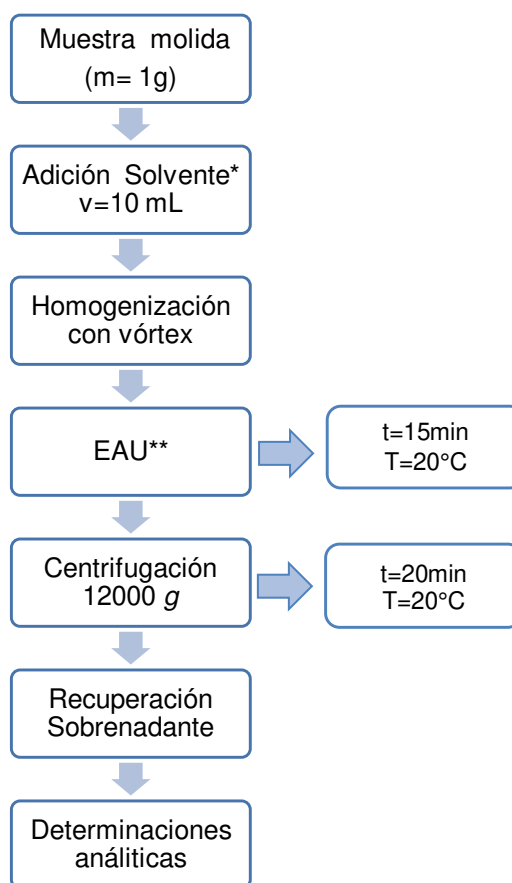
En la Tabla 2.2 se detallan los niveles de las variables independientes (factores) utilizados en cada uno de los ensayos de extracción.

**Tabla 2.2.** Factores y niveles de cada ensayo de extracción

Número de ensayo	St	C <sub>AF</sub> (%)	EE
1	A	0,0	1
2	A	0,0	2
3	A	0,5	1
4	A	0,5	2
5	EtOH-A	0,0	1
6	EtOH-A	0,0	2
7	EtOH-A	0,5	1
8	EtOH-A	0,5	2
9	MetOH-A	0,0	1
10	MetOH-A	0,0	2
11	MetOH-A	0,5	1
12	MetOH-A	0,5	2
13	AC-A	0,0	1
14	AC-A	0,0	2
15	AC-A	0,5	1
16	AC-A	0,5	2

St: solvente, C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico (%), EE: Número total de etapas de extracción

Para la realización de los extractos en 1 etapa se pesó un gramo de muestra molida como se indicó en el inciso 2.2, se adicionó 10 mL de solución extractante, de acuerdo con lo indicado en la Tabla 2.2, y se procedió a mezclar y homogeneizar con ayuda del vórtex. Luego se sonicó en un baño de ultrasonido (T40, Testlab, Buenos Aires, Argentina) por 15 min a 20°C. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 12000 *g* durante 20 min a 20°C. (Centrífuga refrigerada Neofuge 18R Heal Force, Shangai, China) y el sobrenadante resultante se reservó para su posterior análisis (Figura 2.2).

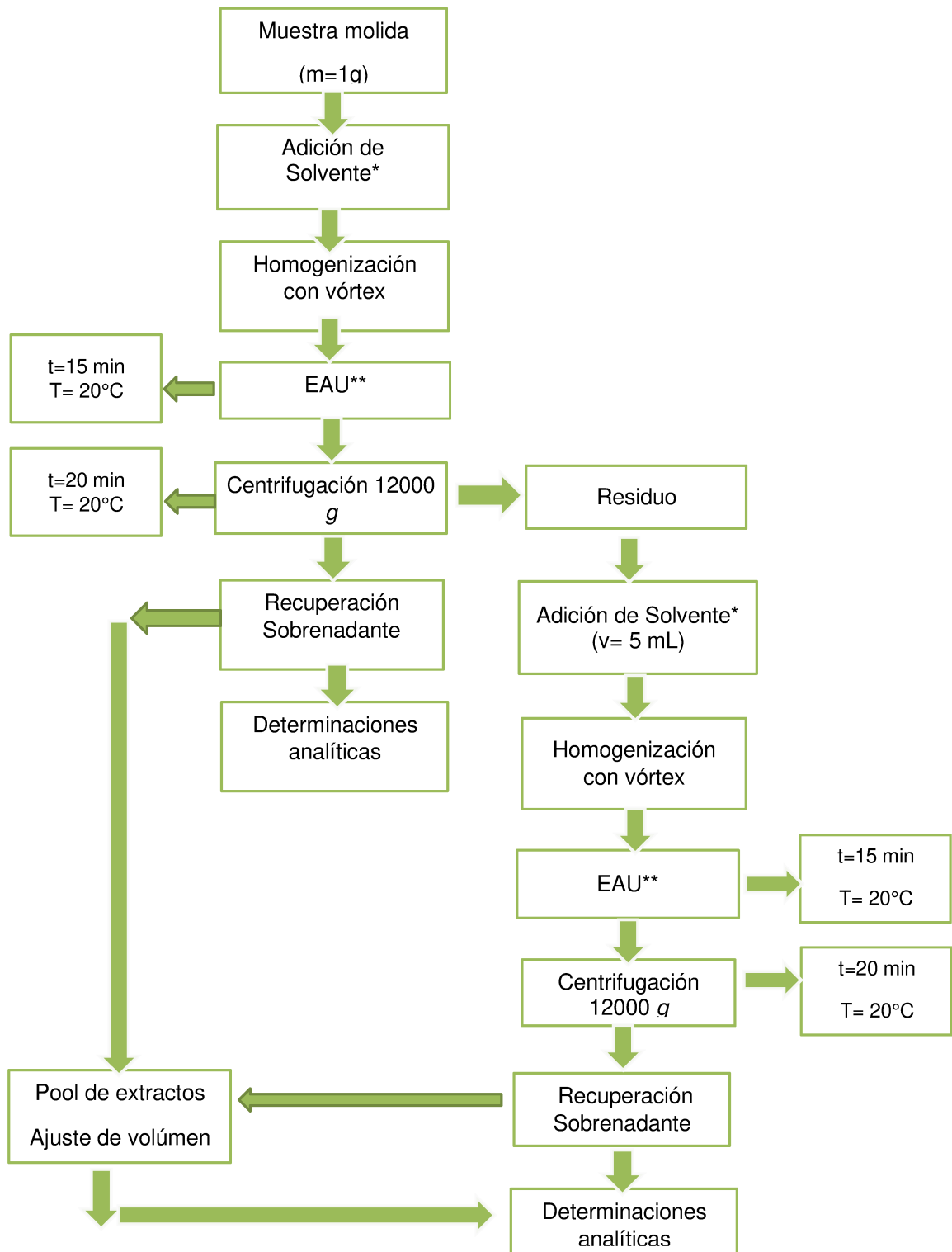


\*: De acuerdo con Tabla 2.2. \*\*: EAU: Extracción asistida por ultrasonido

**Figura 2.2.** Proceso de extracción en una etapa de compuestos fenólicos a partir del descarte de frutillas.

Para la realización de los ensayos en 2 etapas, se pesó 1 g de muestra previamente molida, y se añadieron 5 mL de solución extractante (Tabla 2.2). La mezcla se homogeneizó con vórtex y se colocó en un baño de ultrasonido por 15 min a 20°C (Figura 2.3). Luego, la mezcla se centrifugó a 12000 g durante 20 min a 20°C y el sobrenadante resultante se recogió en un matraz volumétrico de 10 mL. Al sedimento obtenido se le adicionó 5 mL de la misma solución extractante utilizada inicialmente y se repitió el proceso descrito anteriormente recolectando el sobrenadante y añadiéndolo al mismo obtenido en la primera etapa de extracción, completando el matraz a 10 mL con solución de extracción (Figura 2.3).





\*, De acuerdo con Tabla 2.2. \*\*, EAU: Extracción asistida por ultrasonido

**Figura 2.3.** Proceso de extracción en 2 etapas de compuestos fenólicos a partir del descarte de frutillas.

## 2.4. Determinaciones analíticas

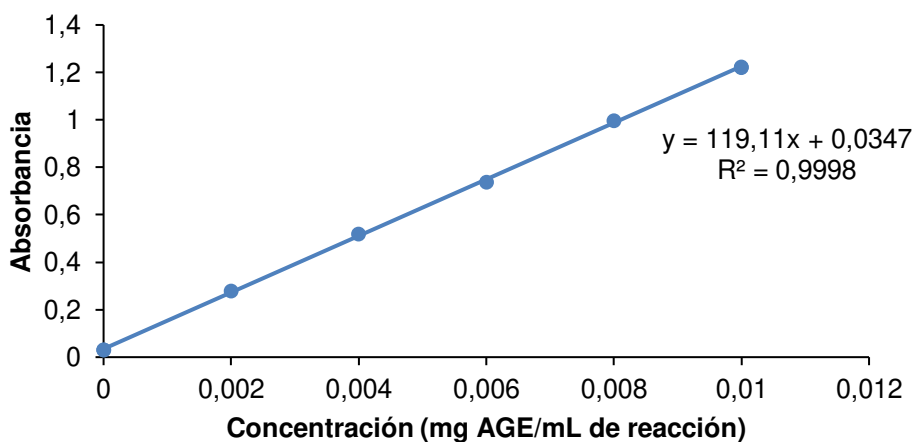
### 2.4.1. Contenido de fenoles totales (FT)

Las determinaciones del contenido de fenoles totales (FT) se hicieron por duplicado en cada uno de los extractos obtenidos, de acuerdo con la técnica de Singleton y Rossi, (1965). La determinación se llevó a cabo a través del método de Folin-Ciocalteu, adaptado. El reactivo está compuesto por una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico en medio básico, los que sufren una reducción al oxidar los compuestos fenólicos, originando un complejo tungsteno-molibdeno de color azul cuya absorbancia es dependiente de la concentración de los polifenoles de la muestra. La absorbancia de la reacción se midió en un espectrofotómetro (Genesys 10s UV-Vis, Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) a 760 nm. Se utilizó ácido gálico (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EE. UU.) como reactivo estándar.

La concentración de compuestos fenólicos totales de cada de extracto obtenido se expresó en equivalentes de ácido gálico por gramo de residuo fresco (mg AGE/g RF).

#### 2.4.1.1. Curva estándar con ácido gálico

Para obtener la curva de calibrado se disolvieron 20 mg de ácido gálico con agua destilada y se los llevó a volumen en un matraz de 200 mL. A partir de esta solución madre cuya concentración inicial era de 100 mg/L (ppm) de ácido gálico, se prepararon soluciones de concentraciones 20, 40, 60, y 80 ppm. Doscientos cincuenta microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de solución patrón de concentración conocida se hicieron reaccionar con 250  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu, 500  $\mu\text{L}$  de solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (10%) y 1500  $\mu\text{L}$  de agua destilada durante 30 min en oscuridad. Luego, se midió la absorbancia a 760 nm y se graficó en función de la concentración de ácido gálico (mg AGE/mL de reacción) (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Curva de calibrado con ácido gálico.

### 2.4.1.2. Medición de compuestos fenólicos totales

Los extractos obtenidos en los distintos ensayos se diluyeron adecuadamente para poder realizar la determinación de fenoles totales. En el caso de los extractos obtenidos en 1 etapa, se diluyeron en un factor (fd) de 1:5, y para aquellos extractos obtenidos en 2 etapas se diluyeron 1:10 los de la primera etapa y 1:5 los de la segunda etapa (Figura 2.3). De esta manera se hicieron reaccionar 100  $\mu\text{L}$  de extracto diluido con 250  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu, 500  $\mu\text{L}$  de solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (10%) y 1650  $\mu\text{L}$  de agua destilada durante 30 min en oscuridad. Luego se midió la absorbancia a 760 nm. Como blanco de reacción se tomaron los mismos reactivos, reemplazando los 100  $\mu\text{L}$  de extracto por 100  $\mu\text{L}$  de solución extractante correspondiente.

Para el cálculo de la concentración de compuestos fenólicos totales (FT), se ajustó la absorbancia medida con la del blanco de reacción, obteniendo de esta forma una absorbancia real. Posteriormente, se usó la curva de calibrado de ácido gálico (Figura 2.4) y las ecuaciones 2.2 y 2.3 para obtener la concentración de fenoles totales expresada como miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de residuo fresco (mg AGE/g RF).

$$Y = 119,11 * X + 0,0347 \text{ (obtenida de la regresión lineal, Figura 2.4)} \quad \text{Ec.2.1}$$

$$X = \frac{Y-0,0347}{119,11} \quad \text{Ec.2.2}$$

$$FT \left( \text{mg} \frac{\text{AGE}}{\text{g RF}} \right) = X \left( \frac{\text{mg AGE}}{\text{mL Rxn}} \right) * \frac{\text{Vol Rxn (mL)}}{\text{Vol Ext Rxn (mL)}} * \frac{fd^{-1}}{\text{Rel Ext} \left( \frac{\text{g RF}}{\text{mL sln}} \right)} \quad \text{Ec.2.3}$$

Donde: FT: contenido de fenoles totales (mg AGE/g RF)

Y= absorbancia

FT= concentración de fenoles totales [mg AGE/mL de reacción]

Vol. Rxn= volumen final de la reacción (mL)

Vol. Ext Rxn = volumen del extracto en la reacción (mL)

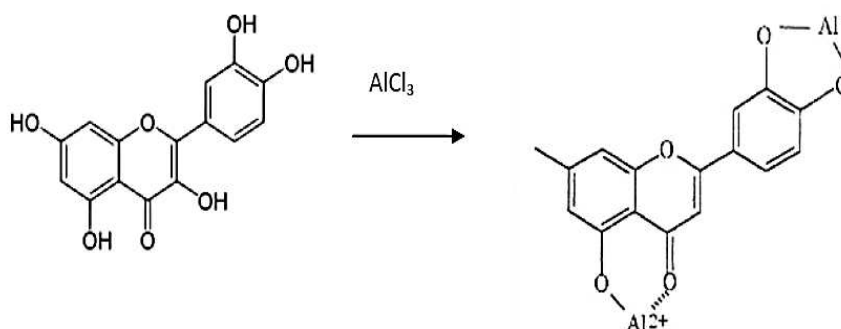
fd= factor de dilución (mL de extracto/mL de solución)

Rel Ext = relación de extracción (g RF/mL de solución extractante)

### 2.4.2. Contenido de Flavonoides totales

Los flavonoides, desde el punto de vista estructural, corresponden a un sistema de 3 anillos fusionados en una secuencia de carbonos que presenta un heterociclo central en una

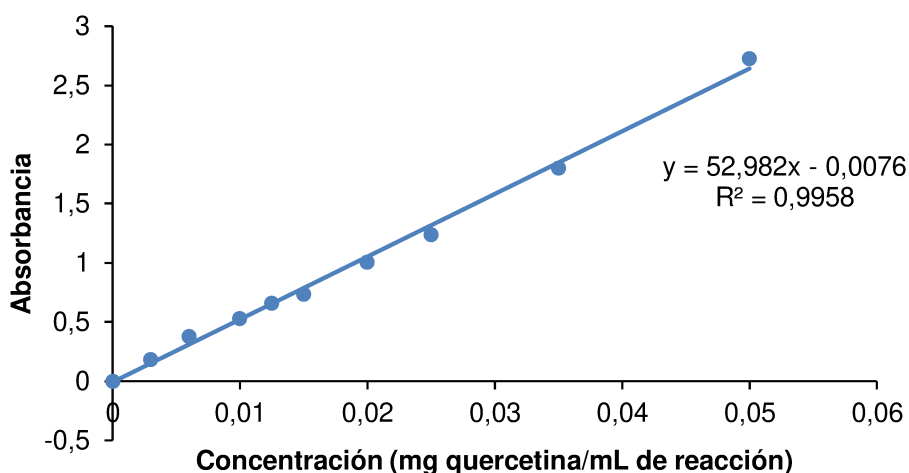
estructura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, que presentan estabilidad y reactividad (Amic et al., 2003; Seyoum et al., 2006). Estos compuestos suelen presentar al menos 3 grupos hidroxilos libres en su estructura, condición que facilita su clasificación y reactividad respecto del tricloruro de aluminio (Figura 2.5). Se genera un complejo estable con un máximo de absorción a 415 nm (Cooper y Nicola, 2014), sobre todo con las flavonas (apigenina, crisina y luteonina) y los flavonoles (rutina, morina, quercetina, miricetina, kaempferol, quercitina y galangina).



**Figura 2.5.** Formación del complejo flavonoide-tricloruro de aluminio. Fuente: Amaya y Portillo, (2013).

Para la realización de la curva de calibrado (Figura 2.6) se preparó una solución metanólica de dihidrato de quercetina de 500 µg/mL, a partir de la cual se prepararon soluciones metanólicas en el rango de concentraciones de 6-100 µg/mL. Se hizo reaccionar 1 mL de cada solución patrón con 1 mL de solución metanólica de AlCl<sub>3</sub> (2%) durante 1 hora, determinando la absorbancia a 415 nm. La regresión lineal del resultado permite obtener la curva de calibrado (Figura 2.6; Ec. 2.4).

Para determinar el contenido de flavonoides totales (FvT), en un tubo de ensayo se hizo reaccionar 1 mL de cada extracto de residuo de frutilla con 1 mL de AlCl<sub>3</sub> 2% en metanol. Simultáneamente, se preparó un blanco de muestra reemplazando el AlCl<sub>3</sub> por 1 mL de solución extractante, ya que los extractos presentaban coloraciones verdes amarillentas y era necesario eliminar esas interferencias. Se dejó reaccionar la mezcla por 1 hora y se procedió a medir la absorbancia a 415 nm. Se usaron las ecuaciones 2.4, 2.5 y 2.6 para el cálculo de la concentración en los extractos, expresando los resultados (FvT) en mg de quercetina/ gramo de RF.



**Figura 2.6** Curva de calibrado de flavonoides totales.

Se restó la absorbancia del extracto menos la del blanco de cada tipo de solvente y se procedió con las siguientes ecuaciones:

$$Y = 52,982 * X - 0,0076 \quad \text{Ec.2.4}$$

$$X = \frac{Y+0,0076}{52,982} \quad \text{Ec.2.5}$$

$$FvT \left( \frac{\text{mg quercetina}}{\text{g RF}} \right) = X \left( \frac{\text{mg Qrct}}{\text{mL Rxn}} \right) * \frac{\text{Vol Rxn (mL)}}{\text{Vol Ext Rxn (mL)}} * \frac{fd^{-1}}{\text{Rel Ext} \left( \frac{\text{g RF}}{\text{ml sln}} \right)} \quad \text{Ec.2.6}$$

Donde: FvT: concentración de flavonoides totales  $\left( \frac{\text{mg quercetina}}{\text{g tejido}} \right)$

Y= absorbancia

X= concentración (mg quercetina /mL de reacción)

Vol. Rxn= volumen final de la reacción (mL)

Vol. Ext Rxn = volumen del extracto en la reacción (mL)

fd = factor de dilución (mL de extracto /mL de dilución)

Rel Ext = relación de extracción (g de RF/mL de solución extractante)

### 2.4.3. Perfil de compuestos fenólicos

El uso de la cromatografía líquida de alta eficiencia (del inglés: HPLC) para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos ha sido ampliamente utilizado por su versatilidad y eficiencia en matrices vegetales, se ha demostrado que la cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa (RP-HPLC) junto con el detector de arreglo de diodos UV (DAD) son los métodos más adecuados para dicho propósito (Domínguez-Rodríguez et al., 2017).

### **2.4.3.1. Equipo y software**

Para llevar a cabo el estudio del perfil de compuestos fenólicos se empleó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia LC-20AT con un detector de arreglo de diodos (DAD) y software de control y procesamiento de datos Lab Solutions (Shimadzu Co., Kyoto, Japón). La separación se realizó en una columna de fase reversa híbrida Gemini 5 $\mu$  C18 110Å de 250 x 4,6 mm, unida a un guarda columna (Phenomenex Inc, CA, USA).

### **2.4.3.2. Condiciones cromatográficas**

El análisis de los compuestos fenólicos se realizó de acuerdo con lo descrito por Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann, (2010). La separación se realizó utilizando un sistema de solvente de gradiente lineal que consiste en 1% de ácido fórmico, fase (A) y acetonitrilo, fase (B) de la siguiente manera: 90– 75% de (A) durante 30 min; seguido de 75–40% de (A) de 30 a 45 min a una caudal de 1 mL/min a 25°C. Se esperaron 5 min entre muestras para volver el gradiente a las condiciones iniciales. Cada uno de los extractos obtenidos según lo planteado en las Figuras 2.2 y 2.3 (alrededor de 2 mL) fueron filtrados a través de un filtro de 0,45  $\mu$ m (Gamafil, Buenos Aires, Argentina) y se mantuvieron a 4°C y protegidos de la luz hasta su análisis.

### **2.4.3.3. Identificación de los compuestos fenólicos**

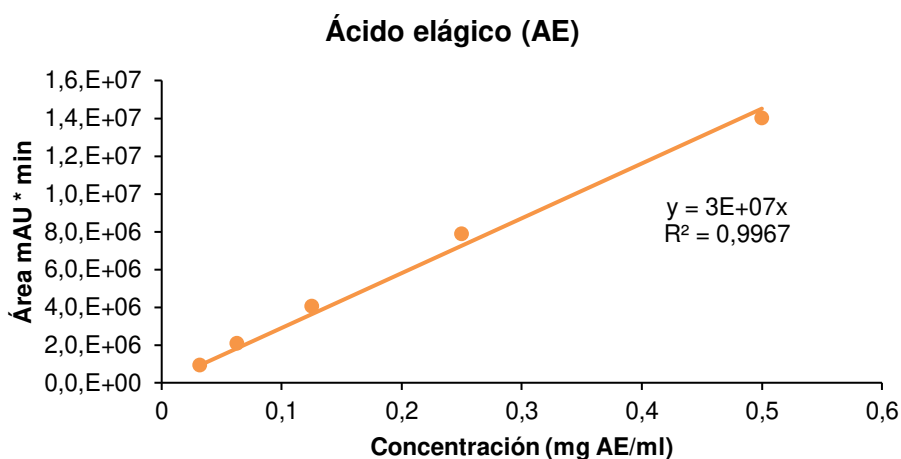
La identificación de los compuestos fenólicos se realizó mediante los tiempos de retención y espectros de absorción UV-Vis en relación a compuestos fenólicos estándares comunes en frutilla y/o sus residuos, como así también a través de información previa obtenida por espectrometría de masas (Van de Velde et al., 2016, 2019a,b) y/o mediante bibliografía pertinente (Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann, 2010; Simirgiotis et al., 2009).

### **2.4.3.4. Cuantificación de los compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos identificados se cuantificaron mediante el uso de patrones externos, utilizando curvas de calibrado de: ácido elágico (AE) (0.03-0.50 mg/mL, R<sup>2</sup> 0.9916), kaempferol-3-O-glucósido (K3G) (0.06-0.50 mg/mL, R<sup>2</sup> 0.9972) y quercetina-3-O-glucósido (Q3G) (0.06-1.00 mg/mL, R<sup>2</sup> 0.9979). Los cuales se obtuvieron de Sigma-Aldrich

Inc. (St. Louis, Misuri, EE. UU.). Dichas soluciones, estables por 2 meses, se filtraron a través de membranas de 0.45  $\mu\text{m}$ , se protegieron de la luz y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Las áreas integradas de los picos obtenidos (mAU \* min) de los compuestos fenólicos estándares se graficaron en función de sus concentraciones (Figuras 2.7, 2.8, y 2.9). A partir de cada regresión lineal se obtuvieron las ecuaciones para el cálculo de las concentraciones en los extractos. Los resultados fueron expresados como mg del compuesto fenólico/g RF.



**Figura 2.7,** Curva de calibrado de ácido elágico.

De la curva de calibrado para el ácido elágico obtenemos las siguientes ecuaciones:

$$Y = 3E + 07x \quad \text{Ec.2.7}$$

$$X = \frac{Y}{3E+07x} \quad \text{Ec.2.8}$$

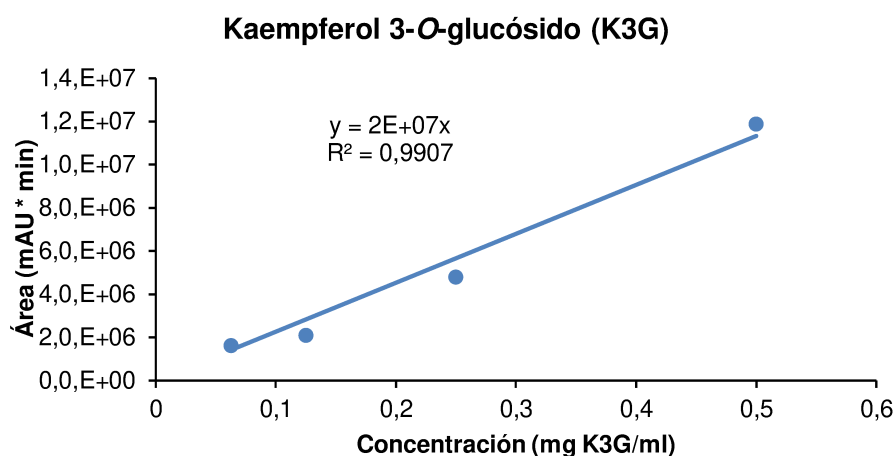
$$AE \left( \frac{\text{mg AE}}{\text{g RF}} \right) = X \left( \frac{\text{mg AE}}{\text{mL}} \right) * \frac{1}{\text{Rel Ext} \left( \frac{\text{g RF}}{\text{mL sln}} \right)} \quad \text{Ec.2.9}$$

Donde: AE: concentración de ácido elágico  $\left( \frac{\text{mg AE}}{\text{g RF}} \right)$

Y= área (mAU \* min)

X= concentración (mg ácido elágico /mL)

Rel Ext = relación de extracción (g de RF/mL de solución extractante)



**Figura 2.8.** Curva de calibrado para kaempferol-3-O-glucósido.

De la integración del área de los picos obtenidos por la concentración del estándar kaempferol-3-O-glucósido, obtenemos la curva de calibrado para el Kaempferol 3-O-glucósido (K3G) de la cual se plantean las siguientes ecuaciones:

$$Y = 2E + 07x \quad \text{Ec.2.10}$$

$$X = \frac{Y}{2E+07x} \quad \text{Ec.2.11}$$

$$K3G \left( \frac{mg \text{ K3G}}{g \text{ RF}} \right) = X \left( \frac{mg \text{ K3G}}{mL} \right) * \frac{1}{Rel \text{ Ext} \left( \frac{g \text{ RF}}{ml \text{ sln}} \right)} \quad \text{Ec.2.12}$$

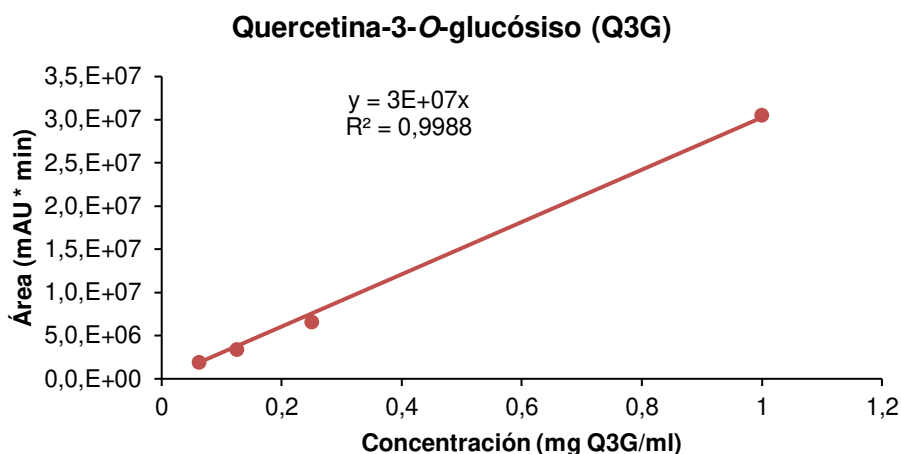
Donde: K3G: concentración de Kaempferol-3-O-glucósido  $\left( \frac{mg \text{ K3G}}{g \text{ RF}} \right)$

Y= área (mAU \* min)

X= concentración (mg kaempferol-3-O-glucósido /mL)

Rel Ext = relación de extracción (g de RF/mL de solución extractante)





**Figura 2.9.** Curva de calibrado para quercetina-3-O-glucosido.

De la integración del área de los picos obtenidos por la concentración del estándar quercetina 3-O-glucósido, obtenemos la curva de calibrado para el Quercetina-3-O-glucósido (Q3G) de la cual se plantean las siguientes ecuaciones:

$$Y = 3E + 07x \quad \text{Ec.2.13}$$

$$X = \frac{Y}{3E+07x} \quad \text{Ec.2.14}$$

$$Q3G\left(\frac{mg\ Q3G}{g\ RF}\right) = X\left(\frac{mg\ Q3G}{mL}\right) * \frac{1}{Rel\ Ext\left(\frac{g\ RF}{ml\ sln}\right)} \quad \text{Ec.2.15}$$

Donde: Q3G: Concentración de quercetina-3-O-glucosido  $\left(\frac{mg\ Q3G}{g\ RF}\right)$

Y= área (mAU \* min)

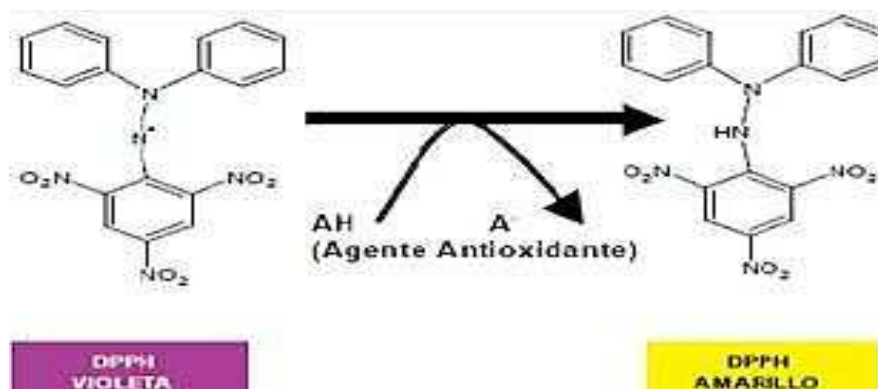
X= concentración (mg quercetina-3-O-glucósido /mL)

Rel Ext = Relación de extracción (g de RF/mL de solución extractante)

#### 2.4.4. Capacidad antioxidante mediante el método del radical DPPH\*

La determinación de la capacidad antioxidante mediante el método del radical DPPH\* se realizó con el procedimiento descrito por Teow et al. (2007) con algunas modificaciones.

La absorbancia característica de este radical DPPH\*, que posee un color violeta intenso, disminuye en presencia de un antioxidante u otro radical (R\*) (Figura 2.10). De esta forma, se puede cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que poseen determinados compuestos mediante la determinación del grado de decoloración (reducción de la absorbancia a 515 nm), que provocan a una disolución metanólica de DPPH\* (Brand-Williams et al., 1995).

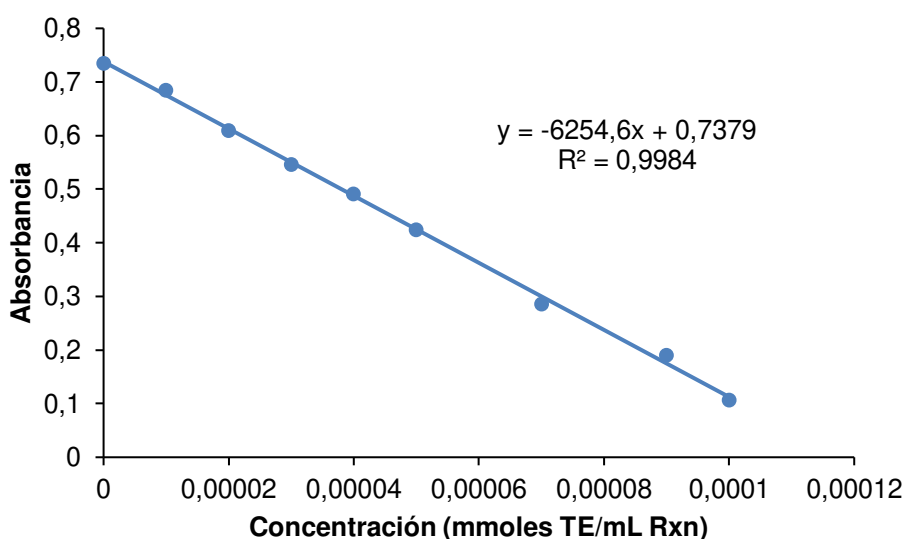


**Figura 2.10.** Reacción química entre el radical DPPH\* y la especie antioxidante. Fuente: (La Rosa Toro et al., 2011).

La actividad antirradicalaria de los extractos se cuantificó por triplicado, mediante la medida de la disminución de la absorbancia de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH\*) (Sigma-Aldrich). Inicialmente, con el fin de conocer el punto final de la reacción, se hizo reaccionar 0,1 mL de cada extracto, diluido de acuerdo con lo indicado en el inciso 2.4.1, con 3,9 mL de solución metanólica de DPPH\* (0,08 mM). La absorbancia se leyó cada min a 515 nm durante 180 min. En estas condiciones, se observó la disminución de la absorbancia alcanzado un valor constante dentro del período de reacción (120 min), lo que indica que la reacción había llegado a su fin; por lo tanto, ese fue el tiempo usado para todas las mediciones.

Para la curva de calibrado se usó el antioxidante 2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma-Aldrich), preparando una solución madre de 1 mM de Trolox en metanol, a partir de la cual se obtuvieron soluciones metanólicas con las siguientes concentraciones: 0-0,1-0,2-0,3-0,4-0,5-0,6-0,7-0,8-0,9 y 1 mM. Se hizo reaccionar 100  $\mu$ L de cada solución de Trolox de concentración conocida con 3,9 mL de solución metanólica de DPPH\* (0,08 mM) durante 2 horas en oscuridad, y se midió la absorbancia a 517 nm. A partir de la regresión lineal de los datos de absorbancia y la concentración de las soluciones de Trolox, se obtuvo la ecuación de la curva de calibrado (Figura 2.11; Ec. 2.16 y 2.17).

Para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos diluidos (inciso 2.4.1) se hicieron reaccionar en oscuridad 40  $\mu\text{L}$  de cada extracto con 3,9 mL de solución metanólica de DPPH\* (0,08mM) y completando el volumen final de reacción (4 mL) con 60  $\mu\text{L}$  de metanol. Después de 2 horas de reacción se midió la absorbancia a 515 nm y se determinó la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC), de acuerdo con la ecuación 2.18.



**Figura 2.11.** Curva de calibrado con Trolox.

Para el cálculo de la capacidad antioxidante  $CA_{\text{DPPH}}$  se usaron las ecuaciones 2.16, 2.17 y 2.18:

$$Y = -6254,6 * X + 0,7376 \quad \text{Ec. 2.16}$$

$$X = \frac{Y-0,7376}{-6254,6} \quad \text{Ec. 2.17}$$

$$TEAC \left[ \frac{\text{mmol TE}}{\text{g de RF}} \right] = X \left( \frac{\text{mmol TE}}{\text{mL Rxn}} \right) * \frac{\text{Vol Rxn (mL)}}{\text{Vol Ext Rxn (mL)}} * \frac{fd^{-1}}{\text{Rel Ext} \left( \frac{\text{g RF}}{\text{mL sin}} \right)} \quad \text{Ec. 2.18}$$

Donde: TEAC: capacidad antioxidante equivalente al Trolox  $\left[ \frac{\text{mmol TE}}{\text{g de RF}} \right]$

Y= absorbancia

X= concentración (mmol TE /mL de reacción)

Vol. Rxn= volumen final de la reacción (mL)

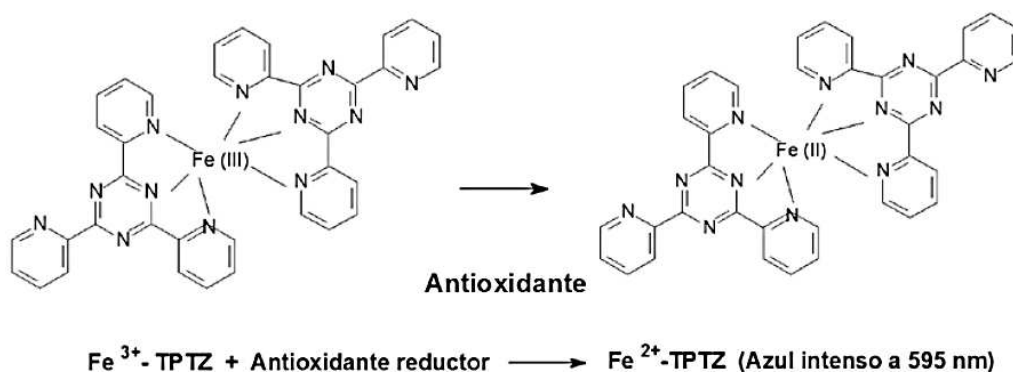
Vol. Ext Rxn = volumen del extracto en la reacción (mL)

fd= factor de dilución (mL de extracto/mL de solución)

Rel Ext = relación de extracción (g de RF/mL de solución extractante)

#### 2.4.5. Capacidad antioxidante mediante el método del poder antioxidante de reducción del hierro (FRAP)

El ensayo FRAP determina la capacidad reductora del hierro de las muestras obtenidas. El complejo de tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) pasa a ferroso tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) por acción de un agente reductor a bajo pH. El  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ tiene un color azul cuya intensidad está en relación directa con la capacidad reductora de la muestra analizada y se puede determinar a 593 nm (Benzie y Strain, 1996).



**Figura 2.12.** Reacción de reducción del hierro (FRAP). Fuente: (Gil et al., 2012).

El reactivo FRAP (pH: 3,6) se preparó diariamente con 25 mL de buffer acetato (300 mM) 2,5 mL de 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ) (Sigma-Aldrich) (10 mM) y 2,5 mL de cloruro férrico (20 mM).

Para determinar la curva de calibrado, se prepararon soluciones de sulfato de hierro  $\text{FeSO}_4$  entre 0,1-1 mM. Cada solución de  $\text{FeSO}_4$  (90  $\mu\text{L}$ ) se hizo reaccionar con 900  $\mu\text{L}$  del reactivo del FRAP y 90  $\mu\text{L}$  de agua, se mantuvo a 37°C por 1 hora, midiendo finalmente la absorbancia a 593 nm. El blanco de reacción se preparó en iguales condiciones reemplazando el volumen de muestra por agua.

Para la determinación de la capacidad antioxidante por FRAP, los extractos obtenidos se debieron diluir en 1:25 para los obtenidos en la extracción en 1 etapa y el segundo sobrenadante de la extracción en 2 etapas y en 1:50 para el primer sobrenadante de la extracción en 2 etapas.

La reacción se realizó en un tubo *ependorf* de 2,5 mL, colocando 45  $\mu\text{L}$  de extracto diluido más 135  $\mu\text{L}$  de agua destilada más 900  $\mu\text{L}$  de FRAP, se dejaron en estufa a 37°C por 1 hora y se midió luego la absorbancia a 593 nm. Los resultados (FRAP) se expresaron en mmoles de  $\text{Fe}^{2+}/\text{g}$  de tejido vegetal (Figura 2.13, Ec. 2.19, 2.20 y 2.21).

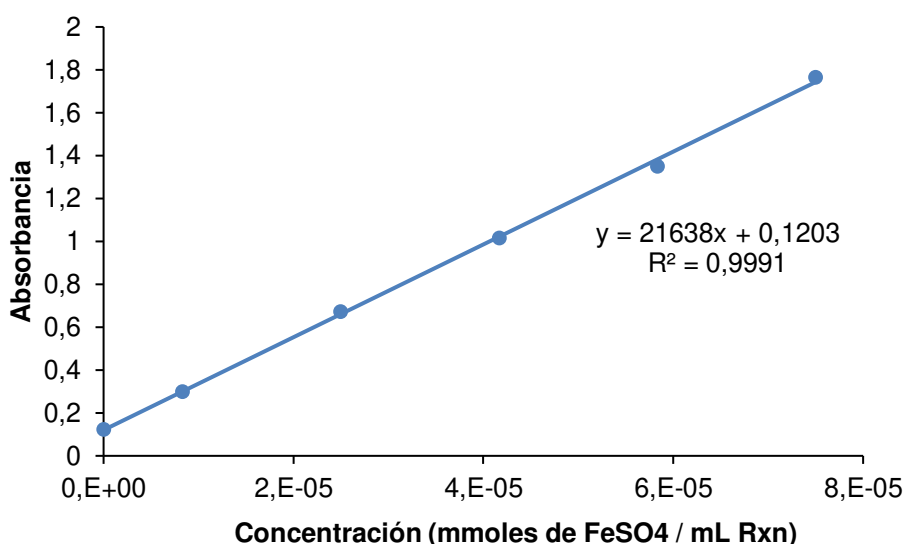


Figura 2. 13 Curva de calibrado FeSO<sub>4</sub>.

Para el cálculo de la capacidad antioxidante por FRAP se usaron las ecuaciones 2.19, 2.20 y 2.21:

$$Y = 21638 * X + 0,1203 \quad \text{Ec. 2.19}$$

$$X = \frac{Y - 0,1203}{21638} \quad \text{Ec. 2.20}$$

$$\text{FRAP (mmoles Fe}^{2+} / \text{g RF)} = X \left( \frac{\text{mmol FeSO}_4}{\text{mL Rxn}} \right) * \frac{\text{Vol Rxn (mL)}}{\text{Vol Ext Rxn (mL)}} * \frac{fd^{-1}}{\text{Rel Ext} \left( \frac{\text{g RF}}{\text{mL sn}} \right)} * \frac{55,8 \text{ g mol de Fe}^{2+}}{278,02 \text{ g mol de FeSO}_4} \quad \text{Ec. 2.21}$$

Donde: FRAP: capacidad antioxidante en mmoles de  $\text{Fe}^{2+}/\text{g}$  de RF

Y= absorbancia

X= concentración (mmol  $\text{FeSO}_4$  /mL de reacción)

Vol. Rxn= volumen final de la reacción (mL)

Vol. Ext Rxn = volumen del extracto en la reacción (mL)

fd= factor de dilución (mL de extracto /mL de solución)

Rel Ext = relación de extracción (g de RF/mL de solución extractante)

### 2.4.6. Actividad antibacteriana

Para la determinación de la actividad antibacteriana se empleó el método de difusión en pozo, cuya técnica está basada originalmente por lo planteado por el investigador Bauer (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de los EE. UU) (Gooch, 2011). El fundamento de esta medición es conocer, en forma cuantitativa, el efecto de una o varias sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos (Bonnet et al., 2017) Básicamente el método busca la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Hacek et al., 1999; Ramirez y Marin Castaño, 2009).

Para el ensayo se emplearon los extractos acuosos del tejido residual de frutilla obtenidos mediante el procedimiento descrito en la Figura 2.2. Las cepas empleadas fueron: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Newport* y *Staphylococcus aureus* de la colección del Área de Microbiología del Instituto de Tecnología de Alimentos ITA (FIQ-UNL), las cuales se sembraron en medio TSA (Tryptona Soja Agar) a una temperatura de incubación de 37°C. En primer lugar, se empezó con la activación de las cepas a ensayar (conservadas a – 70 °C) en caldo Tryptona Soja (TSB) con extracto de levadura al 0,6 % durante 24 h a 37°C. Seguidamente, para cada cepa, se inocularon por duplicado 50 µl de cultivo en 15 mL de agar TSA fundido y termostatzado, obteniéndose concentraciones finales que oscilaron entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> UFC/mL según la cepa. Se homogenizó con vórtex e inmediatamente se volcó en placas estériles, a la cuales, una vez solidificadas, se les realizaron 5 pozos equidistantes. En el pozo del centro se colocaron 50 µl de agua destilada estéril y en los cuatro pozos restantes se colocaron 50 µl del extracto acuoso del tejido residual de frutilla. Finalmente se incubaron las placas a 37°C durante 24 h y se observó la aparición o no de halos de inhibición en torno a los pozos.

### 2.4.7. Ensayo de inhibición de la enzima polifenol oxidasa (PPO) de manzana (*Malus domestica* cv. 'Red Delicious')

La actividad enzimática puede ser medida por la velocidad de formación de productos o desaparición de reactivos, en presencia de una cantidad dada de enzima. En la mayoría de los casos es más ventajoso seguir la formación de productos mediante incrementos finitos que mediante pequeñas reducciones de una concentración inicial (Gil et al., 2012).

### **2.4.7.1. Extracción de la enzima PPO**

Para obtener la PPO libre a partir de pulpa de manzana se debe provocar la ruptura de las vacuolas que ocupan gran parte del volumen de la célula vegetal. Cuando estas se destruyen baja el pH del medio debido a la liberación de proteasas, como consecuencia la enzima se activa. De manera simultánea se liberan los compuestos fenólicos de las vacuolas, los cuales reaccionan con el oxígeno en presencia de la PPO provocando el pardeamiento. Para evitar esto y poder realizar el ensayo de inhibición de la PPO de pulpa de manzana con los extractos acuosos obtenidos de los tejidos de frutilla, se pueden usar agentes reductores tales como el  $\beta$ -mercaptoetanol o polímeros como la polivinilpolipirrolidona (PVPP) que adsorben los compuestos fenólicos (Eraso, 2009). Se debe controlar el pH durante la extracción por medio de soluciones amortiguadoras. Adicionalmente, se usan surfactantes no iónicos como el Tritón X-14 o Tritón-X-100 que provocan la disrupción de la membrana y así provocan la liberación de la PPO.

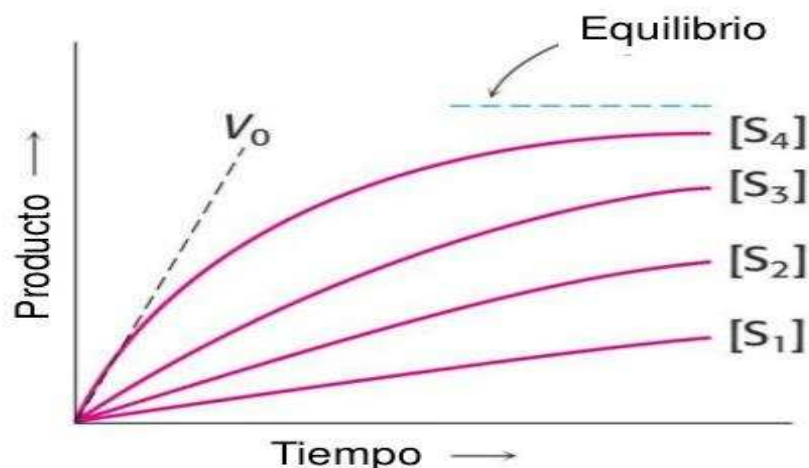
Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, la extracción de la enzima PPO de manzanas (*Malus domestica* cv. 'Red Delicious'), se realizó de acuerdo a lo planteado por Rodríguez-Arzuaga et al. (2019) con algunas modificaciones. Se trituraron 50 g de manzanas peladas y descorazonadas con 100 mL de buffer fosfato (0,1 M; pH 7,0), el cual contenía polivinilpolipirrolidona (PVPP 6.67g/L) y Tritón X-100 (0.045% v/v). El homogenato fue centrifugado durante 20 min a 12.000 *g* y 4°C. El sobrenadante fue recuperado, siendo éste el extracto enzimático utilizado en la determinación de los parámetros cinéticos y ensayos de inhibición. Durante todas las operaciones de extracción, las temperaturas fueron inferiores a 4°C.

### **2.4.7.2. Determinación de la actividad de la enzima PPO**

Para determinar la actividad de la PPO, se midió por triplicado el incremento de la absorbancia en el tiempo a 405 nm de la reacción de PPO con el catecol. A esa longitud de onda se puede observar la aparición del producto de la oxidación del catecol (difenoil usado como sustrato) en distintas concentraciones (5-40 mM). Las mediciones se realizaron en cubetas de policarbonato de 3 mL y 1 cm de camino óptico durante 3 min. Las mezclas de reacción, de volumen final 3 mL, contenían: 1,5 mL de buffer pH 5,5; 0,05 mL de extracto enzimático, solución de catecol en cantidad necesaria para lograr una

concentración entre 5-40 mM y cantidad de agua para completar el volumen total de reacción (3 mL) (Martín, 2011).

Las velocidades iniciales de reacción ( $V_o$ ) se calcularon a partir de las pendientes de las partes lineales de las gráficas de absorbancia en función del tiempo, para cada concentración de sustrato utilizada (Figura 2.14). Los resultados fueron expresados como unidades de actividad PPO (U) por g de manzana fresca (Fang et al., 2007).



**Figura 2.14** Determinación de las velocidades iniciales ( $V_o$ ) de reacción para cada concentración de sustrato [S] utilizada.

Al inicio de la reacción un aumento de la concentración del sustrato produce un aumento rápido de la velocidad de reacción, pero si se sigue aumentando la concentración de sustrato, la velocidad de reacción comienza a aumentar de manera más lenta. A muy altas concentraciones de sustrato, se observa que no cambia la velocidad de reacción y se dice que los centros activos de la enzima se encuentran saturados. La velocidad de reacción que se obtiene a esa alta concentración de sustrato se define como la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de la reacción enzimática. La concentración de sustrato [S], a la semi-velocidad máxima de reacción ( $V_{max}/2$ ) se puede determinar de la Figura 2.15 y representa la constante de Michaelis-Menten o  $K_m$ , la cual es característica de cada enzima. La inversa de esta ( $1/K_m$ ) mide la afinidad de la enzima por el sustrato, entre menor sea mayor será la afinidad de la enzima por el sustrato (Reuveni et al., 2014).

La ecuación de Michaelis y Menten describe cómo varía la velocidad de reacción ( $V$ ) con la concentración de sustrato [S], ecuaciones (2.22 y 2.23).

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ec. 2.22}$$



$$K_m = \frac{K_2 + K_{-1}}{K_{-2}} \quad \text{Ec. 2.23}$$

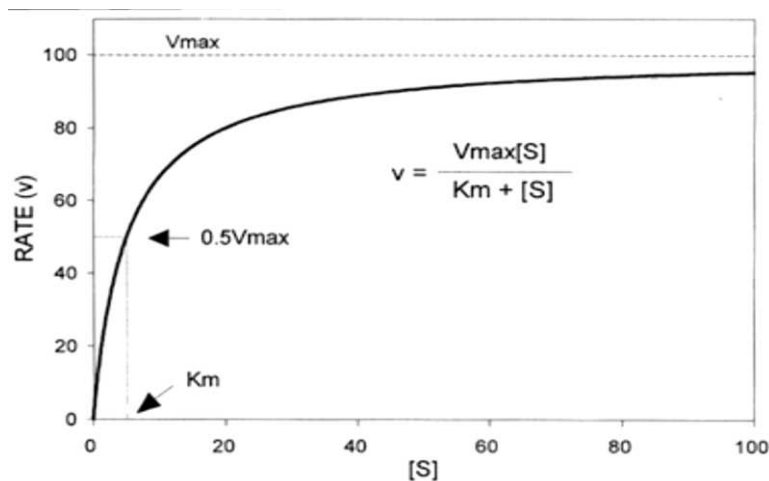
Donde:

$V_o$ : velocidad inicial de la reacción

$V_{\text{máx}}$ : velocidad máxima

$K_m$ : constante de Michaelis y Menten= Ec. 2.23

$[S]$ : concentración de sustrato.



**Figura 2.15.** Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción. Ecuación de Michaelis – Menten. Fuente: Tipton, (1996).

#### 2.4.7.3. Determinación de los parámetros cinéticos de la PPO de manzana

Si se toma la inversa de ambos miembros de las ecuaciones de Michaelis-Menten (Ec. 2.22 y 2.23) tenemos:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}} \quad \text{Ec. 2.24}$$

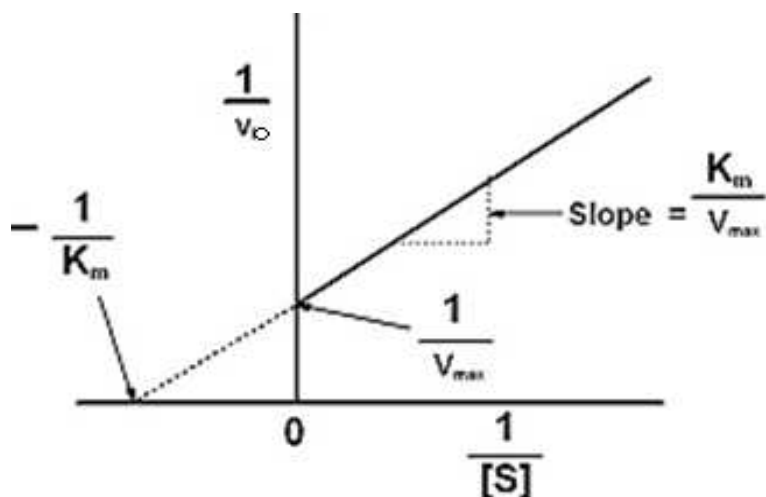
Si graficamos la Ec. 2.24, se puede ver que se obtiene una línea recta, cuya pendiente es

$\frac{K_m}{V_{\text{max}}}$ , que intercepta al eje de las ordenadas en  $\frac{1}{V_{\text{max}}}$  y a la abscisa en el punto  $-\frac{1}{K_m}$ , lo que

es evidente al hacer  $\frac{1}{v} = 0$ , ya que se convierte en  $\frac{1}{S} = -1/K_m$ , a partir del cual se puede

calcular el  $K_m$  (Figura 2.16). Esta representación gráfica (Lineweaver y Burk, 1934) fue la

elegida para la determinación de los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) de la enzima PPO de Manzana 'Red Delicious' (Rotbart et al., 2018).



**Figura 2.16** Gráfica de Lineweaver-Burk o del doble recíproco. Fuente: Macías et al. (2018).

#### 2.4.7.4. Efecto del extracto acuoso del tejido residual de frutilla como inhibidor de la PPO de manzanas 'Red Delicious'

Se analizó el efecto inhibitorio de los extractos acuosos obtenidos en 1 etapa (1:10) no acidificados del tejido vegetal de frutilla, sobre los extractos de PPO de manzana 'Red Delicious'. Además, se comparó la inhibición empleando un antioxidante ampliamente usado en la industria como es el ácido ascórbico. Para ello se determinó el porcentaje, el tipo y la constante de inhibición para ambos inhibidores. Para determinar el porcentaje de inhibición se hizo reaccionar 0,05 mL del extracto enzimático con una cantidad necesaria de catecol para poder llegar a una concentración de 10 mM en el medio de reacción, 1,5 mL de buffer pH 5,5 y 0,25 mL de inhibidor (extracto acuoso de RF de frutilla o ácido ascórbico (AA) en concentraciones de 1-4 mg/mL). Finalmente, se adicionó la cantidad de agua necesaria para llegar a un volumen final de reacción de 3 mL. La mezcla se hizo reaccionar por 5 min a temperatura ambiente. A partir de la medida de absorbancia a 405 nm se determinó la  $V_0$  como la pendiente inicial de la gráfica de absorbancia en función del tiempo.

Para determinar la velocidad inicial de reacción sin presencia del inhibidor ( $V_0$ ) se procedió de igual manera, pero se reemplazó el volumen agregado del extracto vegetal o ácido ascórbico por agua. Las reacciones de inhibición se realizaron por triplicado.

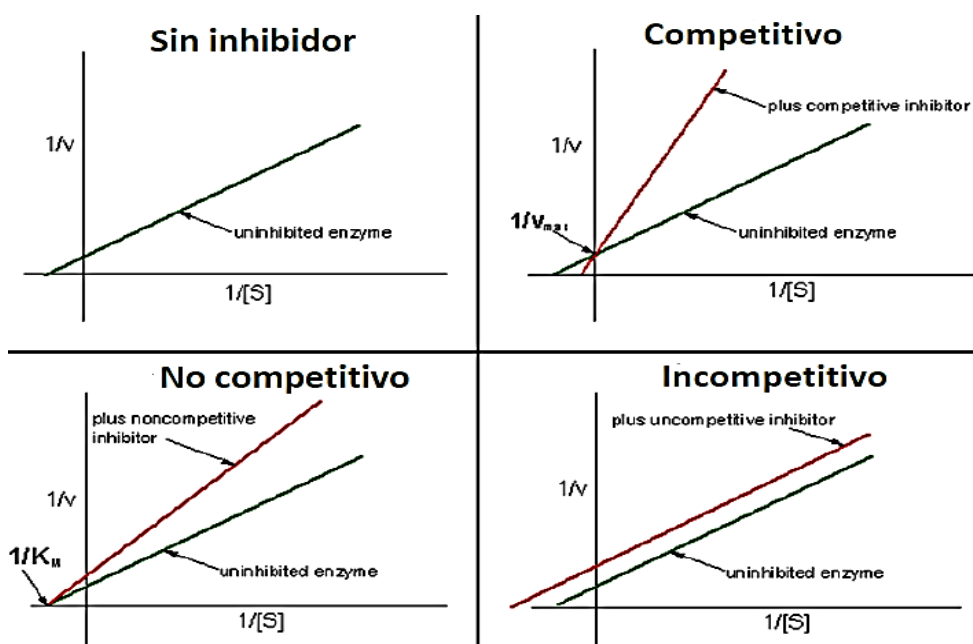
El porcentaje de inhibición (I%) se calculó de acuerdo con la Ec. 2.25:

$$I (\%) = \% \text{ inhibición} = \left(1 - \frac{v_0'}{v_0}\right) * 100 \quad \text{Ec. 2.25}$$

Donde (I) es el porcentaje de inhibición,  $v_0'$  = abs/min es la pendiente de la curva de absorbancia en función del tiempo para la enzima PPO afectada por la presencia del inhibidor en el medio y  $v_0$  es la pendiente sin la presencia del inhibidor.

#### 2.4.7.5. Determinación del tipo de inhibición enzimática

Al graficar la cinética de inhibición se puede clasificar la reacción en función del impacto que se produce sobre la intersección con el eje y ( $1/V_{\max}$ ) y/o sobre la pendiente de la curva ( $K_m/V_{\max}$ ) de la representación de Lineweaver-Burk, comparando con la curva que representa a la cinética de reacción sin la presencia del inhibidor (Motulsky y Christopoulos, 2003) (Figura 2.17).



**Figura 2.17.** Linealización de Lineweaver-Burk para los diferentes tipos de inhibición  
fuente: Rotbart et al. (2018)

En la Figura 2.17 se puede observar que cuando se trata de un *inhibidor competitivo* se ve afectada la pendiente de la curva, comparada con la curva que representa a la cinética en ausencia del inhibidor, generando una familia de curvas que convergen en un mismo punto sobre el eje y ( $1/V_{\max}$ ). El caso de un *inhibidor acompetitivo (incompetitivo)* influye en la

intersección con el eje vertical ( $1/V_{\max}$ ) de la curva, generando una familia de curvas paralelas a la curva de reacción con el eje  $y$  ( $1/V_{\max}$ ). Finalmente, el *inhibidor no competitivo* es un tipo de inhibidor que tiene la capacidad de unirse a la enzima libre y al complejo enzima-sustrato, afectando la pendiente ( $K_m/V_{\max}$ ) de la curva de inhibición, generando una familia de curvas de inhibición que convergen en un punto a la izquierda del eje vertical ( $1/K_m$ ) sobre el eje horizontal ( $1/[S]$ ) de la curva (Macías, A. et al., 2018; Motulsky y Christopoulos, 2003).

Para determinar el tipo de inhibición se hizo reaccionar 0,05 mL de extracto enzimático con una cantidad necesaria de catecol para poder llegar a las concentraciones mencionadas en la reacción, 1,5 mL de buffer pH 5,5, 0,25 mL de inhibidor (extracto acuoso del tejido vegetal de frutilla obtenido en 1 etapa (1:10) no acidificado; o ácido ascórbico (AA), (1-4 mg/mL), adicionando la cantidad de agua necesaria para llegar a un volumen final de reacción de 3 mL. A partir de la medida de absorbancia a 405 nm, durante 5 min, se determinó la  $V_o$ . Además, mediante las ecuaciones matemáticas que describen a cada tipo de inhibidor reversible (Ec. 2.22 y 2.23) se obtuvo la velocidad máxima ( $V_m$ ) de la enzima en presencia del inhibidor y la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ). El desarrollo de estas ecuaciones en presencia del inhibidor, difieren en la pendiente y/o en la intersección en  $1 + [I]/K_i$  (Ec. 2.26 y 2.27), en comparación con las ecuaciones en ausencia del inhibidor (Ec. 2.24) (Gil et al., 2012).

Dependiendo del tipo de inhibición se verán afectadas las ecuaciones en la pendiente o intersección de forma:

$$Pendiente = \frac{K_m}{v_m} * \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad \text{Ec. 2.26}$$

$$Intersección\ con\ el\ eje = \frac{1}{v_m} * \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad \text{Ec. 2.27}$$

Donde:

[I]: es la concentración de inhibidor (mg/mL)

$K_i$ : constante de inhibición

Con lo anterior, se emplearon las ecuaciones 2.28 y 2.29 para el cálculo del  $K_i$  según correspondiera al tipo de inhibidor en este caso el extracto acuoso sin acidificar del residuo de frutilla y el ácido ascórbico. Se tuvo en cuenta el contenido total de fenoles de estos extractos, expresados como mg de ácido gálico equivalente por g de residuo fresco. A partir

de las ecuaciones 2.26 y 2.27 propuestas por Brandt et al., (1987) se calculó la  $K_i$  para los inhibidores empleados en este estudio sobre la actividad de la PPO de la manzana (*Malus domestica* cv. 'Red Delicious').

#### 2.4.7.6. Determinación de la constante de inhibición ( $K_i$ )

La constante de inhibición ( $K_i$ ) indica la potencia que poseen los inhibidores en la reacción enzimática, además de la concentración necesaria para producir la mitad de la inhibición. Mientras menor sea su valor mayor será su efecto inhibitorio (Alvarez-Parrilla *et al.*, 2007).

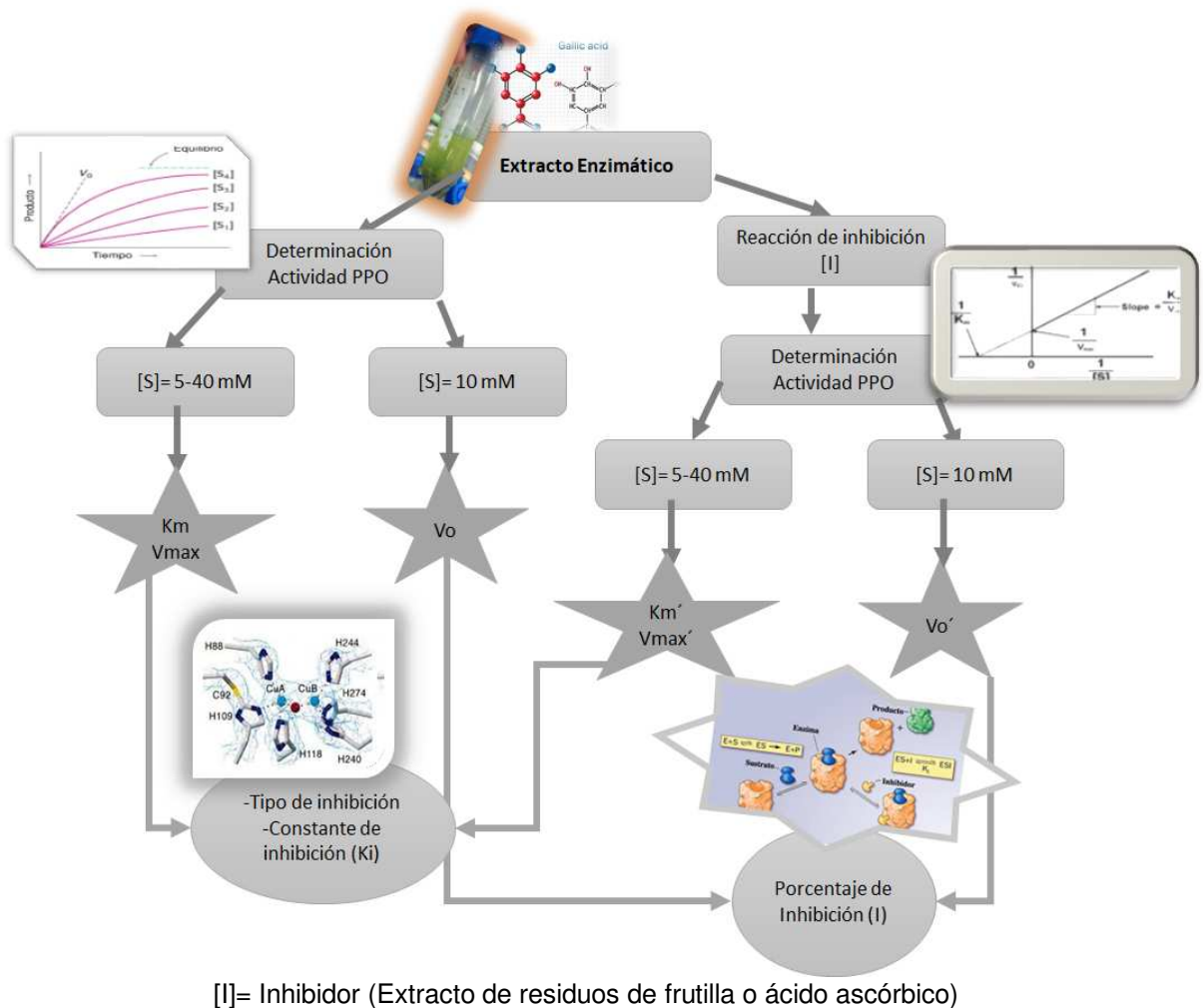
Según el tipo de inhibición la cinética enzimática se verá afectada así mismo su  $K_i$  (Dixon, 1953). Para la inhibición competitiva donde la concentración de sustrato [S] no es igual al  $K_m$ , se calcula la constante de inhibición de acuerdo con la Ec. 2.28:

$$K_i = \frac{I}{2\left(\frac{V_o}{V_i}\right) - 1} \quad \text{Ec. 2.28}$$

Para el tipo de inhibición incompetitiva donde el inhibidor se une al complejo enzima-sustrato la  $K_i$  se calcula de acuerdo con la Ec. 2.29:

$$K_i = \frac{I}{\left(\left(\frac{K_m}{S}\right) + 1\right) \left(\left(\frac{V_o}{V_i}\right) - 1\right)} \quad \text{Ec. 2.29}$$

La Figura 2.18 resume el ensayo de inhibición de la PPO de manzana por el extracto rico en compuestos fenólicos obtenido a partir de la extracción acuosa en una etapa no ácida del residuo de frutillas, o por la acción del ácido ascórbico.



**Figura 2.18.** Esquema del ensayo de inhibición de la PPO de manzana 'Red Delicious'.

## 2.5. Análisis Estadístico

El efecto del tipo de solvente, del número de etapas de extracción y de la presencia de ácido fórmico en la solución extractante sobre el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante se determinó a través de un análisis de varianza (ANOVA). La prueba de rangos múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95% se utilizó para determinar diferencias significativas entre las medias. Los análisis estadísticos y correlaciones lineales se realizaron con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión XV 15.02.06 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, EE. UU.).

Adicionalmente, para un mayor análisis de los datos se plantea el estudio de las posibles relaciones entre las distintas variables respuesta, para ello, se hizo un estudio de correlación de Pearson el cual nos brinda un indicio de si existe una relación lineal entre 2 variables. De dicho análisis surge un coeficiente de correlación el cual mide la solidez de

la relación lineal existente entre dos variables aplicando una escala de  $-1$  a  $+1$ . Cuanto más alto sea el valor absoluto de la correlación, indica que la relación lineal es mucho más fuerte entre las dos variables analizadas, el signo refleja sólo el sentido, es decir si la correlación es positiva o negativa (Draper y Smith, 2014). Obtenido el coeficiente se le realizó un t-test de “*student*” el cual nos indica la significancia del coeficiente en el espacio muestral.

# 3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Efecto de las variables de extracción sobre el contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de los extractos

El tejido vegetal obtenido como descarte del acondicionamiento industrial de frutillas variedad 'Festival' (RF) presentó una humedad promedio de  $89,2 \pm 0,07$  %, lo cual nos indica que es un producto muy susceptible al ataque microbiano y a la descomposición por su alto contenido de humedad, por ello, es vital generar opciones para su aprovechamiento y una disposición sustentable.

Teniendo en cuenta el principio fundamental de la solubilidad, los distintos metabolitos secundarios de las plantas varían su polaridad según su estructura química y la matriz donde se encuentren, con lo cual, se debe elegir adecuadamente los solventes de extracción (Waszkowiak et al., 2015). Sin embargo, no existe un único solvente que vaya a garantizar la total extracción de los compuestos fenólicos. Por ende, se vienen empleando mezclas de cosolventes como las soluciones hidroalcohólicas para obtener una mayor selectividad y rendimiento (Fernández-Agulló et al., 2013; Martínez-Ramos et al., 2020). Por lo cual, se presentan en la Tabla 3.1 las propiedades solvatocrómicas de las mezclas de solventes empleadas en esta tesis:

**Tabla 3.1.** Propiedades solvatocrómicas de las mezclas de solventes extractantes utilizados

Solvente extractante (St)	C <sub>AF</sub> (%)	pH	$E^N_T$	$f_2/f_1$	$\eta$
<b>A</b>	0,0	6,38	1,00 <sup>a</sup>	-	0,89 <sup>c</sup>
	0,5	2,40			
<b>EtOH-A</b>	0,0	6,67	0,69 <sup>a</sup>	0,26 <sup>b</sup>	1,90 <sup>c</sup>
	0,5	3,82			
<b>MetOH-A</b>	0,0	6,78	0,79 <sup>a</sup>	0,15 <sup>b</sup>	1,005 <sup>d</sup>
	0,5	3,77			
<b>AC-A</b>	0,0	7,68	0,65 <sup>b</sup>	3,75 <sup>b</sup>	0,636 <sup>e</sup>
	0,5	3,65			

$E^N_T$ : Parámetro solvatocrómico de Reichard;  $f_2/f_1$ : Parámetro de solvatación preferencial;  $\eta$ : Viscosidad a 25°C en (Cp); C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico.

<sup>a</sup>Krygowki et al, 1985; <sup>b</sup>(Bosch, E., & Rosés, M. (1992); <sup>c</sup>(Perez et al, 2010);

<sup>d</sup>(Mikhail,1961);<sup>e</sup>(Howard & McAllister, 1958)

A través del análisis de la varianza multifactorial se determinó el efecto de cada variable de extracción estudiada sobre el contenido de fenoles totales (FT), flavonoides totales (FvT) y capacidad antioxidante ( $CA_{DPPH}$  y  $CA_{FRAP}$ ) de la extracción del residuo vegetal de la industrialización de frutilla (Tabla 3.2).

**Tabla 3. 2** Análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial.

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados			
		FT	FvT	$CA_{DPPH}$	$CA_{FRAP}$
St	3	191,22***	4,94***	0,019***	0,009***
$C_{AF}$	1	35,86***	0,87***	0,0018***	0,001***
EE	1	135,54***	0,80***	0,010***	0,008***
St* $C_{AF}$	3	7,56***	0,20***	0,0011***	0,0005***
St*EE	3	5,90***	0,05***	0,002***	0,0003***
$C_{AF}$ *EE	1	0,04	0,67***	0,0006***	0,000003
St* $C_{AF}$ *EE	3	6,48***	0,41***	0,0006*	0,00009
Residuos	48	7,91	0,076	0,002	0,0005
Total (corregido)	63	390,53	8,02	0,038	0,021

G.L: grados de libertad; FT: Fenoles totales, FvT: Flavonoides totales,  $CA_{DPPH}$ : Actividad antioxidante por DPPH,  $CA_{FRAP}$ : Actividad antioxidante por FRAP. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

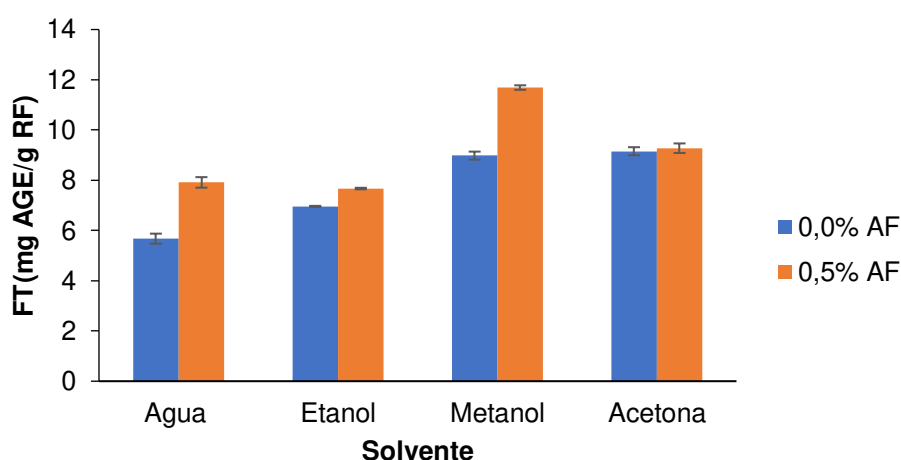
Las tres variables de extracción establecidas, el tipo de disolvente (St), la concentración de ácido fórmico ( $C_{AF}$ ) y el número de etapas de extracción (EE) afectaron ( $p \leq 0.001$ ) el contenido de compuestos fenólicos totales (FT), flavonoides totales (FvT) y la capacidad antioxidante ( $CA_{DPPH}$  y  $CA_{FRAP}$ ) (Tabla 3.2). Como puede verse, las interacciones de St. $C_{AF}$  y St.EE también resultaron altamente significativas para todas las respuestas evaluadas. Además, la interacción de  $C_{AF}$ .EE solo fue significativa ( $p \leq 0.001$ ) para FvT y  $CA_{DPPH}$ , y la interacción de St. $C_{AF}$ .EE solo fue significativa para los contenidos de FT y FvT ( $p \leq 0.001$ ) y para  $CA_{DPPH}$  ( $p \leq 0,05$ ).

Como la mayoría de los términos de interacción resultaron estadísticamente significativos, no sería prudente generalizar acerca de los factores individuales ya que los efectos sobre las variables dependientes serían interdependientes. Sin embargo, los cuadrados medios para los factores individuales resultaron mayores que los calculados para los términos de

interacción (Tabla 3.2), lo que sugiere que los factores individuales fueron dominantes (Ellison et al., 2009).

### 3.2. Contenido de fenoles totales de los extractos del residuo vegetal de la industrialización de frutilla

Tal como es reportado en la bibliografía, las diferentes características de los solventes utilizados y las condiciones de extracción van a repercutir de manera directa o indirecta en la eficiencia de extracción (Adjé et al., 2010; Predrag Putnik et al., 2016; Şahin et al., 2013). En el presente trabajo se emplearon mezclas de solventes próticos polares, los cuales son donantes de puentes de hidrogeno (HBD por su siglas en inglés) contenidos principalmente en sus grupos hidroxilos (agua, etanol y metanol) y son capaces de formar puente hidrógeno (Reichardt y Welton, 2010a) y un solvente aprótico polar, el cual posee un dipolo debido al enlace polar del grupo carbonilo, pero que no puede ceder puentes de hidrogeno (acetona). Bajo estas condiciones en las Figuras 3.1 y 3.2 y en las Tablas 3.3, 3.4 y 3.5 se presentan los rendimientos de extracción de FT obtenidos de acuerdo con los diferentes sistemas de extracción ensayados.



**Figura 3.1.** Contenido de fenoles totales (FT) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla para la extracción en una etapa.

Para las extracciones en 1 etapa (relación de extracción 1:10 p/v) (Figura 3.1 y Tabla 3.3), sin la presencia de ácido fórmico ( $C_{AF}=0$ ), la mayor cantidad de fenoles totales se obtuvieron en las extracciones con las soluciones de metanol 80% (FT: 8,98 mg AGE/g RF) y de acetona 80% (FT: 9,15 mg AGE/g RF), no habiendo diferencias significativas entre ellos. Los rendimientos destacados de las soluciones de MetOH-A y AC-A se podrían atribuir en parte a la baja viscosidad (1,00 y 0,636 Cp) respectivamente, lo cual favorece el proceso de extracción con ultrasonido, ya que la absorción de las ondas de ultrasonido

depende de la densidad y viscosidad del medio, facilitando así el fenómeno de cavitación por parte de las mezclas de metanol y acetona 80% (Lupacchini et al., 2017; Martínez-Ramos et al., 2020; Mercado Mercado et al., 2018), lo cual les otorga una gran difusividad, facilitando la extracción de compuestos bioactivos (Wijekoon et al., 2011). En estas condiciones, la extracción con agua obtuvo el rendimiento más bajo (Tabla 3.3 y Figura 3.1).

La adición de 0,5% de ácido fórmico aumentó el contenido de fenoles totales entre 10 y 39% en 3 de los extractos estudiados, en comparación con los mismos extractos sin ácido para 3 de los solventes utilizados A, EtOH-A y MetOH-A, los cuales pertenecen a los solvente próticos (Taghizadeh et al., 2018) (Tabla 3.3 y Figura 3.1). Los FT de los extractos de los solventes A y EtOH-A no presentaron diferencias significativas entre sus medias y la extracción con MetOH-A acidificado, arrojó el mejor rendimiento de FT (11,7 mg AGE/g RF) para la extracción en 1 etapa.

**Tabla 3. 3** Contenido de fenoles totales (FT) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla para la extracción en una etapa.

St	FT (mgAGE/g RF)	
	C <sub>AF</sub> (%)	
	0,0	0,5
A	5,68 ± 0,20 aA	7,91 ± 0,21 aB
EtOH-A	6,96 ± 0,02 bA	7,67 ± 0,03 aB
MetOH-A	8,98 ± 0,16 cA	11,69 ± 0,09 cB
AC-A	9,16 ± 0,16 cA	9,28 ± 0,19 bA

St: solvente; C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre solventes de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey (p≤0.05).

En cuanto al efecto del número de etapas de extracción, la extracción con MetOH-A en 2 etapas (relación de extracción en cada una de las etapas = 1:5 p/v), sin ácido, presentó el mayor rendimiento de FT (12,8 mg AGE/g RF) entre todas las muestras extraídas con soluciones sin acidificar (Figura 3.3 y Tabla 3.5). Este rendimiento resultó 1,4 veces mayor al contenido de FT obtenido con metanol en una sola etapa (Tabla 3.3 y 3.5). Por lo tanto, la extracción en dos etapas produjo mayores rendimientos de compuestos fenólicos que la extracción en una sola etapa con el mismo volumen de solvente.

Analizando el efecto de las etapas de extracción, se determinó que la extracción de FT con EtOH-A en una sola etapa sin ácido (relación de extracción 1:10) obtuvo un rendimiento de extracción de 6,9 mg AGE/g RF, mayor que el rendimiento obtenido en la primera etapa (relación de extracción 1:5) de la extracción en 2 etapas (5,8 mg AGE/ g RF), en donde la difusión posiblemente se detenga por el fenómeno de saturación donde el gradiente de solvente y de soluto llegan al equilibrio (Castro-López et al., 2017). Luego, en la segunda etapa de extracción, el rendimiento de FT fue igual a 3.61 mg AGE/g RF, y el total para la extracción en 2 etapas arrojó un rendimiento de FT de 9.42 mg AGE/g RF (Tabla 3.4 y Figura 3.2) superior en 35,3% al obtenido en la extracción con 1 sola etapa.

La mayor eficiencia de extracción obtenida en la extracción en 2 etapas, pero manteniendo la misma relación final de extracción, probablemente se deba a una liberación secuencial de compuestos fenólicos desde la matriz al solvente en las sucesivas etapas de extracción y al gradiente de concentración, la fuerza impulsora que domina este fenómeno de extracción (Azmir et al., 2013; Xi et al., 2009). Sin embargo, este fenómeno dependería del material vegetal estudiado y del solvente utilizado en el proceso de extracción. Michiels et al. (2012) reportaron un mayor contenido de fenoles totales para manzana, brócoli y puerro con extracciones en una sola etapa, pero mejores rendimientos en extracciones en dos etapas sucesivas para naranjas.

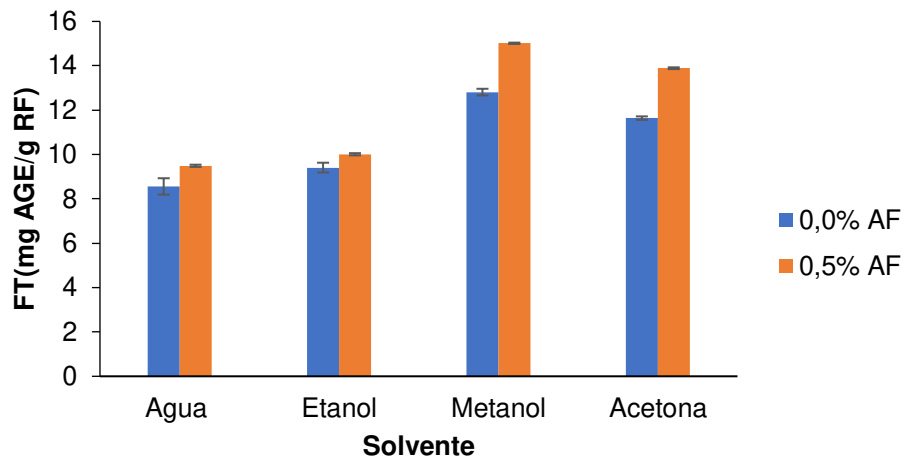
Si bien, cabe resaltar que la distribución y composición de los fitoquímicos en las plantas, así como las características morfológicas y fisiológicas de las mismas pueden favorecer la extracción de estos compuestos (Verma y Shukla, 2015). Tal es el caso del anís y otras plantas que tienen en su morfología ductos secretores, los cuales favorecen la extracción de compuestos a bajas relaciones sólido-solvente (Torres-Aguirre et al., 2018).

Con la adición de ácido fórmico ( $C_{AF} = 0.5\%$ ), la extracción de FT en dos etapas con metanol presentó el mejor rendimiento (FT = 15 mg AGE/g RF), siendo este resultado 1,2 veces superior al contenido de fenoles totales obtenido en las mismas condiciones sin ácido. Este comportamiento se puede explicar debido a que los compuestos fenólicos son más estables a valores de pH bajos y por ende estas condiciones facilitan su extracción (Rajbhar et al., 2015). De manera similar, Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann (2010) informaron un contenido de fenoles totales de 20 mg/g en hojas de frutillas extraídas con metanol-ácido fórmico (99: 1, v/v) durante 1 hora en tres etapas.

**Tabla 3.4.** Contenido de fenoles totales (FT) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla para la extracción en dos etapas.

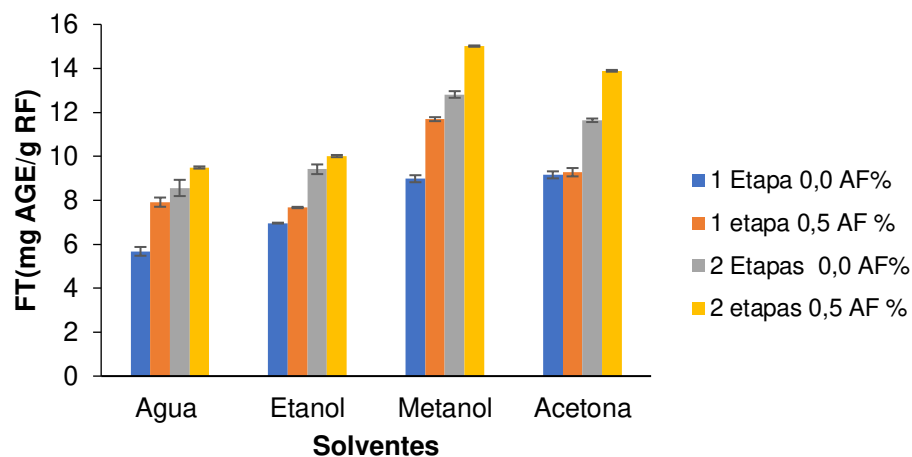
St	N° Etapa	FT (mgAGE/g RF)	
		C <sub>AF</sub> (%)	
		0	0,5
<b>A</b>	1 <sup>era</sup>	5,48 ± 0,34A	6,09 ± 0,25A
	2 <sup>da</sup>	3,08 ± 0,04A	3,40 ± 0,07B
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	8,56 ± 0,37aA	9,49± 0,05 aA
<b>EtOH-A</b>	1 <sup>era</sup>	5,81 ± 0,13A	6,25 ± 0,03B
	2 <sup>da</sup>	3,61 ± 0,10A	3,76 ± 0,02A
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	9,42 ± 0,22bA	10,01 ± 0,05 aA
<b>MetOH-A</b>	1 <sup>era</sup>	9,08 ± 0,08A	10,46 ± 0,14B
	2 <sup>da</sup>	3,74 ± 0,07A	4,56 ± 0,15B
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	12,81 ± 0,15dA	15,01 ± 0,03cB
<b>AC-A</b>	1 <sup>era</sup>	7,34 ± 0,08A	9,62 ± 0,08B
	2 <sup>da</sup>	4,30 ± 0,001A	4,27 ± 0,12A
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	11,64± 0,08cA	13,89 ± 0,04bB

St: solvente; C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre solventes de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey (p≤0.05)



**Figura 3.2.** Contenido de fenoles totales (FT) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla para la extracción en 2 etapas.

Según Kapasakalidis et al. (2006) la extracción de materiales vegetales con metanol acidificado es el método más eficiente para extraer compuestos fenólicos. Las propiedades microscópicas de las soluciones de metanol 80% indicaron una solvatación preferencial por el metanol, teniendo probablemente gran presencia de moléculas de metanol en la esfera de solvatación de los compuestos fenólicos que presentaron buena solubilidad (El Seoud, 2009). De hecho, se reportó que en las extracciones de compuestos fenólicos en pulpa de uva, la extracción con metanol fue 20% más eficiente que con etanol, y 73% más eficiente que con agua (Castañeda-Ovando et al., 2009). Es bien sabido que la polaridad del solvente juega un papel clave en el aumento de la solubilidad de los compuestos fenólicos, lo que a su vez permite su migración desde la matriz al sistema del solvente, aumentando el rendimiento de extracción (Martínez-Ramos et al., 2020). Si bien el agua resulta ser el disolvente más polar de todos, este disolvente no extrajo el mayor contenido de compuestos fenólicos totales en los subproductos de frutilla (Tablas 3.5 y Figura 3.3). Este fenómeno podría atribuirse a la mayor viscosidad del agua en relación a los otros solventes, lo cual influye en la transferencia de masas (Selin Şahin y Şamli, 2013).



**Figura 3.3.** Contenido de fenoles totales (FT) para los diferentes sistemas de extracción.

Sin embargo, el uso mezclas acuosas parece ser importante para la extracción de los compuestos fenólicos, ya que en primer lugar, el agua puede actuar como agente de hinchamiento, permitiendo que el solvente orgánico penetre más completamente en el material vegetal (Fernández-Agulló et al., 2013). Además, sus propiedades solvatocrómicas varían según la composición de la mezcla, generando un espectro más amplio de extracción (El Seoud, 2009), y así, probablemente se logre mayor extracción de compuestos fenólicos que los obtenidos con los solventes puros (Şahin y Şamli, 2013). Considerando que el agua y el etanol son reconocidos como solventes seguros (GRAS) (Fernández-Agulló et al., 2013), las extracciones de los subproductos de frutilla con A o EtOH-A en dos etapas podrían mejorar la eficiencia de extracción de los compuestos fenólicos, ya que bajo esta condición el contenido de FT fue comparable a los obtenidos con MeOH-A y AC-A en 1 etapa sin AF (Tabla 3.5, Figura 3.3), evitando de esta manera, el uso de solventes con restricciones por su toxicidad e impacto ambiental.

El contenido total de compuestos fenólicos en frutilla y las distintas partes de su planta varían según numerosos factores, incluyendo el genotipo, las condiciones ambientales, etapa de maduración y por supuesto el método de extracción y análisis (Gündüz, 2015; Restrepo. D et al., 2010; Wang and HsinShan, 2000). Es de destacar que el tejido vegetal obtenido del procesamiento industrial de frutillas presenta mayores cantidades de compuestos fenólicos que la frutilla, de la cual se han reportado contenidos de FT de 2,1 mg AGE/g fruta para la variedad 'Camino Real' (Pineli et al., 2011), 1,61 mg AGE/g fruta para la variedad 'Camarosa' (Van de Velde et al., 2016), e incluso superior al contenido de compuestos fenólicos reportado para 90 cultivares de frutilla en distintos estados de maduración (0,08-2,08 mg AGE/g fruta) por Nowicka et al., (2019).



**Tabla 3.5.** Contenido de fenoles totales (FT) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla para los diferentes sistemas de extracción.

St	EE	FT (mgAGE/g RF)	
		C <sub>AF</sub> (%)	
		0,0	0,5
A	1	5,68 ± 0,20 aA	7,91 ± 0,21 aB
	2	8,56 ± 0,37 cA	9,49 ± 0,05 bA
EtOH-A	1	6,96 ± 0,02 bA	7,67 ± 0,03 aB
	2	9,42 ± 0,22 dA	10,01 ± 0,05 bA
MetOH-A	1	8,98 ± 0,16 cdA	11,69 ± 0,09 cB
	2	12,81 ± 0,15 fA	15,01 ± 0,03 eB
AC-A	1	9,16 ± 0,16 cdA	9,28 ± 0,19 bA
	2	11,64 ± 0,08 eA	13,89 ± 0,04 dB

St: solvente; EE: N° total de etapas de extracción; C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna, indican diferencias significativas entre sistemas de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

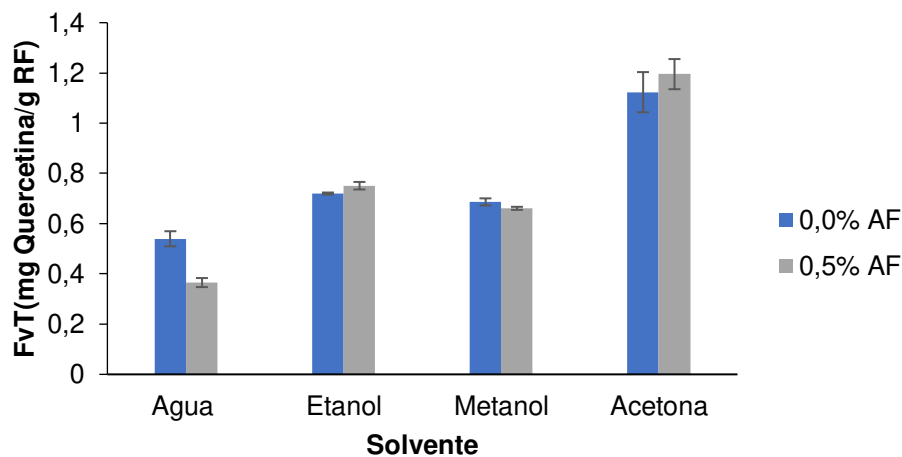
### 3.3. Contenido de flavonoides totales de los extractos del residuo vegetal de la industrialización de frutilla

El contenido de flavonoides totales (FvT) en las extracciones en una etapa con Ac sin ácido registró el mayor rendimiento (1,12 mg quercetina/g RF) respecto a los demás solventes en las mismas condiciones (Figura 3.4 y Tabla 3.6). Según Fan et al. (2015) esto se puede atribuir probablemente al hecho de que la acetona pura tiene una fuerte capacidad de aceptación de enlaces de hidrógeno y puede formar puentes hidrógeno fácilmente con los grupos hidroxilo de los flavonoides. Sin embargo, la solubilidad de los flavonoides podría ser menor en metanol, etanol y/o agua debido a que estos solventes, en su estructura original, además de interactuar con los flavonoides, pueden formar fuertes enlaces de hidrógeno entre sus mismas moléculas. En estos solventes, no solo la donación de enlaces de hidrógeno sino también la capacidad de aceptación de enlaces de hidrógeno son fuertes (Marcus, 1993).

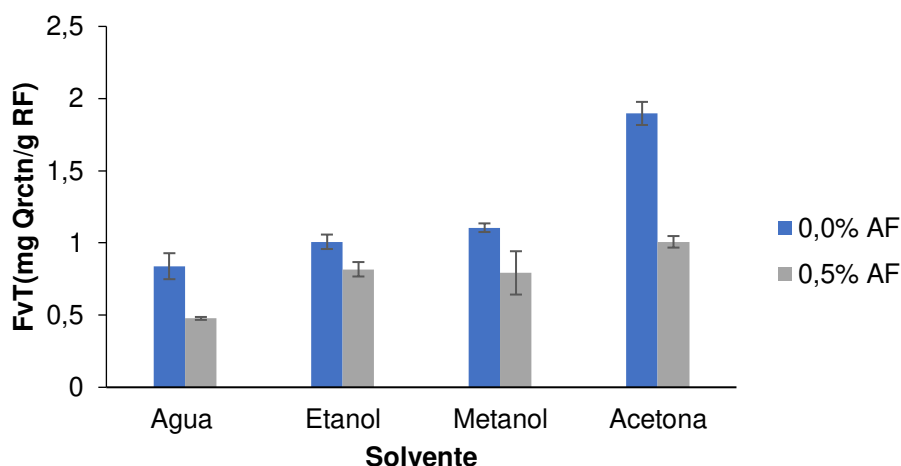
**Tabla 3.6.** Contenido de flavonoides totales (FvT) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla para la extracción en una etapa.

St	FvT (mg QE/g RF)	
	C <sub>AF</sub> (%)	
	0	0,5
<b>A</b>	0,54 ± 0,03aB	0,37 ± 0,02aA
<b>EtOH-A</b>	0,72 ± 0,004bA	0,75 ± 0,02bB
<b>MetOH-A</b>	0,69 ± 0,014bB	0,66 ± 0,006cA
<b>AC-A</b>	1,12 ± 0,0849cA	1,20 ± 0,06dA

St: solvente; C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre solventes de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey ( $p \leq 0.05$ )

**Figura 3.4.** Contenido de flavonoides totales (FvT) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla para la extracción en una etapa.

La Figura 3.5 y la Tabla 3.7 muestran el desempeño de las distintas soluciones extractantes con y sin ácido fórmico en 2 etapas para el contenido de flavonoides totales. La AC-A sin ácido resultó ser el mejor solvente con un rendimiento 56% mayor al contenido de FvT extraído con agua sin AF. De manera similar, Los et al. (2019) reportaron que la acetona 70% extrajo mayores cantidades de flavonoides en frijoles de Brasil.



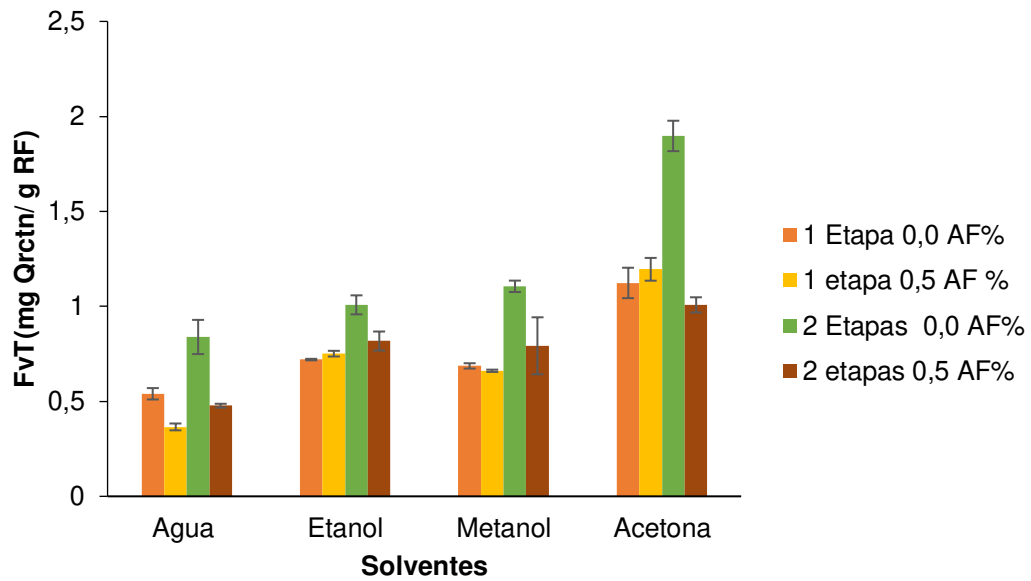
**Figura 3.5.** Contenido de flavonoides totales (FvT) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla para la extracción en dos etapas.

La adición de ácido fórmico a los solventes en las extracciones realizadas en una o dos etapas no aumentó los rendimientos de flavonoides totales, de manera opuesta a lo observado para la extracción de los compuestos fenólicos totales (Tabla 3.5). Como se había mencionado anteriormente en términos generales, los bajos valores de pH en las soluciones de extracción permite la estabilidad de los compuestos fenólicos y facilita en algunos casos la extracción más eficiente con solventes orgánicos (Rajbhar et al., 2015). Sin embargo, las moléculas de flavonoides podrían ser inestables en soluciones de solventes ácidos. Los flavonoles a base de quercetina extraídos de hollejo de uva fueron inestables en metanol ligeramente ácido (ácido fórmico, acético, cítrico y málico) y altamente lábiles en metanol con ácido clorhídrico al 1%. Metanol 50% fue el solvente más eficaz, extrayendo del hollejo de uva 30 a 50% más quercetina-3-*O*-glucósido que cualquiera de los otros solventes (Downey et al., 2007). De acuerdo con Ignat et al. (2011), la degradación de los flavonoides implica reacciones de oxidación, hidroxilación y escisión de anillo. De manera diferente, Putnik et al. (2015) reportaron que la adición de ácido clorhídrico (0.5-1%) mejoró la extracción de flavonoides de un subproducto de uva. Por lo tanto, la extracción de flavonoides del residuo de la industrialización de frutilla con solventes ácidos en una o en dos etapas no mejoró el rendimiento de FvT al menos con un  $C_{AF} = 0.5\%$  (Tabla 3.8 y Figura 3.6).

**Tabla 3.7.** Contenido de flavonoides totales (FvT) en el residuo de la industrialización de frutilla para la extracción en dos etapas.

St	N° Etapa	FvT (mg QE/g RF)	
		C <sub>AF</sub> (%)	
		0	0,5
<b>A</b>	1 <sup>ra</sup>	0,51 ± 0,08B	0,30 ± 0,01A
	2 <sup>da</sup>	0,33 ± 0,01A	0,18 ± 0,02B
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	0,84 ± 0,09aB	0,48 ± 0,01aA
<b>EtOH-A</b>	1 <sup>ra</sup>	0,67 ± 0,01B	0,50 ± 0,04A
	2 <sup>da</sup>	0,34 ± 0,04A	0,31 ± 0,01A
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	1,01 ± 0,05bA	0,82 ± 0,05bA
<b>MetOH-A</b>	1 <sup>ra</sup>	0,78 ± 0,01B	0,56 ± 0,1A
	2 <sup>da</sup>	0,33 ± 0,02B	0,24 ± 0,05B
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	1,11 ± 0,03cB	0,79 ± 0,15bA
<b>AC-A</b>	1 <sup>ra</sup>	1,59 ± 0,07B	0,70 ± 0,04A
	2 <sup>da</sup>	0,31 ± 0,003A	0,31 ± 0,04A
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	1,90 ± 0,08dB	1,01 ± 0,04cA

St: solvente; C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre solventes de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey (p≤0.05)



**Figura 3.6.** Contenido de flavonoides totales (FvT) para los diferentes sistemas de extracción.

Para los distintos solventes y tipos de extracción, los flavonoides totales variaron su proporción en el contenido total de compuestos fenólicos desde un 4,6% (A con AF en una etapa) hasta un 16,3% (AC-A sin AF en 2 etapas). Estas proporciones resultaron menores a las reportadas por Oszmia y Wojdyl (2011) y Kårlund et al. (2014) en hojas de frutilla, en donde los flavonoides representaron entre el 36 al 48% de los compuestos fenólicos totales.

Los flavonoides pueden encontrarse asociados entre sí formando macromoléculas, o pueden estar enlazados a la matrices vegetales por puentes de hidrogeno, lo cual puede hacer más dificultosa su extracción desde estas estructuras (Naeem et al., 2012).

**Tabla 3.8.** Contenido de flavonoides totales (FvT) en el residuo de la industrialización de frutilla para los diferentes sistemas de extracción.

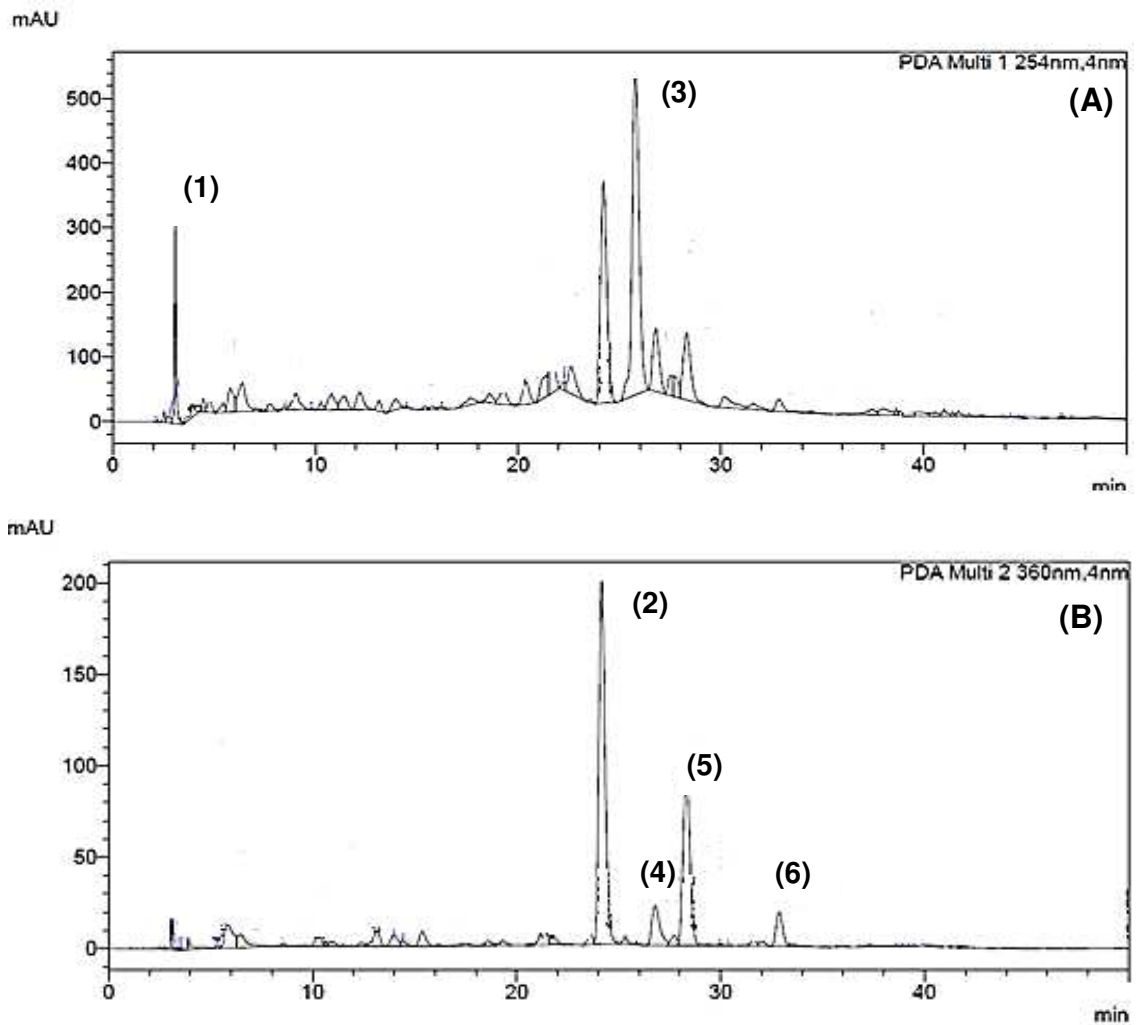
St	EE	FvT (mg QE/g RF)	
		C <sub>AF</sub> (%)	
		0	0,5
A	1	0,54 ± 0,03aA	0,37 ± 0,02 aB
	2	0,84 ± 0,09cA	0,48 ± 0,01bB
EtOH-A	1	0,72 ± 0,004bcA	0,76 ± 0,02 dB
	2	1,00 ± 0,05dB	0,82 ± 0,05 dA
MetOH-A	1	0,69 ± 0,01bB	0,66 ± 0,01 cA
	2	1,11 ± 0,03eB	0,79 ± 0,20 cdA
AC-A	1	1,12 ± 0,09eA	1,20 ± 0,06 fA
	2	1,90 ± 0,075fB	1,00 ± 0,04 eA

St: solvente; EE. Número totas de etapas de extracción; C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna, indican diferencias significativas entre sistemas de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

#### 3.4. Perfil de compuestos fenólicos de los extractos del residuo vegetal de la industrialización de frutillas

En este trabajo se identificaron y cuantificaron los compuestos fenólicos obtenidos con los distintos sistemas de extracción previamente planteados. La identificación se basó en el análisis cromatográfico de las muestras en comparación con los tiempos de retención y los espectros de absorción de compuestos fenólicos estándares. Además, se contó con espectros de masa e información previamente reportada en la bibliografía para la identificación de los compuestos fenólicos para los cuales no se contaba con estándares específicos (Van de Velde et al., 2016).

En la Figura 3.7 se muestra el perfil típico de compuestos fenólicos obtenido para un extracto del residuo de la industrialización de frutilla variedad 'Festival' con MetOH-A sin ácido en una etapa. En todos los extractos se identificaron seis compuestos fenólicos: dos taninos hidrolizables: un isómero de tetragaloil-glucosa (**pico 1**) y un dímero de galoil-bis-HHDP-glucosa (agrimoniin) (**pico 3**), un pentosido de ácido elágico (**pico 2**), ácido elágico libre (**pico 4**) y los flavonoles quercetina-3-O-glucurónido (**pico 5**) y kaempferol-3-O-glucurónido (**pico 6**).



**Figura 3.7.** Cromatograma del extracto del residuo de la industrialización de frutilla con MeOH-A sin ácido en 1 etapa. (A) longitud de onda 254 nm. (B) longitud de onda 360 nm.

La Tabla 3.9 muestra los tiempos de retención y las longitudes de onda elegidas para la detección de los compuestos fenólicos identificados en las muestras.

**Tabla 3.9.** Tiempos de retención y longitudes de onda de detección de los compuestos fenólicos identificados en los extractos obtenidos del residuo de la industrialización de frutillas.

Compuesto	Pico	t <sub>R</sub> (min)	λ (nm)
Tetragaloil-glucosa	1	3,015 ± 0,177	254
Ácido elágico pentósido	2	24,550 ± 0,192	360
Agrimoniin	3	27,308 ± 0,176	360
Ácido elágico	4	26,237 ± 0,235	254
Quercetin-3- <i>O</i> -glucurónido	5	28,761 ± 0,214	360
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucurónido	6	33,349 ± 0,204	360

t<sub>R</sub>: tiempo de retención; λ: longitud de onda.

La Tabla 3.10 muestra el análisis de varianza multifactorial para los distintos compuestos fenólicos analizados. Cabe resaltar que el tipo de solvente (St) afectó significativamente la extracción de todos los compuestos fenólicos individuales analizados.

**Tabla 3.10.** Análisis de la varianza multifactorial para el perfil de compuestos fenólicos del residuo de la industrialización de frutilla.

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados					
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
St	3	0,14*	0,71***	11,59***	0,38**	0,25***	0,03***
C <sub>AF</sub>	1	0,006	0,005	3,79***	0,00007	0,002	0,00003
EE	1	0,02	0,34***	1,16*	0,01*	0,05***	0,006*
St*C <sub>AF</sub>	3	0,01	0,03	4,13***	0,007	0,009	0,004
St*EE	3	0,04	0,08	0,3	0,01	0,016	0,005
C <sub>AF</sub> *EE	1	0,001	0,03	0,003	0,0002	0,003	0,0003
St*C <sub>AF</sub> *EE	3	0,003	0,01	0,96	0,007	0,008	0,004
Residuos	16	0,15	0,21	2,43	0,036	0,04	0,016
Total (corregido)	31	0,39	1,41	24,37	0,11	0,37	0,65

St: Solvente; C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico; EE: N° total de etapas de extracción; G.L: grados de libertad; (1): Tetragaloil-glucosa, (2): Ácido elágico pentósido, (3): Agrimoniin, (4): Ácido elágico, (5): Quercetina-3-*O*-glucuronido, (6): Kaempferol 3-*O*-glucuronido. \*p≤0,05; \*\*p≤0,01; \*\*\* p≤0,001.

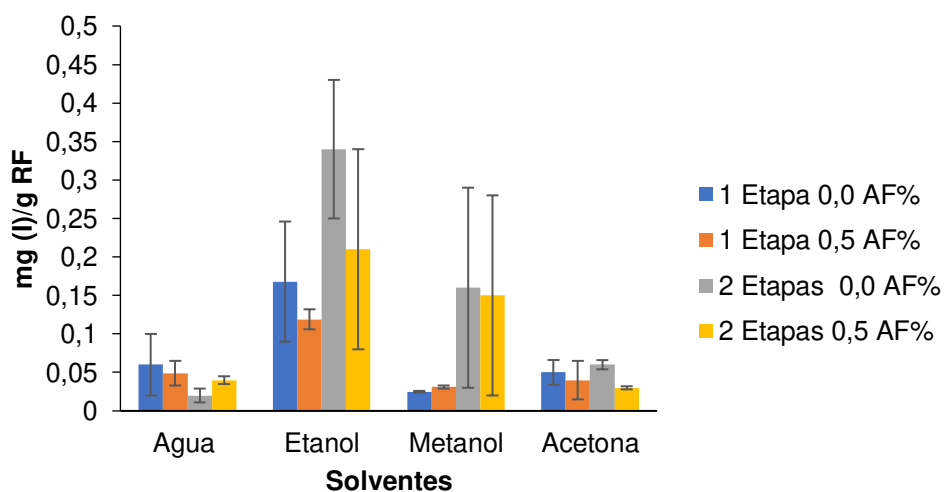


En las Tablas 3.11 a 3.16 y Figuras 3.8 a 3.14 se muestran las diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos individuales determinados en el residuo de la industrialización de frutillas para cada sistema de extracción empleado.

**Tabla 3.11.** Contenido de tetragaloil-glucosa (1) en el residuo de la industrialización de frutillas para los distintos sistemas de extracción.

St	EE	(1) (mg/g RF)	
		C <sub>AF</sub> (%)	
		0	0,5
A	1	0,06 ± 0,04aA	0,05 ± 0,01aA
	2	0,02 ± 0,01aA	0,04 ± 0,01aA
EtOH-A	1	0,17 ± 0,08aA	0,12 ± 0,13aA
	2	0,34 ± 0,09bA	0,27 ± 0,13aA
MetOH-A	1	0,03 ± 0,001aA	0,03 ± 0,002aA
	2	0,16 ± 0,13aA	0,15 ± 0,13aA
AC-A	1	0,05 ± 0,02aA	0,04 ± 0,03aA
	2	0,06 ± 0,01aA	0,03 ± 0,002aA

St: Solvente; C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico; EE: N° total de etapas de extracción. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna, indican diferencias significativas entre sistemas de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey ( $p \leq 0.05$ )



**Figura 3.8.** Contenido de Tetragaloil glucosa isómero (1).

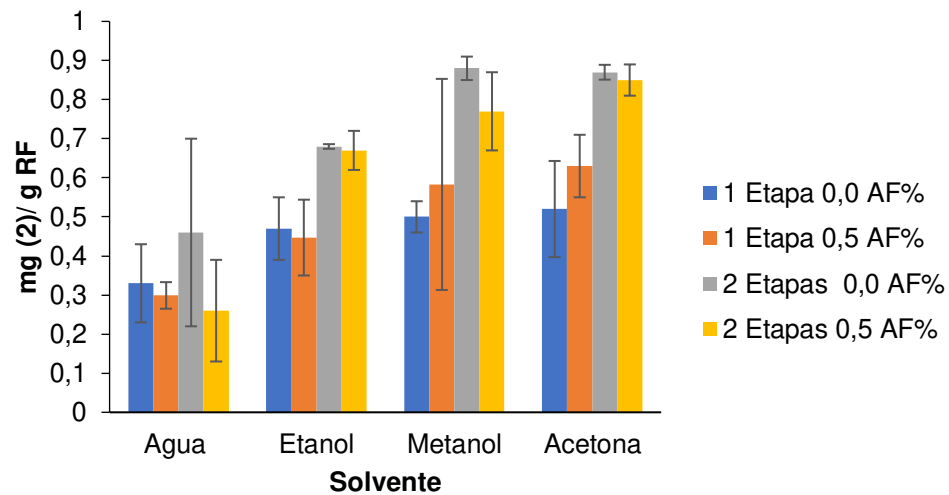
La Tabla 3.11 y Figura 3.8 muestran el contenido del elagitanino tetragaloil-glucosa (**1**) obtenido con los distintos sistemas de extracción. Las elagitaninos son taninos hidrolizables, ya que son ésteres del ácido hexahidroxidifenico (HHDP: 6,6'-dicarbonil-2, 2, 3, 3', 4, 4'-hexahidroxidifenilo) y un poliol, generalmente glucosa y en algunos casos ácido gálico. La hidrólisis de los elagitaninos conduce a la formación de ácido elágico (Milala et al., 2017; Nowicka et al., 2019).

De acuerdo con la Tabla 3.10, el tipo de solvente afectó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) para la extracción de este compuesto. La extracción con EtOH-A sin presencia de AF en 2 etapas presentó los mejores rendimientos para este metabolito (0,34 mg/g RF) (Tabla 3.11). De manera similar, Simirgiotis et al. (2009) identificaron de manera cualitativa este tanino hidrolizable en hojas de frutilla blanca silvestre chilena. Al igual que Hanhineva et al. (2008) quienes lo identificaron en los distintos órganos de la flor de la planta de frutilla en extractos metanólicos, siendo no identificado en el fruto propiamente dicho.

**Tabla 3.12.** Contenido de ácido elágico pentósido (**2**) en el residuo de la industrialización de frutillas para los distintos sistemas de extracción.

St	EE	(2) (mg/g RF)	
		C <sub>AF</sub> (%)	
		0	0,5
A	1	0,33 ± 0,1 aA	0,30 ± 0,03abA
	2	0,46 ± 0,24abA	0,26 ± 0,13aA
EtOH-A	1	0,47 ± 0,08abA	0,45 ± 0,09abcA
	2	0,68 ± 0,01abA	0,67 ± 0,05abcA
MetOH-A	1	0,50 ± 0,04abA	0,58 ± 0,27abcA
	2	0,88 ± 0,03bA	0,77 ± 0,10bcA
AC-A	1	0,52 ± 0,12abA	0,63 ± 0,08abcA
	2	0,87 ± 0,02bA	0,85 ± 0,04cA

St: Solvente; C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico; EE: N° total de etapas de extracción. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna, indican diferencias significativas entre sistemas de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 3. 9** Contenido de ácido elágico pentosido (2).

La Tabla 3.12 y la Figura 3.9 muestran el rendimiento obtenido con los distintos sistemas de extracción estudiados del compuesto fenólico ácido elágico pentósido. El empleo de distintos solventes y número de etapas de extracción tuvo un impacto altamente significativo ( $p \leq 0.001$ ) en el rendimiento de extracción de este compuesto, mientras que la adición de AF no afectó su extracción (Tabla 3.10).

Las extracciones en dos etapas presentaron los mayores rendimientos de extracción de ácido elágico pentósido. Sin embargo, no hubo diferencias entre las medias de extracción para los distintos solventes en estas condiciones (Tabla 3.12 y Figura 3.9). El rango de concentraciones de ácido elágico pentósido (0,1-0,8 mg/gRF) hallado en el residuo de la industrialización de frutilla estuvo de acuerdo a lo reportado por Fracassetti et al. (2013) (0,49 mg/g) en camu-camu (*Myrciaria dubia*), una berrie amazónica conocida por su actividad antioxidante, usando metanol 50% acidificado con HCl al 1% y una relación de extracción de 1:25 (p/v).

Cabe resaltar que la concentración de ácido elágico pentósido extraído con agua ácida en 2 etapas correspondería aproximadamente a 2,3 mg/g de residuo seco, lo cual sería mayor a lo reportado por Buňčová et al. (2011), quienes extrajeron con agua a 50°C entre 0,5 y 1,8 mg de este compuesto por gramo de hoja de frutilla seca.

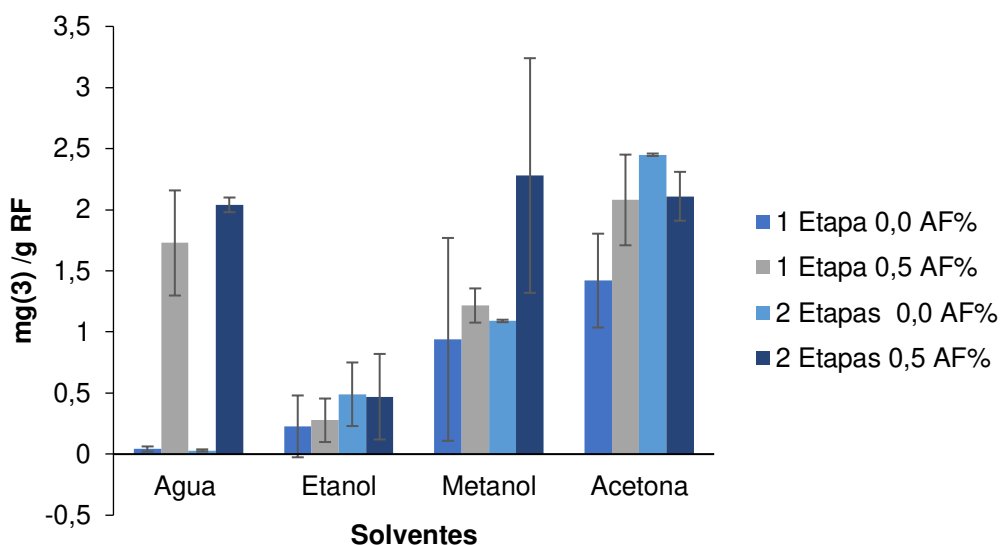
**Tabla 3.13.** Contenido de Agrimoniin (**3**) en el residuo de la industrialización de frutillas para los distintos sistemas de extracción.

St	EE	(3) (mg/g RF)	
		C <sub>AF</sub> (%)	
		0	0,5
A	1	0,04 ± 0,02abA	1,73 ± 0,43abcB
	2	0,03 ± 0,01aA	2,04 ± 0,06bcB
EtOH-A	1	0,23 ± 0,25abA	0,28 ± 0,18aA
	2	0,49 ± 0,26abA	0,47 ± 0,35abA
MetOH-A	1	0,94 ± 0,83abA	1,22 ± 0,14abcA
	2	1,09 ± 0,01abcA	2,28 ± 0,96cA
AC-A	1	1,42 ± 0,38bcA	2,08 ± 0,37bcA
	2	2,45 ± 0,01cA	2,11 ± 0,20bcA

St: Solvente; C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico; EE: N° total de etapas de extracción. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna, indican diferencias significativas entre sistemas de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

La Tabla 3.13 y la Figura 3.10 muestran el contenido del dímero de galoil-bis-HHDP-glucosa (agrimoniin) obtenido con los distintos sistemas de extracción. Agrimoniin es un elagitanino dimérico que se caracteriza por tener enlaces  $\alpha$ -glucosídicos en las unidades monoméricas (Fecka, 2009).

La extracción de agrimoniin fue significativamente influenciada por el tipo de solvente, la adición de AF y la interacción entre estos dos factores ( $p \leq 0.001$ ); además de presentar un impacto significativo ( $p < 0,05$ ) el número total de etapas de extracción (Tabla 3.10). Para las extracciones en una etapa, este compuesto presentó un rango muy amplio entre las soluciones extractantes (0,04-2 mg/g RF), siendo la extracción con AC-A sin y con AF la de mayor rendimiento (Tabla 3.13 y Figura 3.10). Aparentemente, debido a los grupos galoilos y su alto peso molecular, agrimoniin puede formar enlaces de hidrogeno más fuertes con la acetona que con el resto de los solventes estudiados, mejorando su extracción (Rezaie et al., 2015).



**Figura 3.10.** Contenido de agrimoniin (3).

De la misma manera, la extracción de agrimoniin en dos etapas con AC-A y  $C_{AF} = 0\%$  produjo el mayor rendimiento (2,45 mg/g RF). Sin embargo, no hubo diferencias en el contenido de este elagitanino extraído con A, MeOH-A y AC-A con  $C_{AF} = 0,5\%$  ( $\approx 2$  mg/g RF), lo que indicaría la posibilidad de extraer este compuesto con un solvente verde como agua acidificada.

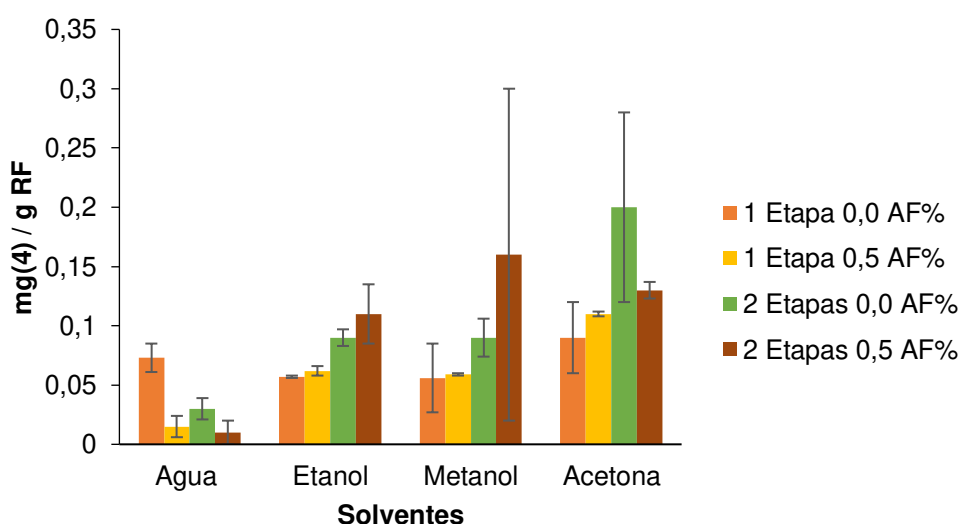
El contenido de agrimoniin extraído de esta manera del residuo de la industrialización de frutillas resultó aproximadamente 117 veces mayor al valor reportado para este compuesto en la fruta entera (0,017 mg/g) (Van de Velde et al., 2016); e incluso fue superior a los resultados reportados por Aaby et al. (2012) para 27 cultivares de frutilla usando acetona 100% como solvente de extracción (0,058-0,138 mg/g).

Agrimoniin fue el principal compuesto fenólico encontrado en los residuos de la industrialización de frutilla en este trabajo, similar a lo reportado por Kårlund et al. (2014) para hojas de frutilla. Este compuesto es uno de los polifenoles más representativos de la familia *Rosaceae* y es considerado un marcador taxonómico (Grochowski et al., 2017).

**Tabla 3.14.** Contenido de ácido elálgico (4) en el residuo de la industrialización de frutillas para los distintos sistemas de extracción.

St	EE	(4) (mg/g RF)	
		C <sub>AF</sub> (%)	
		0	0,5
A	1	0,12 ± 0,01aA	0,02 ± 0,009aA
	2	0,03 ± 0,01aA	0,01 ± 0,01aA
EtOH-A	1	0,06 ± 0,001aA	0,06 ± 0,004aA
	2	0,09 ± 0,01aA	0,11 ± 0,03aA
MetOH-A	1	0,06 ± 0,03aA	0,06 ± 0,001aA
	2	0,09 ± 0,02aA	0,16 ± 0,14aA
AC-A	1	0,09 ± 0,03aA	0,11 ± 0,002aA
	2	0,20 ± 0,05bA	0,13 ± 0,007aA

St: Solvente; C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico; EE: N° total de etapas de extracción. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna, indican diferencias significativas entre sistemas de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey (p≤0.05).

**Figura 3. 11** Contenido de Ácido elálgico (4).

La extracción de ácido elálgico resultó significativamente afectada por el tipo de solvente y el número total de etapas de extracción (Tabla 3.10). Los contenidos de este compuesto en las extracciones con 1 etapa con y sin AF no evidenciaron diferencias significativas

( $p > 0,05$ ) (Tabla 3.14). La extracción de ácido elágico en 2 etapas con AC-A sin ácido mostró el mayor rendimiento (0.20 mg/g RF) entre todos los sistemas extractantes estudiados. Estos resultados concuerdan con da Silva Pinto et al. (2008) quienes optimizaron la extracción de ácido elágico de frutilla, reportando a la acetona 80% como el solvente de mejores rendimientos.

La presencia de ácido elágico en el residuo de la industrialización de frutilla está de acuerdo con Zhu et al. (2015), quienes caracterizaron todas las partes de la planta de frutilla variedad 'Amaou' usando agua como solvente de extracción. Los autores reportaron la presencia de este compuesto como mayoritario en toda la planta excepto en las raíces. Según Koponen et al. (2007) las especies de la familia de las rosáceas son una importante fuente de ácido elágico y elagitaninos en la naturaleza.

**Tabla 3.15.** Contenido de quercetina-3-O-glucurónido (5) en el residuo de la industrialización de frutillas para los distintos sistemas de extracción.

St	EE	(5) (mg/g RF)	
		C <sub>AF</sub> (%)	
		0	0,5
A	1	0,16 ± 0,06aA	0,14 ± 0,03aA
	2	0,21 ± 0,09abA	0,10 ± 0,05aA
EtOH-A	1	0,29 ± 0,03abcdA	0,24 ± 0,04abA
	2	0,35 ± 0,01bcdA	0,36 ± 0,04bA
MetOH-A	1	0,27 ± 0,03abcA	0,29 ± 0,09abA
	2	0,41 ± 0,02cdA	0,36 ± 0,03bA
AC-A	1	0,30 ± 0,04abcdA	0,37 ± 0,07bA
	2	0,45 ± 0,01cA	0,44 ± 0,002bA

St: Solvente; C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico; EE: N° total de etapas de extracción. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna, indican diferencias significativas entre sistemas de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

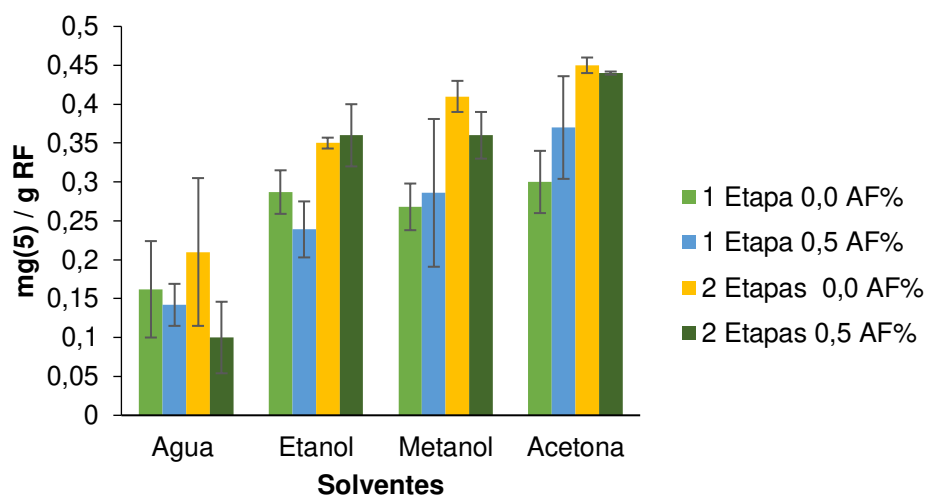


Figura 3. 12 Contenido de Quercetina-3-O-glucurónido (5).

Tabla 3.16. Contenido de kaempferol-3-O-glucurónido (6) en el residuo de la industrialización de frutillas para los distintos sistemas de extracción.

St	EE	(6) (mg/g RF)	
		C <sub>AF</sub> (%)	
		0	0,5
A	1	0,05 ± 0,02aA	0,05 ± 0,01aA
	2	0,06 ± 0,02aA	0,03 ± 0,01aA
EtOH-A	1	0,12 ± 0,01abA	0,08 ± 0,01aA
	2	0,11 ± 0,02abA	0,12 ± 0,01aA
MetOH-A	1	0,08 ± 0,02abA	0,09 ± 0,03aA
	2	0,12 ± 0,03abA	0,19 ± 0,10aA
AC-A	1	0,10 ± 0,01abA	0,11 ± 0,01aA
	2	0,15 ± 0,02bA	0,13 ± 0,02aA

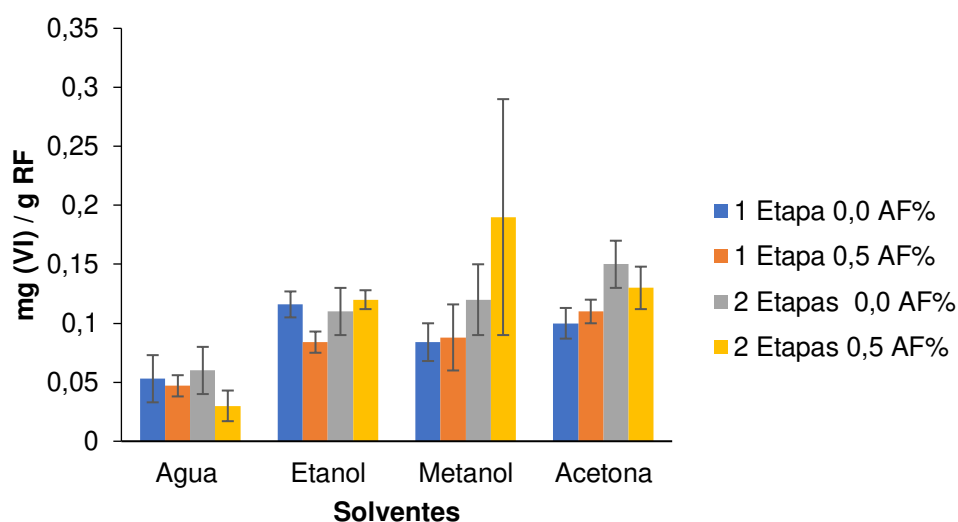
St: Solvente; C<sub>AF</sub>: concentración de ácido fórmico; EE: N° total de etapas de extracción. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna, indican diferencias significativas entre sistemas de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey (p≤0.05).

Dentro de los flavonoides, los flavonoles se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y las *berries* representan una importante fuente dietaria de estos compuestos



(Ignat et al., 2011). Se han identificado más de 50 diferentes flavonoles en este tipo de frutas y en su mayoría se encuentran glucosilados (Mikulic-Petkovsek et al., 2012).

De acuerdo con la Tabla 3.10, el tipo de solvente y el número total de etapas de extracción resultaron factores significativos en la extracción de quercetina-3-*O*-glucorónico y kaempferol-3-*O*-glucurónido. Estos flavonoles se extrajeron con el mayor rendimiento empleando Ac en dos etapas, independientemente de la presencia de ácido en los extractos. Sin embargo, para algunos solventes, tanto en uno como en dos etapas, la presencia de ácido fórmico produjo un rendimiento levemente menor (aunque no significativo) de flavonoles, en comparación con los extractos obtenidos sin ácido en las mismas condiciones (Tablas 3.15, 3.16, Figuras 3.12 y 3.13). Estos resultados estarían de acuerdo con Downey et al. (2007), quienes informaron que la extracción de flavonoles a base de quercetina del hollejo de uva eran inestables en soluciones ácidas de metanol.



**Figura 3.13.** Contenido de Kaempferol-3-*O*-glucurónido (6).

Finalmente, es de destacar que todos los sistemas de extracción presentaron mayores concentraciones del derivado de quercetina que los reportados por da Silva Pinto et al. (2008) en frutilla (0,0283 mg/g), usando acetona 80% a 120°C con posterior hidrólisis ácida como sistema de extracción. Asimismo, los rendimientos del derivado de kaempferol fueron superiores a los reportados por Mikulic-Petkovsek et al. (2012) para hojas de amelanchier, una planta perteneciente a la familia de las rosáceas, donde obtuvieron 0,0259 mg de kaempferol-3-*O*-glucosido por gramo de hoja usando metanol con ácido fórmico (3%) como sistema extractante.

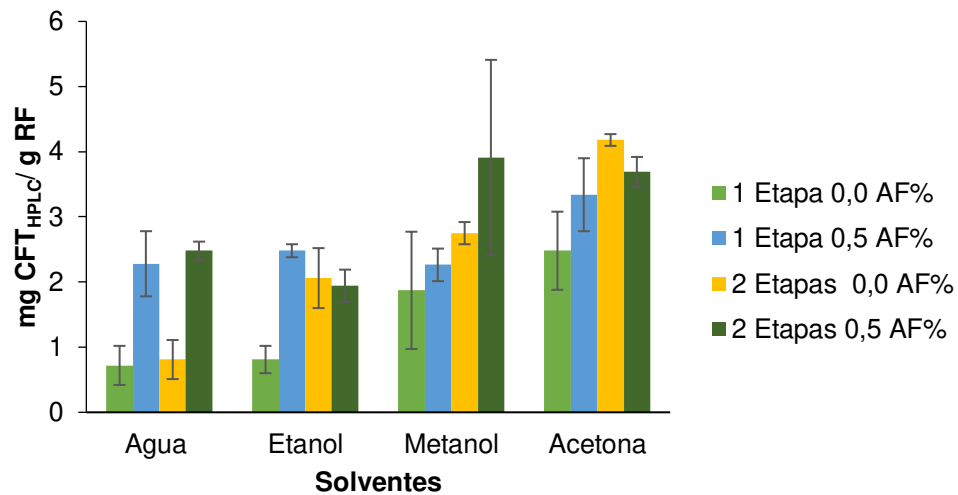
De los compuestos identificados y cuantificados anteriormente se realizó una sumatoria para conocer la cantidad de compuestos fenólicos totales ( $CFT_{HPLC}$ ) presentes en cada extracto, cuantificados mediante HPLC-DAD (Tabla 3.17 y Figura 3.14).

**Tabla 3. 17** Contenido de compuestos fenólicos totales analizados por HPLC ( $CFT_{HPLC}$ ) en el residuo de la industrialización de frutillas para los distintos sistemas de extracción.

St	EE	$CFT_{HPLC}$ (mg/g RF)	
		$C_{AF}$ (%)	
		0	0,5
A	1	0,72 ± 0,30aA	2,28 ± 0,5abA
	2	0,81 ± 0,33aA	2,48 ± 0,14abB
EtOH-A	1	1,33 ± 0,21abA	1,23 ± 0,10aA
	2	2,06 ± 0,46abA	1,94 ± 0,25abA
MetOH-A	1	1,87 ± 0,95abA	2,26 ± 0,25abA
	2	2,75 ± 0,17bcA	3,91 ± 1,48bA
AC-A	1	2,48 ± 0,60abcA	3,34 ± 0,56abA
	2	4,18 ± 0,09cA	3,69 ± 0,23bA

St: Solvente;  $C_{AF}$ : concentración de ácido fórmico; EE: N° total de etapas de extracción. Promedio de la suma aritmética ± desviación estándar (n=2). Letras minúsculas distintas en una misma columna, indican diferencias significativas entre sistemas de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

La extracción con AC-A y MeOH-A en dos etapas mostraron los mayores rendimientos de compuestos fenólicos totales analizados por HPLC ( $\approx 4$  mg/g RF). Sin embargo, la extracción con A ácida en dos etapas obtuvo un rendimiento de compuestos fenólicos de alrededor de 2.5 mg/g RF, resultados que destacan y alientan al uso de este solvente verde como medio de extracción.



**Figura 3. 14** Contenido de compuestos fenólicos totales analizados por HPLC ( $CFT_{HPLC}$ ) en el residuo de la industrialización de frutillas para los distintos sistemas de extracción.

### 3.5. Capacidad antioxidante de los extractos del residuo vegetal de la industrialización de frutilla

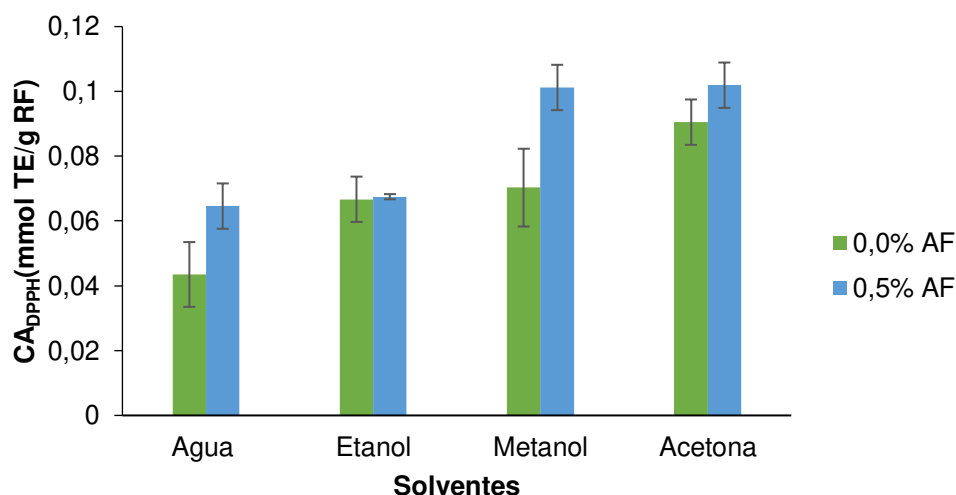
La capacidad antioxidante de los residuos de la industrialización de frutilla variedad 'Festival' se analizó mediante los métodos de  $CA_{DPPH}$  y  $CA_{FRAP}$ . De acuerdo con lo analizado previamente en la Tabla 3.2, el tipo de solvente (St), la concentración de ácido fórmico ( $C_{AF}$ ) y el número de etapas de extracción (EE) afectaron ( $p \leq 0.001$ ) la capacidad antioxidante ( $CA_{DPPH}$  y  $CA_{FRAP}$ ). Además, el aumento en  $C_{AF}$  desde 0 a 0.5% produjo un aumento en la capacidad antioxidante de los extractos para todos los solventes estudiados. Las Tablas 3.18 y 3.19 muestran los valores de capacidad antioxidante ( $CA_{DPPH}$  y  $CA_{FRAP}$ ) en el residuo de la industrialización de frutilla para los distintos sistemas de extracción estudiados.

Para la extracción en 1 etapa (Tabla 3.18 y Figura 3.15) sin AF, el extracto realizado con MetOH-A no presentó diferencia en su actividad frente al obtenido con EtOH-A. Sin embargo, los de AC-A presentaron la mejor  $CA_{DPPH}$  (0,0905 mmol TE/g RF). Al realizar el proceso con soluciones acidificadas cuyo pH no superaba los 3,8 (Tabla 3.1) se mejoró significativamente su actividad antioxidante. No obstante, el MetOH-A y AC-A presentaron la mejor actividad sin diferencias entre las medias de su actividad antirradicalaria DPPH. ( $p > 0,05$ ). Los valores obtenidos fueron menores a los reportados por (Pereira et al., 2012) (0,15 mmolTE/g de hoja), quienes estudiaron la capacidad antioxidante de hojas de *Myrtus* usando fluidos súper críticos con etanol como co-solvente.

**Tabla 3.18.** Capacidad antioxidante determinada mediante el método DPPH ( $CA_{DPPH}$ ) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla en 1 etapa.

St	$CA_{DPPH}$ (mmol Trolox/g RF)	
	$C_{AF}$ (%)	
	0	0,5
<b>A</b>	0,044 ± 0,01 aA	0,065 ± 0,007 aB
<b>EtOH-A</b>	0,067 ± 0,007 bA	0,068 ± 0,001 aA
<b>MetOH-A</b>	0,070 ± 0,01 bA	0,101 ± 0,007 bB
<b>AC-A</b>	0,091 ± 0,007 cA	0,102 ± 0,007 bB

St: Solvente;  $C_{AF}$ : concentración de ácido fórmico. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre solventes de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

**Figura 3.15.** Capacidad antioxidante determinada mediante el método DPPH ( $CA_{DPPH}$ ) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla en 1 etapa.

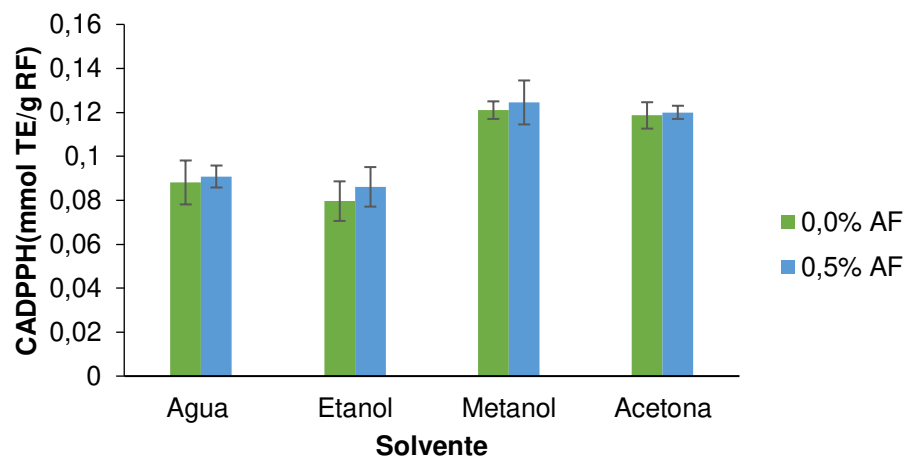
Para el proceso de extracción en 2 etapas (Tabla 3.19, 3.20 y Figura 3.16) se observó la misma tendencia, la extracción con A y el EtOH-A no presentaron diferencias significativas en su actividad antioxidante, pero fueron menores a los extractos de MetOH-A y AC-A, en donde tampoco hubo diferencias entre ellos ( $p > 0,05$ ). No obstante, el AF incrementó significativamente la  $CA_{DPPH}$  de los extractos con A y EtOH-A, ya que como era de esperarse el uso de AF aumentó el contenido de fenoles totales, lo cual repercute en una mayor actividad antioxidante puesto que el pH bajo favorece la extracción de compuestos

fenólicos cuya disposición de sus hidroxilos favorece la actividad antirradicalaria (Predrag Putnik et al., 2016).

**Tabla 3.19.** Capacidad antioxidante determinada mediante el método DPPH ( $CA_{DPPH}$ ) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla en 2 etapas.

St	N° Etapa	$CA_{DPPH}$ (mmol Trolox/g RF)	
		$C_{AF}$ (%)	
		0	0,5
A	1 <sup>ra</sup>	0,056 ± 0,01A	0,062 ± 0,004B
	2 <sup>da</sup>	0,032 ± 0,002A	0,033 ± 0,001B
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	0,088 ± 0,01aA	0,091 ± 0,005aB
EtOH-A	1 <sup>ra</sup>	0,053 ± 0,006A	0,055 ± 0,004A
	2 <sup>da</sup>	0,026 ± 0,002A	0,031 ± 0,005B
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	0,080 ± 0,009aA	0,086 ± 0,01bB
MetOH-A	1 <sup>ra</sup>	0,093 ± 0,001A	0,095 ± 0,006A
	2 <sup>da</sup>	0,029 ± 0,002A	0,030 ± 0,003A
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	0,121 ± 0,004bA	0,125 ± 0,01cA
AC-A	1 <sup>ra</sup>	0,079 ± 0,006A	0,080 ± 0,005A
	2 <sup>da</sup>	0,040 ± 0,0001A	0,041 ± 0,001A
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	0,119 ± 0,006bA	0,120 ± 0,003cA

St: Solvente; CAF: concentración de ácido fórmico. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre solventes de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey ( $p \leq 0.05$ )



**Figura 3.16.** Capacidad antioxidante determinada mediante el método DPPH ( $CA_{DPPH}$ ) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla en 2 etapas.

**Tabla 3.20.** Capacidad antioxidante determinada mediante el método DPPH ( $CA_{DPPH}$ ) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla para los distintos sistemas de extracción.

St	EE	$CA_{DPPH}$ (mmol Trolox/g RF)	
		$C_{AF}$ (%)	
		0	0,5
A	1	0,044 ± 0,01aA	0,065 ± 0,007aB
	2	0,088 ± 0,01bcA	0,091 ± 0,005bB
EtOH-A	1	0,067 ± 0,010bcA	0,068 ± 0,001aA
	2	0,080 ± 0,01bcA	0,086 ± 0,01aB
MetOH-A	1	0,070 ± 0,01bA	0,101 ± 0,007bB
	2	0,121 ± 0,004dA	0,125 ± 0,01cA
AC-A	1	0,091 ± 0,007cA	0,102 ± 0,007bB
	2	0,119 ± 0,006dA	0,120 ± 0,003cA

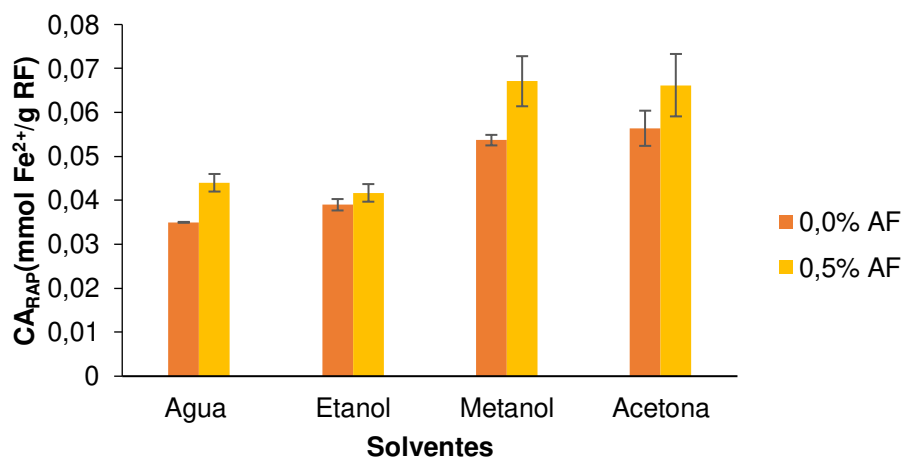
St: Solvente;  $C_{AF}$ : concentración de ácido fórmico; EE: N° total de etapas de extracción. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre solventes de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 3 21.** Capacidad antioxidante determinada mediante el método FRAP ( $CA_{FRAP}$ ) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla para extracción en 1 etapa (1:10).

St	$CA_{FRAP}$ (mmol FE/g RF)	
	$C_{AF}$ (%)	
	0	0,5
<b>A</b>	0,035 ± 0,0001 aA	0,044 ± 0,002 aB
<b>EtOH-A</b>	0,039 ± 0,001 aA	0,042 ± 0,002 aB
<b>MetOH-A</b>	0,054 ± 0,001 bA	0,067 ± 0,006 bB
<b>AC-A</b>	0,056 ± 0,004 bA	0,066 ± 0,007 bB

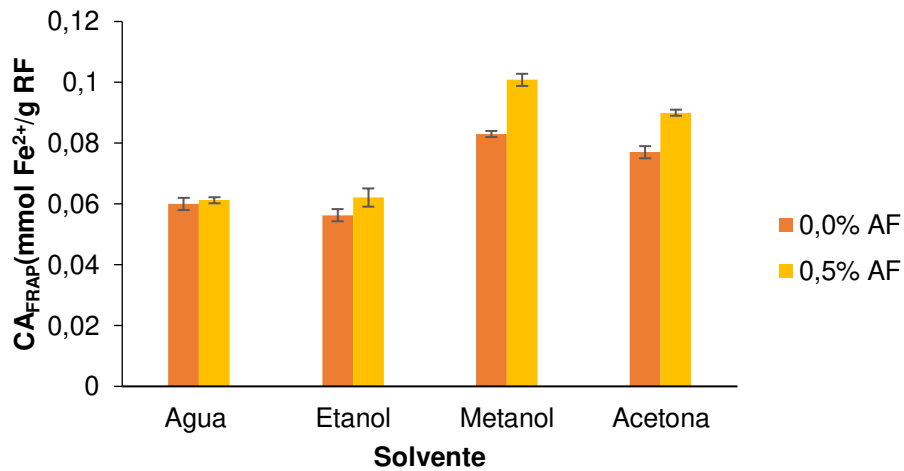
St: Solvente;  $C_{AF}$ : concentración de ácido fórmico. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre solventes de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey ( $p \leq 0.05$ )

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad antioxidante, utilizando la técnica FRAP, se observa que, para una etapa, los extractos sin acidificar con EtOH-A y A no presentaron diferencias entre ellos (Tabla 3.21 y Figura 3.17). Sin embargo, fueron menores a Ac (0,056 mM  $Fe^{2+}$ /g RF) y MetOH (0,053 mM  $Fe^{2+}$ /g RF). De acuerdo con las Tablas 3.21 y 3.23 y Figuras 3.17 y 3.19, el agregado de AF en las extracciones en una etapa mejoró en todos los casos la  $CA_{FRAP}$ , no obstante, la  $CA_{FRAP}$  de las extracciones con A y EtOH-A resultaron  $\approx 40\%$  inferior a los valores obtenidos con MetOH-A y AC-A ( $p > 0,05$ ).

**Figura 3.17.** Capacidad antioxidante determinada mediante el método FRAP ( $CA_{FRAP}$ ) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla para extracción en 1 etapa.

Para el proceso de extracción en 2 etapas (Tabla 3.22 y 3.23 y Figura 3.18) la  $CA_{FRAP}$  de los extractos de A y EtOH-A con y sin AF, no presentaron diferencias entre sí, pero fueron menores a los de AC-A y MetOH-A. Esta última presentó los mejores resultados con y sin AF (0,07-0,09 mmol  $Fe^{2+}$ /g RF) respectivamente, siendo valores cercanos a los reportados para subproductos de mandarina kinnow (0,0828 mmol  $Fe^{2+}$ /g RF) (Safdar et al., 2017) y mayores a los de cascara de naranja (0,06009 mmol  $Fe^{2+}$ /g RF) (Zulkifli et al., 2012).

Por su parte, la  $CA_{FRAP}$  con A y EtOH-A acidificados obtuvieron mayores valores (0,06 y 0,056 mmol  $Fe^{2+}$ /g RF respectivamente) a los reportados para arándano andino colombiano (0,045 mmol  $Fe^{2+}$ /g fruta fresca).



**Figura 3.18.** Capacidad antioxidante determinada mediante el método FRAP ( $CA_{FRAP}$ ) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla para extracción en 2 etapas.



**Tabla 3.22.** Capacidad antioxidante determinada mediante el método FRAP ( $CA_{FRAP}$ ) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla para extracción en 2 etapas.

St	N° Etapa	$CA_{FRAP}$ (mmol FE/g RF)	
		$C_{AF}$ (%)	
		0	0,5
A	1 <sup>ra</sup>	0,042 ± 0,002A	0,045 ± 0,003A
	2 <sup>da</sup>	0,018 ± 0,0008A	0,017 ± 0,002B
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	0,060 ± 0,002aA	0,061 ± 0,001aA
EtOH-A	1 <sup>ra</sup>	0,040 ± 0,0016A	0,037 ± 0,002A
	2 <sup>da</sup>	0,016 ± 0,001A	0,025 ± 0,001B
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	0,056 ± 0,002bA	0,062 ± 0,003aB
MetOH-A	1 <sup>ra</sup>	0,061 ± 0,001A	0,077 ± 0,001B
	2 <sup>da</sup>	0,022 ± 0,0007A	0,024 ± 0,003A
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	0,083 ± 0,001cA	0,101 ± 0,002bB
AC-A	1 <sup>ra</sup>	0,048 ± 0,003A	0,060 ± 0,003B
	2 <sup>da</sup>	0,030 ± 0,002A	0,031 ± 0,002A
	Total (1 <sup>ra</sup> +2 <sup>da</sup> )	0,077 ± 0,002cA	0,090 ± 0,001cB

St: Solvente;  $C_{AF}$ : concentración de ácido fórmico; Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre solventes de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey ( $p \leq 0.05$ )

**Tabla 3.23.** Capacidad antioxidante determinada mediante el método FRAP ( $CA_{FRAP}$ ) en el residuo vegetal de la industrialización de frutilla para los distintos sistemas de extracción.

St	EE	$CA_{FRAP}$ (mmol FE/g RF)	
		$C_{AF}$ (%)	
		0	0,5
A	1	0,035 ± 0,0001aA	0,044 ± 0,002aB
	2	0,060 ± 0,002cA	0,061 ± 0,001bA
EtOH-A	1	0,039 ± 0,001aA	0,042 ± 0,002aB
	2	0,056 ± 0,002bA	0,062 ± 0,003bB
MetOH-A	1	0,054 ± 0,001bA	0,067 ± 0,006bB
	2	0,083 ± 0,001dA	0,101 ± 0,002dB
AC-A	1	0,056 ± 0,004bA	0,066 ± 0,007bB
	2	0,077 ± 0,002dA	0,090 ± 0,001cB

St: Solvente;  $C_{AF}$ : concentración de ácido fórmico; EE: N° total de etapas de extracción. Promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre solventes de extracción. Letras mayúsculas en una misma fila indican diferencias significativas por efecto del AF. Test de Tukey ( $p \leq 0.05$ )

Los valores de capacidad antioxidante ( $CA_{DPPH}$  y  $CA_{FRAP}$ ) de los extractos obtenidos con MeOH-A y AC-A sin y con ácido en dos etapas fueron los más altos entre todos los sistemas de extracción ( $\approx 0.120$  mmol TE/g RF y  $\approx 0.090$  mmol  $Fe^{2+}$ /g RF) (Tablas 3.20 y 3.23).

Los valores de  $CA_{DPPH}$  obtenidos para todos los sistemas de extracción estudiados fueron superiores a los reportados por Zhu et al. (2015) para hojas de frutilla (0,024 mmol TE/g) y fruto (0,002 mmol TE/g) obtenidos por maceración, incluso para el extracto obtenido con A sin ácido en una etapa, que presentó la actividad antioxidante más baja (0,044 mmol Trolox/ g RF) (Tabla 3.20).

Si tenemos en cuenta el contenido de humedad encontrado para el residuo de la industrialización de frutilla (89%), los valores de  $CA_{FRAP}$  en base seca (BS) para los extractos obtenidos con A en 2 etapas sin ácido (0,545 mmol  $Fe^{2+}$ /g BS), serían muy

cercanos a los reportados por Dragland et al., (2003) para extractos acuosos de mejorana dulce (0,558 mmol Fe<sup>2+</sup>/ g BS) y mayores a los de manzanilla (0,177 mmol Fe<sup>2+</sup>/ g BS).

Por otro lado, con la intención de fomentar el uso de solventes verdes, es importante resaltar que la extracción del residuo de la industrialización de frutilla con A en dos etapas con C<sub>FA</sub> = 0.5% mostró valores de capacidad antioxidante (CA<sub>DPPH</sub>: 0.091 mmol TE/g, CA<sub>FRAP</sub>: 0.061 mmol Fe<sup>2+</sup>/g) en el orden de los obtenidos con MeOH-A y AC-A acidificados en una sola etapa (Tablas 3.20 y 3.23).

El gran poder antioxidante de los extractos del residuo de la industrialización de frutilla se puede deber a la presencia de los taninos hidrolizables, como se ha descrito en la sección anterior. Este tipo de compuestos fenólicos poseen una alta actividad antioxidante debido a la gran cantidad de grupos hidroxilos y galoiolos que presentan en sus estructuras (Huang et al., 2010). Los taninos tienen diversos efectos en los sistemas biológicos, ya que son potenciales agentes quelantes de iones metálicos, precipitantes de proteínas y antioxidantes biológicos (Ignat et al., 2011).

### **3.6. Estudio de correlación entre los compuestos fenólicos extraídos y la actividad antioxidante**

Se realizó la prueba de correlación de Pearson para cada sistema de extracción estudiado, con el fin de determinar las posibles relaciones lineales entre las respuestas analizadas, especialmente el aporte de los compuestos fenólicos a la capacidad antioxidante de los extractos.

En la Tabla 3.24 se presentan los coeficientes de correlación para los extractos obtenidos mediante una etapa sin ácido. En estas condiciones no se encontró una correlación significativa de los CFT<sub>HPLC</sub> con la técnica espectrofotométrica mediante la cual se determinaron los FT, esto es debido quizás a que bajo estas condiciones de extracción la mayoría de los compuestos cuantificados por HPLC no se vieron afectados significativamente por los factores de extracción como se observó en la Tabla 3.10. Adicional a esto, ninguno de los compuestos fenólicos individuales presentó correlación con la capacidad antioxidante de los extractos (CA<sub>DPPH</sub> y CA<sub>FRAP</sub>). Cabe destacar que en estas condiciones de extracción, los FT (analizados por método espectrofotométrico) correlacionaron con la capacidad antioxidante (R<sup>2</sup>>0.90). Esto quizás se debe a que la concentración de los CFT<sub>HPLC</sub> es muy baja para estos extractos y se presenta un sinergismo con otro tipo de compuestos que pueden contribuir a la capacidad antioxidante (Mokrani y Madani, 2016). Sin embargo, los resultados anteriores fueron superiores a lo reportado por Zhu et al. (2015) donde la correlación entre los fenoles totales determinados

por espectrofotometría y la capacidad antioxidante (FRAP) de extractos etanólicos de distintas partes de la hoja de frutilla fue de  $R^2=0,76$ .

**Tabla 3.24.** Correlación de las distintas respuestas estudiadas para extracción en 1 etapa sin ácido.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	CFT <sub>HPLC</sub>	FT	FvT	CA <sub>FRAP</sub>	CA <sub>DPPH</sub>
(1)	--										
(2)	NS	--									
(3)	NS	NS	--								
(4)	NS	0,7285*	0,9206**	--							
(5)	NS	0,9770***	0,7767*	0,8365**	--						
(6)	NS	0,8818**	0,7825*	0,8655**	0,9538***	--					
CFT <sub>HPLC</sub>	NS	0,8583**	0,9647***	0,9396***	0,9114**	0,8945**	--				
FT	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	--			
FvT	NS	NS	0,9585***	0,9132**	NS	0,7687*	0,8950**	NS	--		
CA <sub>FRAP</sub>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,9046**	NS	--	
CA <sub>DPPH</sub>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,9285***	NS	0,8886**	--

FT: Fenoles totales, FvT: Flavonoides totales, CA<sub>FRAP</sub>: Capacidad antioxidante por FRAP, CA<sub>DPPH</sub>: capacidad antioxidante por DPPH, CFT<sub>HPLC</sub>: compuestos fenólicos totales analizados por HPLC, (1):Tetragalolil-glucosa, (2): Ácido elágico pentóxido, (3):Agrimoniin, (4): ácido elágico, (5): Quercetina-3-O-glucuronido, (6): Kaempferol-3-O-glucuronido. NS: no significativo, \*: significativo p<0,05, \*\*: significativo p<0,01, \*\*\*: significativo p<0,001.

**Tabla 3.25.** Correlación de las distintas respuestas estudiadas para la extracción en 1 etapa con ácido.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	CFT <sub>HPLC</sub>	FT	FvT	CA <sub>FRAP</sub>	CA <sub>DPPH</sub>
(1)	--										
(2)	NS	--									
(3)	NS	NS	--								
(4)	NS	0,9335*	NS	--							
(5)	NS	0,9842*	NS	0,9651*	--						
(6)	NS	0,9539*	NS	0,9268*	0,9834*	--					
CFT <sub>HPLC</sub>	NS	0,8347*	0,9312*	0,7115*	0,7465*	NS	--				
FT	NS	0,8413*	0,7110*	NS	0,7906*	0,7665	0,8366	--			
FvT	NS	0,7792*	NS	0,8639*	0,8404*	0,8091	NS	NS	--		
CA <sub>FRAP</sub>	NS	NS	0,9060*	NS	NS	NS	0,9076	0,9012	N	--	
CA <sub>DPPH</sub>	NS	NS	0,8130*	NS	NS	NS	0,7773	0,8831	N	0,9574**	--

FT: Fenoles totales, FvT: Flavonoides totales, CA<sub>FRAP</sub>: Capacidad antioxidante por FRAP, CA<sub>DPPH</sub>: capacidad antioxidante por DPPH, CFT<sub>HPLC</sub>: compuestos fenólicos totales analizados por HPLC, (1):Tetragalolil-glucosa, (2): Ácido elágico pentóxido, (3):Agrimoniin, (4): ácido elágico, (5): Quercetina-3-O-glucuronido, (6): Kaempferol-3-O-glucuronido. NS: no significativo, \*: significativo p<0,05, \*\*: significativo p<0,01, \*\*\*: significativo p<0,001.

La Tabla 3.25 muestra la correlación de las respuestas estudiadas para la extracción del residuo de la industrialización de frutilla en una etapa con ácido. Contrariamente a la extracción en 1 etapa sin AF, para estos extractos, los FT presentaron una correlación significativa (p<0,01) con los CFT<sub>HPLC</sub>. Por otro lado, cabe resaltar que el compuesto fenólico (3) presentó una correlación altamente significativa (p<0,01) con la capacidad

antioxidante ( $CA_{FRAP}$  y  $CA_{DPPH}$ ). Esto puede deberse a que el agregado de ácido fórmico generó un aumento en la extracción de agrimoniin, generando así una concentración necesaria para mostrar actividad antioxidante en las condiciones del ensayo. Por otra parte, los flavonoles identificados por HPLC (compuestos **5** y **6**) correlacionaron con los FvT, pero estos compuestos no mostraron correlación con la capacidad antioxidante. Los flavonoles contienen un doble enlace  $C_2-C_3$  y un grupo 4-oxo en su anillo C, lo cual les brinda planaridad estructural que facilita la donación de átomos de hidrogeno. Sin embargo, la *O*-glucuronidación que presentan los compuestos **5** y **6** en el  $C_3$  del mismo anillo repercute en la planaridad de los anillos, provocando una reducción sustancial de la capacidad antioxidante de estos compuestos (Balasundram et al., 2006).

**Tabla 3.26.** Correlación de las distintas respuestas estudiadas para la extracción en 2 etapas sin ácido.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	$CFT_{HPLC}$	FT	FvT	$CA_{FRAP}$	$CA_{DPPH}$
(1)	--										
(2)	NS	--									
(3)	NS	0,7115*	--								
(4)	NS	NS	0,8559**	--							
(5)	NS	0,9630***	0,8021*	NS	--						
(6)	NS	0,7988*	0,8123*	NS	0,9180**	--					
$CFT_{HPLC}$	NS	0,8266*	0,9708***	0,8536**	0,9079**	0,8711**	--				
FT	NS	0,7913*	NS	NS	0,7175*	NS	NS	--			
FvT	NS	NS	0,9719***	0,8875**	0,7475*	0,8155*	0,9248**	NS	--		
$CA_{FRAP}$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,8848**	NS	--	
$CA_{DPPH}$	NS	NS	0,8184*	NS	NS	NS	0,7314*	NS	0,7607*	0,8503**	--

FT: Fenoles totales, FvT: Flavonoides totales,  $CA_{FRAP}$ : Capacidad antioxidante por FRAP,  $CA_{DPPH}$ : capacidad antioxidante por DPPH,  $CFT_{HPLC}$ : compuestos fenólicos totales analizados por HPLC, (1):Tetragalolil-glucosa, (2): Ácido elágico pentóxido, (3):Agrimoniin, (4): ácido elágico, (5): Quercetina-3-*O*-glucuronido, (6): Kaempferol-3-*O*-glucuronido. NS: no significativo, \*: significativo  $p < 0,05$ , \*\*: significativo  $p < 0,01$ , \*\*\*: significativo  $p < 0,001$ .

**Tabla 3.27.** Correlación de las distintas respuestas estudiadas para la extracción en 2 etapas con ácido.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	$CFT_{HPLC}$	FT	FvT	$CA_{FRAP}$	$CA_{DPPH}$
(1)	--										
(2)	NS	--									
(3)	NS	NS	--								
(4)	NS	0,8055*	NS	--							
(5)	NS	0,9801***	NS	0,7353*	--						

(6)	NS	0,8022*	NS	0,9726***	0,7279*	--				
CFT <sub>HPLC</sub>	NS	NS	0,8436**	0,7655*	NS	0,7284*	--			
FT	NS	0,7877*	NS	NS	NS	0,7609*	0,7594*	--		
FvT	NS	0,8761**	NS	NS	0,9273***	NS	NS	NS	--	
CA <sub>FRAP</sub>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,7188*	0,9586***	NS	--
CA <sub>DPPH</sub>	NS	NS	0,8242*	NS	NS	NS	0,8792**	0,8192*	NS	0,8579**

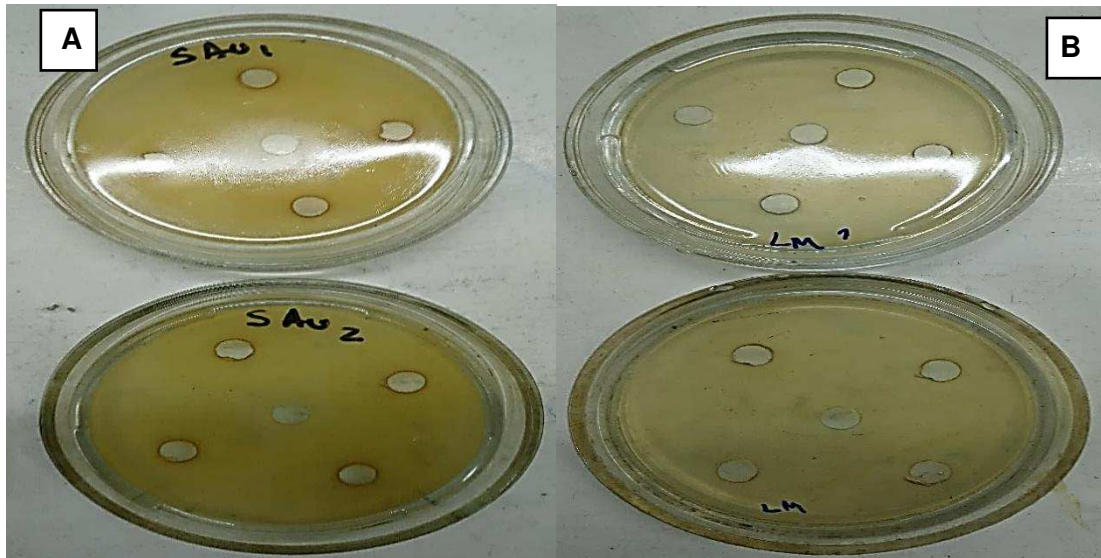
FT: Fenoles totales, FvT: Flavonoides totales, CA<sub>FRAP</sub>: Capacidad antioxidante FRAP, CA<sub>DPPH</sub>: actividad antioxidante DPPH, F-LC: sumatoria de fenoles por HPLC-DAD, (I):Tetragalolil-glucosa, (II):Ácido elágico pentóxido, (III):Agrimoniin, (IV):ácido elágico, (V):Quercetina-3-O-glucuronido, (VI):Kaempferol-3-O-glucuronido NS: no significativo, \*: significativo p<0,05, \*\*: significativo p<0,01, \*\*\*: significativo p<0,001.

En las Tablas 3.26 y 3.27 vemos que los FT presentaron correlación significativa ( $p < 0,05$ ) con los CFT<sub>HPLC</sub> en los extractos con C<sub>AF</sub>= 0,5%, caso contrario a lo visto para la extracción con 2 etapas sin AF. Por otro lado, se obtuvo que la mayor correlación fue de ( $R^2=0,95$   $p < 0,001$ ) entre FT y CA<sub>FRAP</sub> en los extractos con C<sub>AF</sub>=0,5%. Esto puede ser gracias a que la mayoría de los compuestos fenólicos están unidos a otros polímeros o compuestos de la pared celular, y el ácido mediante un mecanismo de hidrólisis facilita su difusión y la exposición de sus grupos hidroxilos mejorando la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos extraídos (Mokrani y Madani, 2016). Consecuentemente, lo encontrado en este trabajo fue mayor a las correlaciones reportadas por Zielinski et al., (2016) entre los FT y la CA<sub>FRAP</sub> de hojas de té blanco ( $R^2 = 0,884$ ). Dejando en evidencia que con este tipo de extracciones se obtuvieron mejores rendimientos y mejores actividades antioxidantes. Siendo similar a lo obtenido por Safdar et al. (2017) para cascara de mandarina en donde se usaron varios solventes orgánicos y técnicas para medir la capacidad antioxidante (FRAP, DPPH y radical superóxido), encontrando que a mayor concentración de FT, de forma similar aumentaba la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos.

El único compuesto fenólico que presentó correlación con la actividad antioxidante (CA<sub>DPPH</sub>) fue agrimoniin (3), evidenciando su protagonismo como agente antioxidante en los extractos obtenidos. Grochowski et al. (2017) reportó que concentraciones de agrimoniin mayores a 3  $\mu\text{mol/L}$  ya presentan una actividad antirradicalaria importante, su poder antioxidante se debe a que en su estructura poseen grupos hidroxilos con enlaces débiles que permiten la donación de átomos de hidrogeno, correlacionando muy bien con métodos como el de actividad antioxidante por trolox equivalente (TEAC) (Moilanen, 2015).

Al igual que para las extracciones con ácido en una etapa, los flavonoles (compuestos 5 y 6) correlacionaron significativamente ( $p < 0,05$ ) con el contenido de FvT determinado por el método espectrofotométrico, pero no presentaron correlación con la actividad antioxidante.

### 3.7. Actividad antibacteriana



**Figura 3.19.** Cultivos de *Staphylococcus aureus* (A) y *Listeria monocytogenes* (B), en presencia del extracto acuoso del residuo de la industrialización de frutilla luego de 24 h a 37°C.

La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos puede variar en función del tipo de bacteria estudiada, de si trata de un solo compuesto fenólico o de un grupo de ellos, de la metodología de extracción, de la dosis y el tiempo de exposición (Lima et al., 2019). Esto se debe en gran parte a la diversidad estructural de los compuestos fenólicos, ya que su actividad antimicrobiana está ligada a la presencia de grupos hidroxilos y al patrón de hidroxilación, los cuales van a interactuar con la bacteria objetivo (Oh y Jeon, 2015; Sanhueza et al., 2017).

Se realizó la inoculación de los cultivos de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Newport* y *Staphylococcus aureus* con 50  $\mu$ L del extracto para determinar la actividad antibacteriana del extracto acuoso del residuo de la industrialización de frutilla variedad 'Festival', no obteniéndose como resultado ningún halo de inhibición pasadas las 24 horas de incubación (Figura 3.19).

Al analizar la composición del extracto acuoso del residuo vegetal ensayado, se identificó la presencia de elagitaninos y flavonoles (Sección 3.4), de los cuales se esperaba actividad antimicrobiana. Tsuchiya et al. (1996) afirmaron que los flavonoides tienen la capacidad de formar complejos con la pared extracelular y las proteínas solubles de las membranas de las bacterias, generando la ruptura de estas. Asimismo, los derivados de las catequinas y el ácido eláxico tienen la capacidad de inhibir factores de virulencia de las bacterias y genes de expresión mediante la percepción de cuórum (Kang-Mu et al., 2009). Además, estos compuestos pueden inhibir enzimas de la célula bacteriana debido a la quelación de sustratos tales como el hierro y el zinc (Heinonen, 2007; Mandalari et al., 2007).

El extracto de A ensayado contaba con una concentración de compuestos fenólicos totales de 0,24 mg AGE/mL, en el cual el compuesto fenólico mayoritario era ácido eláxico

pentóxido (0,072 mg/mL), quien representaba un 46% del total CFT<sub>HPLC</sub>. Este compuesto fenólico ha demostrado actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* en extractos metanólicos de hollejo y semillas de uva, obteniendo una concentración mínima inhibitoria (MIC) entre 0,3 y 3 mg/L (Sanhueza et al., 2017). Por lo tanto, teniendo en cuenta estos antecedentes, sería esperable que el extracto con el que se realizó el ensayo, el cual tenía una concentración de ácido elágico pentósido menor, no exhiba actividad antimicrobiana.

De acuerdo a la bibliografía, las diversas fuentes de compuestos fenólicos van a presentar diversos rangos de MIC, tal es el caso de las pulpas de arándano y de mora, las cuales presentaron valores de MIC para *Listeria monocytogenes* de 0,5 y 0,8 mg/mL, respectivamente (Shen et al., 2014). Además, el valor de MIC depende de la composición de los compuestos fenólicos entre las distintas variedades de un mismo producto vegetal, es así que en el estudio anterior la pulpa de arándano variedad 'Duke' no presentó actividad antimicrobiana a pesar de usar una concentración de 1800 mg/mL (Shen et al., 2014).

Por otra parte, el tipo de solvente empleado para la extracción de los compuestos fenólicos de las matrices vegetales puede influir sobre la actividad antimicrobiana. De acuerdo a Al-Zoreky (2009), la actividad antimicrobiana de los extractos de polifenoles de cáscara de granada varió de acuerdo al solvente de extracción empleado. Los extractos acuosos no presentaron actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*, mientras que los extractos en éter etílico tuvieron una actividad media y los extractos con metanol presentaron la mejor actividad. Esto puede deberse a la polaridad de dichos solventes, lo cual repercute en la cantidad y tipo de compuestos fenólicos extraídos (Martínez-Ramos et al., 2020).

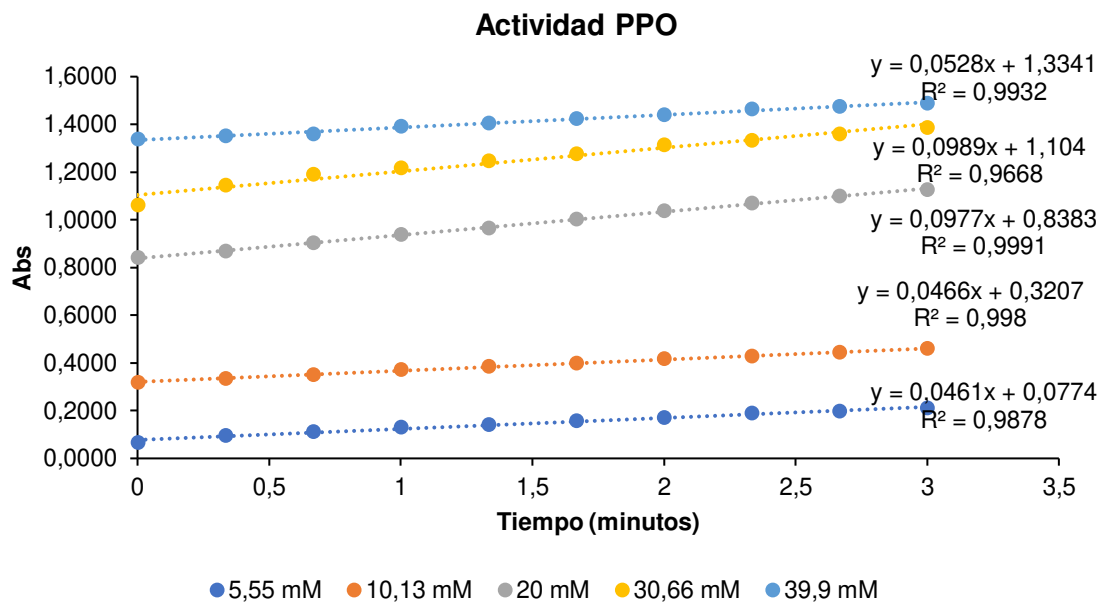
De esta manera, no se podría descartar una potencial actividad antimicrobiana del residuo de la industrialización de frutilla. Se podría ensayar la inoculación con mayores concentraciones de compuestos fenólicos de este extracto acuoso, e incluso inocular distintas fracciones de compuestos fenólicos de este extracto luego de una purificación y fraccionamiento. Además, si bien en este trabajo se priorizó ensayar las bioactividades del residuo de la industrialización de frutilla empleando extractos verdes como el agua o el etanol, se podrían ensayar los extractos con acetona y/o metanol, los cuales presentaron mayores proporciones de ácido elágico, taninos hidrolizables y flavonoles (Sección 3.4), compuestos con probada actividad antimicrobiana.

#### **3.8. Inhibición de la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO) de manzana 'Red Delicious'**

##### **3.8.1. Parámetros cinéticos de la enzima PPO de manzana 'Red Delicious'**



Se estudió la cinética de oxidación de la enzima PPO mediante el uso de concentraciones crecientes del sustrato catecol entre 5 y 40 mM. Se asumió que para este rango de concentraciones de sustrato la enzima seguiría el modelo de Michaelis-Menten, determinando los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_m$ , mediante el método gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 3.20).



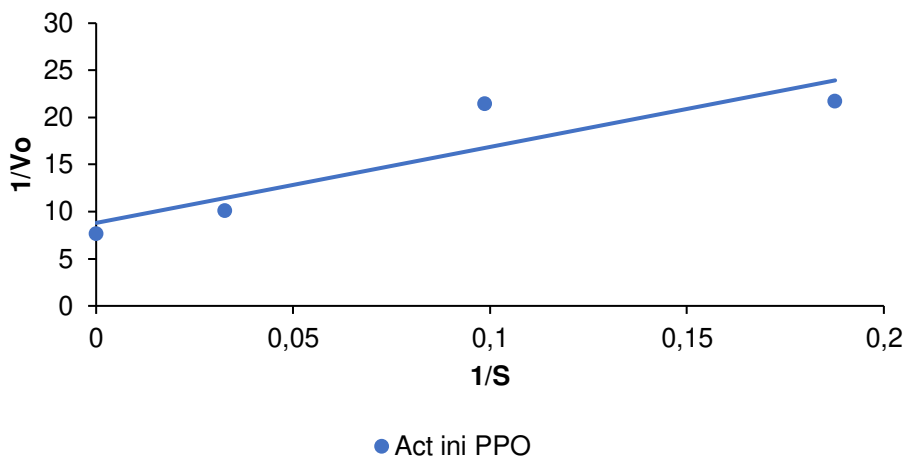
**Figura 3.20.** Actividad de la enzima PPO de manzana *Red Delicious* para distintas concentraciones de sustrato catecol (5-40 mM).

En la Tabla 3.28 se resumen los valores de las velocidades iniciales ( $V_0$ ) determinado a partir de la Figura 3.20 para cada concentración de sustrato y las unidades de actividad PPO (U), en donde 1 U se definió como el cambio en 0,001 unidades de absorbancia por unidad de tiempo (minuto). De acuerdo con estos resultados, la concentración de catecol 30,66 mM mostró la actividad enzimática más alta. Sin embargo, se observó una actividad PPO menor a la reportada por Rodríguez-Arzuaga y Piagentini (2018), quienes hallaron una actividad enzimática de 96,78 U para una concentración de catecol 10 mM en esta misma variedad de manzana.

**Tabla 3.28.** Pendiente para cada concentración de sustrato.

Concentración sustrato catecol (mM)	$V_0$ ( $\Delta$ abs/min)	Act PPO (U)
5,00	0,0461	46,1
10,00	0,0466	46,6
20,00	0,0977	97,7

<b>30,66</b>	0,0989	98,9
<b>40,00</b>	0,0528	52,8



**Figura 3. 21** Determinación de los parámetros cinéticos para la enzima PPO de manzana 'Red Delicious'.

En la Figura 3.21 observamos la gráfica de la inversa de las velocidades iniciales ( $V_0$ ) obtenidas en la Tabla 3.28 en función de la inversa de la concentración de sustrato (catecol) empleadas en el presente trabajo. Recordando la Ec 2.24 tenemos:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Ec. 2.24}$$

al hacer  $y = \frac{1}{v} = 0$ , se convierte en  $\frac{1}{S} = -1/K_m$ , a partir del cual se puede calcular el valor de  $K_m$ .

De la regresión lineal de la Figura 3.21 obtenemos una línea recta cuya ecuación (Ecuación 3.1) es:

$$y = 80,625x + 8,8053 \quad \text{Ec. 3.1}$$

Donde la pendiente de la recta es  $m = K_m/V_{max}$ , que intercepta al eje de las ordenadas en  $1/V_{max}$ , obteniendo un valor de  $V_{max} = 0,1136 \Delta\text{abs}/\text{min}$ .

Al hacer  $\frac{1}{v} = 0$  en la Ec. 2.24, obtenemos un valor de  $K_m = 9,15 \text{ mM}$ . Este valor está dentro del rango reportado por Nicolas et al. (1994) para distintas variedades de manzanas ( $K_m$  entre 5,3 y 140 mM) usando catecol como sustrato. No obstante, el valor de  $K_m$  fue menor a lo obtenido por Gasull y Becerra, (2006) para Manzana 'Red Delicious' (233 mM) con 50 mM de catecol y por Janovitz-Klapp et al. (1990) quienes reportaron un valor de  $K_m$  de 230 mM usando metilcatecol (20 mM) como sustrato. Estas variaciones se consideran que son resultado de diversas razones: diferentes métodos de ensayo usado, diferentes orígenes de la misma variedad de manzana y diferentes valores de pH de extracción, ya los valores

de pH tanto de la extracción como de acción de la enzima van a afectar significativamente los valores aparentes de  $K_m$  (Janovitz-Klapp et al., 1990). Adicionalmente, cabe resaltar que el extracto enzimático obtenido presenta gran afinidad por el sustrato catecol, por ende con una capacidad de pardeamiento mayor a la reportada por Gasull y Becerra (2006), ya que el valor de  $K_m/V_{max}$  obtenido por ellos fue de 23,5 mM frente a 77,12 mM obtenido en este trabajo.

### 3.8.2. Efecto inhibidor del extracto del residuo de la industrialización de frutilla sobre la actividad de la enzima PPO

En la Tabla 3.29 se muestran los porcentajes de inhibición enzimática obtenidos para el extracto rico en polifenoles del residuo de la industrialización de frutilla (RF) frente al de un antioxidante de uso tradicional como el ácido ascórbico (AA). Dicho porcentaje resulta del cambio generado en la velocidad inicial de la PPO tras ser puesta en contacto con el inhibidor, empleando una concentración de catecol de 10 mM.

**Tabla 3.29.** Porcentaje de inhibición de la enzima PPO de manzana Red Delicious para el extracto acuoso del residuo de la industrialización de frutilla (RF) y ácido ascórbico (AA) en distintas concentraciones.

PPO	[I] (mg/mL)	$V_0$ (abs/min)		% Inh
		Sin Inhibidor	Con inhibidor	
RF	0,24	0,0466	0,0325	30,26
	0,1	0,0466	0,0565	-21,24
AA	0,2	0,0466	0,0424	9,01
	0,4	0,0399	0,0221	44,61

[I]=concentración de inhibidor; [RF]: Expresada en mg AGE/mL extracto

De acuerdo con los resultados, para una baja concentración de AA (0,1 mg/mL) la velocidad inicial de la PPO se vio incrementada. Esto se puede deber a que el AA posee un gran poder reductor de metales como el Fe y el Cu y una débil capacidad para secuestrar metales, lo que podría estar causando un efecto pro-oxidante, que favorecería la actividad de la enzima en estas condiciones (Yen et al., 2002). Según Wiley (2017), se requieren niveles de AA mayores a 0,2 mg/mL para prevenir este efecto y obtener una inhibición

adecuada. En este sentido, para concentraciones de AA entre 0,2 y 0,4 mg/mL, este compuesto ejercer un efecto inhibitor sobre la enzima PPO (Tabla 3.29). El AA tendría la habilidad de reducir las quinonas producidas por la PPO a mono y difenoles, antes de que la reacción de formación de pigmentos se lleve a cabo. Sin embargo, el AA es muy susceptible a los factores externos y se oxida rápidamente a ácido dehidroascórbico (ADHA), pudiendo reaccionar con otros compuestos que generan cambios en la calidad de los frutos (Davey et al., 2000).

Por otro lado, el extracto RF (0,24 mg/mL) resultó ser un potente inhibidor de la enzima PPO, con valores cercanos a lo obtenidos por Soysal (2009), quienes lograron una inhibición del 42% de la PPO de manzana 'Golden Delicious' usando extracto de té verde, adicional a lo obtenido con extracto de salvado de arroz rico en fenoles el cual logró inactivar la PPO de manzana en un rango entre 18-47 % (Sukhonthara et al., 2016); aunque menor a lo obtenido por el extracto acuoso de yerba mate (1,094 g AGE/L) que redujo 50% la actividad de la PPO de manzana variedad 'Princesa' (Rodríguez-Arzuaga y Piagentini, 2018). Del mismo modo, este resultado en la inhibición de la PPO con un extracto acuosos de residuo vegetal de frutilla sería comparable a los obtenidos con tecnologías alternativas como altas presiones, en donde se inhibió la PPO en un 40% en manzana 'Royal Gala' usando 600 MPa por 15 minutos a temperatura ambiente (Sulaiman et al., 2015), y más cercano al valor de inhibición del 31% obtenido en manzanas 'Golden Delicious' con termo-sonicación empleando 24 kHz a 50°C por 10 minutos (Başlar y Ertugay, 2013). Por lo tanto, es evidente el gran potencial de este extracto rico en compuestos fenólicos obtenido del residuo de la industrialización de frutilla sobre la inhibición de la PPO, el cual proviene de fuentes de bajo costo de obtención y cuya extracción no demanda de infraestructura especializada.

### **3.8.3. Tipo de Inhibición ejercida por el extracto del residuo de la industrialización de frutilla sobre la PPO**

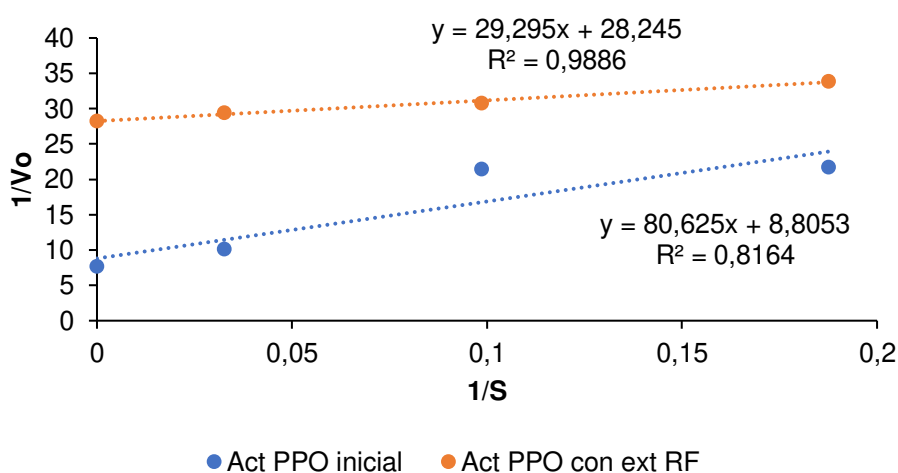
Si bien se ha estudiado el efecto de los compuestos fenólicos como agentes de control para el pardeamiento enzimático de frutas, se ha visto que el tipo de inhibición y su efectividad van a depender de la concentración y de la estructura química de estos compuestos. Los grupos sustituyentes y la posición de los hidroxilos en los compuestos fenólicos son fundamentales e influyen en las propiedades bioactivas de estos (Alvarez-Parrilla et al., 2007; Garzón et al., 2012; Jeon y Zhao, 2005).

En la Tabla 3.30 se muestran los distintos tipos de inhibición encontrados para los inhibidores usados. Para el caso del extracto RF, se obtuvo una inhibición reversible del tipo acompetitiva (incompetitiva), ya que los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  disminuyen en presencia

del inhibidor (Figura 3.22). En este caso, el inhibidor (extracto RF) se uniría al complejo enzima-sustrato gracias a los grupos hidroxilos de los compuestos fenólicos, además de facilitar la donación de electrones y reducir los compuestos ya oxidados, impidiendo la generación de productos oxidados (Rotbart et al., 2018). El tipo de inhibición mostrado por el extracto acuoso de RF sobre la PPO fue diferente al obtenido por de la Rosa et al. (2011), donde un extracto rico en flavonoides de miel (0,8-2 mg/mL) inhibió la PPO de manzana 'Red Delicious' a través de una inhibición del tipo competitiva. Además, los resultados en este trabajo resultaron distintos a los de Eraso (2009) quien inhibió (35%) la PPO extraída y purificada de banana (*Cavendish valery*) con un tipo de inhibición competitiva mediante el uso de una solución de isoespintanol (250 mg/L), esto debido probablemente a que los elagitaninos (compuestos mayoritarios de RF) presentan un mecanismo de acción diferente a los flavonoides y los mono fenoles como el isoespintanol.

**Tabla 3.30.** Tipo de inhibición ejercida por cada inhibidor.

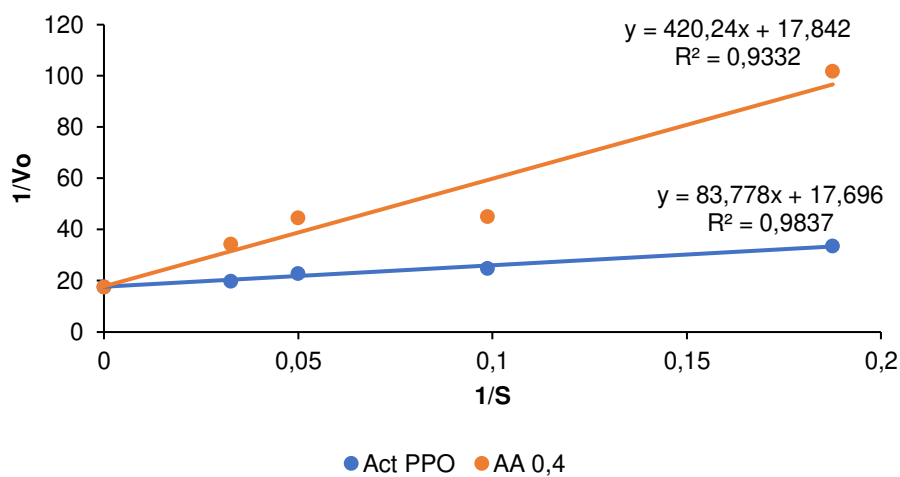
Inhibidor	[I] (mg/mL)	Inhibición (%)	Tipo de inhibición	Ki
				(mM)
RF	0,24	30,26	Acompetitiva	17,16
AA 0,4	0,4	44,61	Competitiva	1,44



**Figura 3.22.** Inhibición de la PPO de manzana 'Red Delicious' con el efecto del inhibidor (RF).

Para el caso del ácido ascórbico, como se discutió anteriormente, la concentración 0,1 mg/mL se comporta como prooxidante. Por último, al aumentar la concentración de AA a 0,4 mg/mL,  $V_{max}$  se mantuvo igual al valor inicial, mientras que  $K_m$  aumentó (Figura 3.23), lo cual indica que el AA a esta concentración actúa con un tipo de inhibición enzimática de

tipo competitiva. En este tipo de inhibición, el inhibidor se une a la enzima libre compitiendo por el sitio activo con el sustrato, evitando la formación de productos (Cox y Nelson, 2000). Además, el AA disminuiría el pH del medio haciendo más difícil el trabajo de la enzima sobre el catecol (Garzón et al., 2012; Piagentini et al., 2003). De manera similar, Martín (2011) reportó que el AA a 0,1 mg/mL fue prooxidante y a 0,2 mg/mL ejerció una inhibición competitiva para PPO de manzana variedad 'Princesa'.



**Figura 3.23.** Comparación los parámetros cinéticos de la PPO con y sin el inhibidor (AA 0.4 mg/mL).

#### 3.8.4. Constantes de inhibición (Ki)

En la Tabla 3.30 se muestran las constantes de inhibición (Ki) para cada tipo de inhibidor empleado y su concentración respectiva. Dicha constante fue calculada por medio de la linealización de Lineweaver-Burk según el tipo de inhibición sobre la PPO.

Como era de esperarse, la constante de inhibición (Ki), que es igual a la concentración de inhibidor necesaria para inhibir al 50% la actividad de la enzima PPO (I50) fue mayor para el extracto de RF que para el AA. Sin embargo, el extracto acuoso de RF, mostró un valor de Ki ligeramente superior al reportado por Martín (2011), quienes obtuvieron un Ki de 15,7 mM para PPO de manzana 'Red Delicious' con un extracto acuoso de yerba mate. Esto indica la posible aplicación de este tipo de extractos en la industria de frutas y hortalizas frescas cortadas o procesadas. En ese sentido, Rodríguez-Arzuaga et al., (2020) reportaron que la aplicación del extracto de yerba mate con ácido cítrico y ascórbico sobre manzanas 'Granny Smith' logró aumentar la vida de anaquel (2-5 días), la capacidad antioxidante (26%) e inhibir el pardeamiento en manzana fresca cortada. Con esto, se puede plantear la oportunidad de analizar en un futuro la capacidad del extracto de RF para mejorar la

calidad sensorial y el potencial saludable de los alimentos de cuarta gama especialmente los que son susceptibles al pardeamiento enzimático o al estrés oxidativo.

## **4. CONCLUSIONES**

---



#### 4. CONCLUSIONES

El rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos a partir del tejido vegetal residuo del acondicionamiento frutillas variedad 'Festival' destinadas a la industria, así como la capacidad antioxidante de los extractos dependió significativamente del tipo de solvente, del número total de las etapas de extracción y de la concentración de ácido fórmico.

Se determinó que el contenido de fenoles totales fue significativamente superior en los extractos obtenidos en la extracción en 2 etapas comparados con los obtenidos en 1 etapa, siendo hasta un 30% superior para la extracción con MeOH-A ( $C_{AF}= 0\%$ ) respecto a las demás soluciones extractantes empleadas.

La extracción de fenoles en dos etapas con agua o etanol 80% mostró concentraciones de fenoles totales comparables con las obtenidas con metanol 80% o acetona 80% en una sola etapa con y sin AF, alentando el empleo de solventes verdes para la extracción de compuestos fenólicos.

La adición de ácido fórmico mejoró significativamente los rendimientos de extracción de los compuestos fenólicos totales en todos los casos, obteniéndose un incremento de hasta un 19% de fenoles totales en la extracción con AC-A en 2 etapas por acidificación del solvente.

La extracción con la solución de metanol 80% en dos etapas y  $C_{AF} = 0,5 \%$  presentó los mejores rendimientos de compuestos fenólicos totales (15,01 mg AGE/ g RF), seguido de acetona, etanol 80% y por último agua en las mismas condiciones.

La AC-A presentó los mejores rendimientos de extracción para los flavonoides totales (FvT) con  $C_{AF}= 0\%$ , tanto para los extractos obtenidos en 1 y 2 etapas, seguido de MeOH-A, EtOH-A y por último A.

Contrariamente a lo ocurrido con los fenoles totales, el rendimiento de los flavonoides totales resultó menor en los extractos con agregado de ácido fórmico tanto para la extracción en 1 como 2 etapas.

La extracción en 2 etapas incrementó la cantidad de flavonoides totales obtenidos para todas las soluciones de extracción empleadas sin ácido fórmico (incrementos de 38-69%), siendo AC-A en 2 etapas sin ácido la extracción de mejor rendimiento (1,90 mg QE/g RF).

Se logró la identificación y cuantificación de 6 compuestos fenólicos, siendo los elagitaninos los compuestos mayoritarios.

El Agrimoniin resultó el compuesto fenólico mayoritario encontrado en los extractos, siendo la extracción con acetona 80% en dos etapas sin ácido, la que produjo el mayor rendimiento (2,45 mg/g RF). Este compuesto fue el único que correlacionó con la capacidad antioxidante de los extractos, y su rendimiento fue afectado significativamente por el tipo de solvente, el número total de las etapas de extracción y la concentración de ácido fórmico.

La  $CA_{DPPH}$  de los extractos obtenidos en 2 etapas fue la más alta, siendo hasta un 72% superior comparando la extracción en 1 y 2 etapas para el caso del metanol 80% sin presencia de ácido fórmico.

Se obtuvo la mayor  $CA_{DPPH}$  en los extractos obtenidos con las soluciones de MeOH-A y AC-A (0,120 mmol Trolox/g RF) en 2 etapas con y sin AF, seguido por EtOH-A y el A, mostrando una fuerte correlación con el contenido de fenoles totales.

Se determinó que la  $CA_{FRAP}$  de los extractos de RF, con todas las soluciones extractantes con 0,5% de AF y 2 etapas de extracción fue mayor que la obtenida para los extractos sin AF y 1 etapa, hasta un 50% superior en el caso del metanol 80%, el cual obtuvo la mayor  $CA_{FRAP}$  (0,101 mmol  $Fe^{+2}$ /g RF).

Se evidenció que la  $CA_{FRAP}$  correlacionó de manera significativa con el contenido total de fenoles (FT) para todos los sistemas de extracción planteados, siendo los extractos en 2 etapas con  $C_{AF}=0,5\%$  los de correlación más fuerte ( $R^2 0,96$ ,  $p \leq 0,001$ ).

El extracto acuoso del tejido residual de la industrialización de frutilla no produjo inhibición de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Newport* y *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, no se podría descartar una potencial actividad antimicrobiana de estos extractos. Se podría realizar el ensayo con un extracto concentrado, es decir, con mayor concentración de compuestos fenólicos de este, o con las distintas fracciones de compuestos fenólicos, luego de una etapa de purificación y fraccionamiento de los extractos crudos.

El extracto acuoso del residuo de la industrialización de frutilla (0.24 g AGE/L) produjo 30% de inhibición de la enzima PPO de manzana 'Red Delicious', en una inhibición reversible de tipo 'incompetitivo', 15% menor que la inhibición alcanzada con una solución de mayor concentración del antioxidante ácido ascórbico (0.40 g/L).

Finalmente, podemos concluir que este estudio arrojó información muy valiosa sobre el aprovechamiento de los tejidos de frutillas residuos de la agroindustria como una excelente fuente de productos con valor agregado como los compuestos fenólicos, con actividad antioxidante de potencial importancia a nivel industrial. De esta manera, los compuestos fenólicos extraídos podrían utilizarse en la industria de los alimentos como inhibidores naturales del pardeamiento enzimático y como fuente de compuestos

nutraceúticos. Además, la obtención de compuestos bioactivos con propiedades promotoras para la salud a partir de estos tejidos vegetales permite dar un aprovechamiento eficiente a un tejido que actualmente se destina a los rellenos sanitarios, alimento animal o abono, disminuyendo así los costos de su disposición final,

# **5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaby, K., Ekeberg, D., Skrede, G., 2007. Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Fruits by Different HPLC Detectors and Contribution of Individual Compounds to Total Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4395–4406. <https://doi.org/10.1021/jf0702592>
- Aaby, K., Mazur, S., Nes, A., Skrede, G., 2012. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chem.* 132, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.037>
- Adjé, F., Lozano, Y.F., Lozano, P., Adima, A., Chemat, F., Gaydou, E.M., 2010. Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. *Ind. Crops Prod.* 32, 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.06.011>
- Al-Zoreky, N.S., 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.002>
- AL Juhaimi, F., 2014. Citrus fruits by-products as sources of bioactive compounds with antioxidant potential. *Pakistan J. Bot.* 46, 1459–1462.
- Alvarez-Parrilla, E., De la Rosa, L., Rodrigo-Garcia, J., Escobedo-González, R., Mercado Mercado, G., Moyers, E., Vazquez-Flores, A., Aguilar, G., 2007. Dual effect of  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) on the inhibition of apple polyphenol oxidase by 4-hexylresorcinol (HR) and methyl jasmonate (MJ). *Food Chem.* 101, 1346–1356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.040>
- Amaya, L., Portillo, C., 2013. Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el Ingenio Chaparrastique por el método de espectrofotometría Ultravioleta-Visible. (Tesis Pregr.
- Amic, D., Davidović-Amić, D., Beslo, D., Trinajstić, N., 2003. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croat. Chem. Acta* 76, 55–61.
- Apak, R., Tütem, E., Özyürek, M., Güçlü, K., 2011. Antioxidant Activity/Capacity Assay Methods Applied to Fruit and Cereals. pp. 361–383. <https://doi.org/10.1201/b10786-23>
- Aristizábal Marulanda, V., 2015. Jet biofuel production from agroindustrial wastes through furfural platform. Universidad Nacional de Colombia.
- Asami, D., Hong, Y.-J., Barrett, D., Mitchell, A., 2003. Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grown Using Conventional, Organic, and Sustainable Agricultural Practices. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1237–1241. <https://doi.org/10.1021/jf020635c>
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* 117, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Başlar, M., Ertugay, M., 2013. The effect of ultrasound and photosonation treatment on

- polyphenoloxidase (PPO) activity, total phenolic component and colour of apple juice. *Int. J. Food Sci. Technol.* 48. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12015>
- Basu, A., Nguyen, A., Betts, N.M., Lyons, T.J., 2014. Strawberry As a Functional Food: An Evidence-Based Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54, 790–806. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.608174>
- Benzie, I., Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bonnet, R., Bru, J.-P., Caron, F., Cattoen, C., Dubreuil, L., Jarlier, V., Lefort, A., Nicolas-Chanoine, M.-H., WEBER, P., 2017. Recommandations 2017 du Comité de l’antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Société Française Microbiol.* 1, 125.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25–30. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brandt, R.B., Laux, J.E., Yates, S.W., 1987. Calculation of inhibitor  $K_i$  and inhibitor type from the concentration of inhibitor for 50% inhibition for Michaelis-Menten enzymes. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 37, 344–349. [https://doi.org/10.1016/0885-4505\(87\)90046-6](https://doi.org/10.1016/0885-4505(87)90046-6)
- Bratt, K., Sunnerheim, K., Bryngelsson, S., Fagerlund, A., Engman, L., Andersson, R., Dimberg, L., 2003. Avenanthramides in Oats (*Avena sativa* L.) and Structure–Antioxidant Activity Relationships. *J. Agric. Food Chem.* 51, 594–600. <https://doi.org/10.1021/jf020544f>
- Brenna, M., 2019. Cadena de Frutillas - Resumen.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., Velić, D., 2007. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng.* 81, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027>
- Buendía, B., Gil, M.I., Tudela, J.A., Gady, A.L., Medina, J.J., Soria, C., López, J.M., Tomás-Barberán, F.A., 2010. HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3916–3926. <https://doi.org/10.1021/jf9030597>
- Bunte, K., Hensel, A., Beikler, T., 2019. Polyphenols in the prevention and treatment of periodontal disease: A systematic review of in vivo, ex vivo and in vitro studies. *Fitoterapia* 132, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.11.012>
- Buřičová, L., Andjelkovic, M., Čermáková, A., Réblová, Z., Jurček, O., Kolehmainen, E., Verhé, R., Kvasnička, F., 2011. Antioxidant capacity and antioxidants of strawberry, blackberry, and raspberry leaves. *Czech J. Food Sci.* 29, 181–189. <https://doi.org/10.17221/300/2010-cjfs>
- Camelo, A., Benítez-Páez, A., Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R., Mira, A., 2013. *Streptococcus dentisani* sp. nov. a new member of the Mitis group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64. <https://doi.org/10.1099/ijfs.0.054098-0>
- Canica, M., Manageiro, V., Abriouel, H., Moran-Gilad, J., Franz, C.M.A.P., 2019. Antibiotic resistance in foodborne bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 84, 41–44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.001>
- Cantos-Villar, E., Tudela, J.A., Gil, M., Espín, J.C., 2002. Phenolic Compounds and Related Enzymes Are Not Rate-Limiting in Browning Development of Fresh-Cut

- Potatoes. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3015–3023. <https://doi.org/10.1021/jf0116350>
- Caravaca, A.M.G., Verardo, V., Segura Carretero, A., Caboni, M., Fernández-Gutiérrez, A., 2008. Development of a Rapid Method to Determine Phenolic and Other Polar Compounds in Walnut by Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1209, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.117>
- Cartaya, O., Reynaldo, I., 2001. Reseña bibliográfica FLAVONOIDES : CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y APLICACIONES O . Cartaya ✉ e Inés Reynaldo. *Cultiv. Trop.* 22, 5–14.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., Galán-Vidal, C.A., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* 113, 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>
- Castro-López, C., Ventura-Sobrevilla, J.M., González-Hernández, M.D., Rojas, R., Ascacio-Valdés, J.A., Aguilar, C.N., Martínez-Ávila, G.C.G., 2017. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chem.* 237, 1139–1148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.032>
- Chan, S.W., Lee, C.Y., Yap, C.F., Wan mustapha, W., Chun Wai, H., 2009. Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *Int. Food Res. J.* 16, 203–213.
- Chen, Z.-Y., Zhu, Q., Tsang, D., Huang, Y., 2001. Degradation of Green Tea Catechins in Tea Drinks. *J. Agric. Food Chem.* 49, 477–482. <https://doi.org/10.1021/jf000877h>
- Chu, Y., Sun, J., Wu, X., Liu, R., 2002. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6910–6916. <https://doi.org/10.1021/jf020665f>
- Cisneros-Zevallos, L., 2003. The Use of Controlled Postharvest Abiotic Stresses as a Tool for Enhancing the Nutraceutical Content and Adding-Value. *Concise Rev. Hypotheses Food Sci.* 68, 1560–1565.
- Colizzi, C., 2019. The protective effects of polyphenols on Alzheimer's disease: A systematic review. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* 5, 184–196. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.09.002>
- Cooper, R., Nicola, G., 2014. Natural Products Chemistry. *Nat. Prod. Chem.* 139, 400. <https://doi.org/10.1201/b17244>
- Cordenunsi, B., Genovese, M., Nascimento, J., Hassimotto, N., Santos, R., Lajolo, F., 2005. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chem.* 91, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.054>
- Cox, M., Nelson, D., 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Wh Freeman. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-08289-8>
- Crecente Campo, J., Damaceno, M., Rodriguez, R., Oderiz, M., 2012. Color, anthocyanin pigment, ascorbic acid and total phenolic compound determination in organic versus conventional strawberries (*Fragaria×ananassa* Duch, cv Selva). *J. Food Compos. Anal.* 28, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.07.004>
- Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., Ibrić, S., 2016. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem.* 194, 135–142.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.008>

- da Silva Pinto, M., Lajolo, F.M., Genovese, M.I., 2008. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chem.* 107, 1629–1635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.038>
- Dai, J., Gupte, A., Gates, L., Mumper, R.J., 2009. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* 47, 837–847. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.016>
- Davey, M.W., Montagu, M. Van, Inz, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D., Fletcher, J., Davey, M.W., Montagu, M. Van, Inze, D., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D., Fletcher, J., 2000. Review Plant L -ascorbic acid : chemistry , function , metabolism , bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* 860, 825–860. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(20000515\)80:7<825::aid-jsfa598>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(20000515)80:7<825::aid-jsfa598>3.0.co;2-6)
- Davin, L., Lewis, N., 2003. A historical perspective on lignan biosynthesis: Monolignol, allylphenol and hydroxycinnamic acid coupling and downstream metabolism. *Phytochem. Rev.* 2, 257–288. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000046175.83729.b5>
- Davis, C., Markey, C., Busch, M., Busch, K., 2007. Determination of Capsaicinoids in Habanero Peppers by Chemometric Analysis of UV Spectral Data. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5925–5933. <https://doi.org/10.1021/jf070413k>
- de la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Moyers-Montoya, E., Villegas-Ochoa, M., Ayala-Zavala, J.F., Hernández, J., Ruiz-Cruz, S., González-Aguilar, G.A., 2011. Mechanism for the inhibition of apple juice enzymatic browning by Palo Fierro (desert ironweed) honey extract and other natural compounds. *LWT - Food Sci. Technol.* 44, 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.030>
- De Laurentiis, V., Corrado, S., Sala, S., 2018. Quantifying household waste of fresh fruit and vegetables in the EU. *Waste Manag.* 77, 238–251. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.04.001>
- de Oliveira Carvalho, J., Orlanda, J.F.F., 2017. Heat stability and effect of pH on enzyme activity of polyphenol oxidase in buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) fruit extract. *Food Chem.* 233, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.101>
- Deng, Y., Yang, G., Yue, J., Qian, B., Liu, Z., Wang, D., Zhong, Y., Zhao, Y., 2014. Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. *Food Control* 38, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.023>
- Dimitrios, B., 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.004>
- Dixon, M., 1953. The Determination of Enzyme Inhibitor Constants 170–171.
- Domínguez-Rodríguez, G., Marina, M.L., Plaza, M., 2017. Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants. *J. Chromatogr. A* 1514, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.066>
- Dorta, E., González, M., Lobo, M.G., Sánchez-Moreno, C., de Ancos, B., 2014. Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food Res. Int.* 57, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.012>
- Downey, M.O., Mazza, M., Krstic, M.P., 2007. Development of a Stable Extract for



- Anthocyanins and Flavonols from Grape Skin 3, 358–364.
- Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K., Blomhoff, R., 2003. Several Culinary and Medicinal Herbs Are Important Sources of Dietary Antioxidants. *J. Nutr.* 133, 1286–1290. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1286>
- Draper, N., Smith, H., 2014. *Applied Regression Analysis*, Third Edition. pp. 327–368. <https://doi.org/10.1002/9781118625590.ch15>
- Duque, C., Morales, A., 2005. El aroma frutal de Colombia, *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Duru, M., 2012. Effects of Dietary Strawberry (*Fragaria x ananassa*) Leaf Powder on Growth Performance, Body Components and Digestive System of Broiler Chicks. *Int. J. Agric. Biol.* 14, 621–624.
- El Gharras, H., 2009. Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 2512–2518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x>
- El Seoud, O.A., 2009. Understanding solvation. *Pure Appl. Chem.* 81, 697–707. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-08-09-27>
- Ellison, S.L.R., Barwick, V.J., Farrant, T.J.D., 2009. *Practical Statistics for the Analytical Scientist*. The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847559555>
- Eraso, C.A.G., 2009. INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA POLIFENOL OXIDASA EXTRAÍDA DEL BANANO (*Cavendish valery*) MEDIANTE SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS CON ISOESPINTANOL Y ÁCIDO ASCÓRBICO 91.
- Escarpa, A., González, M.C., 1998. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *J. Chromatogr. A* 823, 331–337. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00294-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00294-5)
- Fan, J.P., Xu, X.K., Shen, G.L., Zhang, X.H., 2015. Measurement and correlation of the solubility of genistin in eleven organic solvents from T = (283.2 to 323.2) K. *J. Chem. Thermodyn.* 89, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2015.05.019>
- Fang, Z., Zhang, M., Sun, Y., Sun, J., 2007. Polyphenol oxidase from bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) and its role in anthocyanin degradation. *Food Chem.* 103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.044>
- FAO, 2019. *El estado mundial de la agricultura y la alimentación*, Idesia. Roma. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292014000300001>
- Fecka, I., 2009. Development of chromatographic methods for determination of agrimoniin and related polyphenols in pharmaceutical products. *J. AOAC Int.* 92, 410–418. <https://doi.org/10.1093/jaoac/92.2.410>
- Feng, J., Yang, X.-W., Wang, R.-F., 2011. Bio-assay guided isolation and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from the leaves of *Aquilaria sinensis*. *Phytochemistry* 72, 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.11.025>
- Ferlemi, A.-V., Lamari, F., 2016. Berry Leaves: An Alternative Source of Bioactive Natural Products of Nutritional and Medicinal Value. *Antioxidants* 5. <https://doi.org/10.3390/antiox5020017>
- Fernández-Agulló, A., Pereira, E., Freire, M.S., Valentão, P., Andrade, P.B., González-álvarez, J., Pereira, J.A., 2013. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Ind. Crops*

- Prod. 42, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.021>
- Fernando Reyes, L., Emilio Villarreal, J., Cisneros-Zevallos, L., 2007. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chem.* 101, 1254–1262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.032>
- Fracassetti, D., Costa, C., Moulay, L., Tomás-Barberán, F.A., 2013. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). *Food Chem.* 139, 578–588. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.121>
- Galván D'Alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, I., Dimitrov, K., 2012. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Sep. Sci. Technol.* 93, 42–47.
- García, F.S., Vergara, J., 2017. agrícolas ( Cascarilla de Arroz , Bagazo de Caña , Zuro de Maíz ) 2, 570–585. <https://doi.org/10.23857/casedelpo.2017.2.8.agos.570-585>
- Garzón, M.A.G., Rojano, B.A., Guerrero, C.A., 2012. Inhibición de la polifenoloxidas extraída del banano (cavendish) por medio de algunos derivados del isoespintanol. *Corporación Univ. Lasallista* 193–248.
- Gasull, E., Becerra, D., 2006. Caracterización de Polifenoloxidas Extraída de Pera (cv. Packam's Triumph) y Manzana (cv. Red Delicious) . *Inf. tecnológica* .
- Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H., 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4988–4994. <https://doi.org/10.1021/jf9001439>
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J., Quiles, J., Mezzetti, B., Battino, M., 2012. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* 28, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>
- Gil, M., Rojano, B., Guerrero, C., 2012. Inhibición de la polifenoloxidas extraída del banano (cavendish) por medio de algunos derivados del isoespintanol.
- Gómez-Merino, F., Trejo-Téllez, L., Velasco-Velasco, J., Lara-Capistrán, L., 2016. Herramientas Moleculares Para Estudios Ambientales De Actividades Agroindustriales. *Mol. Tools Environ. Stud. Agroindustrial Act.* 9, 3–9.
- Gooch, J., 2011. Kirby-Bauer Method. p. 903. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6247-8\\_14077](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6247-8_14077)
- Goyal, S., Lambert, C., Cluzet, S., Merillon, J.-M., Ramawat, K., 2012. Secondary Metabolites and Plant Defence, in: *Plant Defence: Biological Control*. pp. 109–138. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1933-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1933-0_5)
- Grene, R., 2002. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *Arab. B.* 1, e0036–e0036. <https://doi.org/10.1199/tab.0036.1>
- Grochowski, D.M., Skalicka-Woźniak, K., Orhan, I.E., Xiao, J., Locatelli, M., Piwowarski, J.P., Granica, S., Tomczyk, M., 2017. A comprehensive review of agrimoniin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1401, 166–180. <https://doi.org/10.1111/nyas.13421>
- Gu, C.-H., Li, H., Gandhi, R., Raghavan, K., 2004. Grouping solvents by statistical analysis of solvent property parameters: Implication to polymorph screening. *Int. J. Pharm.* 283, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.06.021>
- Guerrero-Beltran, J., Swanson, B., Barbosa-Cánovas, G., 2005. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. *LWT - Food Sci. Technol.* 38, 625–630.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.08.002>

- Guillory, J., 2007. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals Edited by Maryadele J. O'Neil, Patricia E. Heckelman, Cherie B. Koch, and Kristin J. Roman. Merck, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ. 2006. xiv + 2564 pp. 18 × 26 cm. ISBN13 978-0-91. J. Med. Chem. - J MED CHEM 50, 590. <https://doi.org/10.1021/jm068049o>
- Gündüz, K., 2015. Strawberry: Phytochemical Composition of Strawberry (*Fragaria × ananassa*), Nutritional Composition of Fruit Cultivars. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00030-1>
- Gunduz, K., Özdemir, E., 2014. The effects of genotype and growing conditions on antioxidant capacity, phenolic compounds, organic acid and individual sugars of strawberry. *Food Chem.* 155, 298–303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.064>
- Hacek, D.M., Suriano, T., Noskin, G.A., Kruszynski, J., Reisberg, B., Peterson, L.R., 1999. Medical and economic benefit of a comprehensive infection control program that includes routine determination of microbial clonality. *Am. J. Clin. Pathol.* 111, 647–654. <https://doi.org/10.1093/ajcp/111.5.647>
- Haminiuk, C.W.I., Maciel, G.M., Plata-Oviedo, M.S.V., Peralta, R.M., 2012. Phenolic compounds in fruits - an overview. *Int. J. Food Sci. Technol.* 47, 2023–2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>
- Hammes, G.G., 2007. Principles of chemical kinetics. *Methods Biochem. Anal.* 50, 75–96. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-321950-3.x5001-4>
- Hancock, J., Drake, C.A., Callow, P., Serce, S., 2005. Genetic Improvement of Beach Strawberry. *HortScience* 40, 1644–1645. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.6.1644>
- Hancock, J., Sjulín, T.M., Lobos, G., 2008. Strawberries, in: *Temperate Fruit Crop Breeding*. pp. 393–438. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6907-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6907-9_13)
- Hanhineva, K., Rogachev, I., Kokko, H., Mintz-Oron, S., Venger, I., Kärenlampi, S., Aharoni, A., 2008. Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria × ananassa*) flowers. *Phytochemistry* 69, 2463–2481. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.07.009>
- Hannum, S.M., 2004. Potential Impact of Strawberries on Human Health: A Review of the Science. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 1–17. <https://doi.org/10.1080/10408690490263756>
- Harbourne, N., Marete, E., Jacquier, J.C., O'Riordan, D., 2013. Stability of phytochemicals as sources of anti-inflammatory nutraceuticals in beverages - A review. *Food Res. Int.* 50, 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.009>
- He, Q., Luo, Y., 2007. Enzymatic browning and its control in fresh-cut produce. *Stewart Postharvest Rev.* 3, 1–7. <https://doi.org/10.2212/spr.2007.6.3>
- Hegazy, A., Ibrahim, M., 2012. Antioxidant Activities of Orange Peel Extracts. *World Appl. Sci. J.* 18. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.18.05.64179>
- Heinonen, M., 2007. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics - A Finnish perspective. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 684–691. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700006>
- Heinonen, S., Nurmi, T., Liukkonen, K., Poutanen, K., Wähälä, K., Deyama, T., Nishibe,

- S., Adlercreutz, H., 2001. In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3178–3186. <https://doi.org/10.1021/jf010038a>
- Hou, D.-X., 2003. Potential Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Anthocyanins. *Curr. Mol. Med.* 3, 149–159. <https://doi.org/10.2174/1566524033361555>
- Hu, N., Yu, J.-T., Tan, Lin, Wang, Y.-L., Sun, L., Tan, Lan, 2013. Nutrition and the risk of Alzheimer's disease. *Biomed Res. Int.* 2013, 524820. <https://doi.org/10.1155/2013/524820>
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Zhang, Y., 2010. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutr. Cancer* 62, 1–20. <https://doi.org/10.1080/01635580903191585>
- Ibrahim, D.S., Abd El-Maksoud, M.A.E., 2015. Effect of strawberry (*Fragaria × ananassa*) leaf extract on diabetic nephropathy in rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 96, 87–93. <https://doi.org/10.1111/iep.12116>
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 126, 1821–1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
- Ijaz, S., Akhtar, N., Khan, M.S., Hameed, A., Irfan, M., Arshad, M.A., Ali, S., Asrar, M., 2018. Plant derived anticancer agents: A green approach towards skin cancers. *Biomed. Pharmacother.* 103, 1643–1651. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.113>
- Jacobo-Velázquez, D.A., Martínez-Hernández, G.B., del C. Rodríguez, S., Cao, C.-M.M., Cisneros-Zevallos, L., 2011. Plants as Biofactories: Physiological Role of Reactive Oxygen Species on the Accumulation of Phenolic Antioxidants in Carrot Tissue under Wounding and Hyperoxia Stress. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6583–6593. <https://doi.org/10.1021/jf2006529>
- Jadhav, D., Gogate, P., Rathod, V., 2009. Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *J. Food Eng. - J FOOD ENG* 93, 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.007>
- Jadhav, P., Gurav, N., 2018. Extending the Storage and Post-storage Shelf-life of Strawberry Fruit cv. "Sweet Charlie" using Cold Storage 9, 532–542.
- Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M., Nicolas, J.J., 1990. Inhibition Studies on Apple Polyphenol Oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38, 926–931. <https://doi.org/10.1021/jf00094a002>
- Jeon, M., Zhao, Y., 2005. Honey in combination with vacuum impregnation to prevent enzymatic browning of fresh-cut apples. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 56, 165–176. <https://doi.org/10.1080/09637480500131053>
- Ju, Z.Y., Howard, L., 2003. Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5207–5213. <https://doi.org/10.1021/jf0302106>
- Jurica, K., Gobin, I., Kremer, D., Čepo, D.V., Grubešić, R.J., Karačonji, I.B., Kosalec, I., 2017. Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves. *J. Herb. Med.* 8, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.03.006>
- Kammerer, D., Claus, A., Schieber, A., Carle, R., 2006. A Novel Process for the Recovery of Polyphenols from Grape (*Vitis vinifera* L.) Pomace. *J. Food Sci. - J FOOD SCI* 70.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07077.x>

- Kang-Mu, L.E.E., Wan-Seok, K.I.M., Jeesun, L.I.M., Sunyoung, N.A.M., Youn, M.I.N., Seong-Won, N.A.M., Younghoon, K.I.M., Sae-Hun, K.I.M., Park, W., Park, S., 2009. Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechin gallate at concentrations below the MIC against enterohemorrhagic escherichia coli O157:H7. *J. Food Prot.* 72, 325–331.
- Kapasakalidis, P., Rastall, R., Gordon, M., 2006. Extraction of Polyphenols from Processed Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Residues. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4016–4021. <https://doi.org/10.1021/jf052999l>
- Kårlund, A., Salminen, J.-P., Koskinen, P., Ahern, J., Karonen, M., Tiilikkala, K., Karjalainen, R., 2014a. Polyphenols in Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Leaves Induced by Plant Activators. *J. Agric. Food Chem.* 62. <https://doi.org/10.1021/jf405589f>
- Kårlund, A., Salminen, J.P., Koskinen, P., Ahern, J.R., Karonen, M., Tiilikkala, K., Karjalainen, R.O., 2014b. Polyphenols in strawberry (*Fragaria × ananassa*) leaves induced by plant activators. *J. Agric. Food Chem.* 62, 4592–4600. <https://doi.org/10.1021/jf405589f>
- Karvela, E., Makris, D., Kalogeropoulos, N., Karathanos, V., Kefalas, P., 2009. Factorial design optimisation of grape (*Vitis vinifera*) seed polyphenol extraction. *Eur. Food Res. Technol.* 229, 731–742. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1105-1>
- Khoddami, A., Wilkes, M., Roberts, T., 2013. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* 18, 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Kim, D.-O., Lee, C., 2003. Extraction and Isolation of Polyphenolics. p. 11.2.1-11.2.12.
- Kim, M.J., Kim, C.Y., Park, I., 2005. Prevention of enzymatic browning of pear by onion extract. *Food Chem.* 89, 181–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.018>
- Kirschbaum, D.S., Hancock, J.F., 2000. The strawberry industry in South America. *HortScience* 35, 807–811.
- Kirschbaum, D.S., Sordo, M.H., Adlercreutz, E., Delmazzo, P.R., Pacheco, R.M., Misrendino, E., 2017. Panorama del cultivo de Frutilla en junio de 2017. *Boletín Frutas y Hortalizas del Conv. INTA-CMCSA* 61, 0–11. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.30332.64645>
- Koponen, J.M., Happonen, A.M., Mattila, P.H., Törrönen, A.R., 2007. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1612–1619. <https://doi.org/10.1021/jf062897a>
- La Rosa Toro, A., Vigo Lopez, F., Taípe, G., La, A., Toro, R., 2011. Evaluación de la actividad antioxidante del pisco peruano mediante voltametría cíclica. *Rev. la Soc. Química del Perú* 77, 127–134.
- Leyva-Jimenez, F.J., Lozano-Sanchez, J., Borrás-Linares, I., Cadiz-Gurrea, M. de la L., Mahmoodi-Khaledi, E., 2019. Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria. *Lwt* 101, 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.015>
- Lima, M.C., Paiva de Sousa, C., Fernandez-Prada, C., Harel, J., Dubreuil, J.D., de Souza, E.L., 2019. A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microb. Pathog.* 130, 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.025>

- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658–666. <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>
- Lizcano, L., Viloria-Bernal, M., Vicente, F., Berrueta, L., Gallo, B., Martinez-Canamero, M., Ruiz-Larrea, M.B., Ruiz-Sanz, J., 2012. Lipid Oxidation Inhibitory Effects and Phenolic Composition of Aqueous Extracts from Medicinal Plants of Colombian Amazonia. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 5454–5467. <https://doi.org/10.3390/ijms13055454>
- Los, F.G.B., Zielinski, A.A.F., Wojeicchowski, J.P., Nogueira, A., Demiate, I.M., 2019. Extraction Optimization of Phenolic Extracts from Carioca Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Using Response Surface Methodology. *Food Anal. Methods* 12, 148–159. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1347-2>
- Lupacchini, M., Mascitti, A., Giachi, G., Tonucci, L., d'Alessandro, N., Martinez, J., Colacino, E., 2017. Sonochemistry in non-conventional, green solvents or solvent-free reactions. *Tetrahedron* 73, 609–653. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.12.014>
- Mabesoone, M.F.J., Palmans, A.R.A., Meijer, E.W., 2020. Solute–Solvent Interactions in Modern Physical Organic Chemistry: Supramolecular Polymers as a Muse. *J. Am. Chem. Soc.* 142, 19781–19798. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c09293>
- Macgowan, A., Macnaughton, E., 2017. Antibiotic resistance. *Medicine (Baltimore)*. 45. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006>
- Machado, A., Pasquel, J., Barbero, G., Martínez, J., 2015. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: A comparison with conventional methods. *Food Res. Int.* 77, 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.042>
- Macías, A., Hurtado, J., Cedeño, D., Vite, F., María, S., Vallejo, P., 2018. Introducción al estudio de la Bioquímica, 1st ed, 3ciencias. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17993/CcyLI.2018.28>
- Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C.B., Gasson, M.J., Narbad, A., 2007. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2056–2064. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03456.x>
- Mandave, P., Rani, S., Kuvalekar, A., Ranjekar, P., 2013. Antiglycation, antioxidant and antidiabetic activity of mature Strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* 4, 168.
- Marcus, Y., 1993. The properties of organic liquids that are relevant to their use as solvating solvents. *Chem. Soc. Rev.* 22, 409–416. <https://doi.org/10.1039/CS9932200409>
- Markham, Ø.M.A.K.R., 2006. flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications, 1st ed. Taylor & Francis, New York.
- Martín, E.L., 2011. Inhibición de la enzima polifenoloxidasas de frutas destinadas al mínimo procesamiento mediante el uso de antioxidantes sintéticos y de origen natural. Universidad Nacional del Litoral.
- Martínez-Ramos, T., Benedito-Fort, J.J., Watson, N.J., Ruiz-López, I.I., Che-Galicia, G., Corona-Jiménez, E., 2020. Effect of solvent composition and its interaction with ultrasonic energy on the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food Bioprod. Process.* <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.03.011>
- Mejias-Brizuela, N.Y., Orozco Guillén, E., Galan, N., 2016. Aprovechamiento de los

- residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Rev. Ciencias Ambient. y Recur. Nat.* 2, 27–41.
- Mercado Mercado, G., López Teros, V., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G.A., Alvarez Parrilla, E., Sáyago Ayerdi, S.G., 2018. Efecto de la extracción asistida por ultrasonido en la liberación y bioaccesibilidad in vitro de carotenoides, en bebidas elaboradas con mango (*Mangifera indica* L.) 'Ataulfo.' *Nov. Sci.* 10, 100. <https://doi.org/10.21640/ns.v10i20.1277>
- Michaelis, L., Menten, M.L., Johnson, K.A., Goody, R.S., 2011. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* 50, 8264–8269. <https://doi.org/10.1021/bi201284u>
- Michiels, J.A., Kevers, C., Pincemail, J., Olivier, J., Dommès, J., 2012. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chem.* 130, 986–993. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.117>
- Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R., 2012. HPLC-MS n identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. *Food Chem.* 135, 2138–2146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.115>
- Milala, J., Kosmala, M., Karlińska, E.E., Juśkiewicz, J., Zduńczyk, Z., Fotschki, B., 2017. Ellagitannins from Strawberries with Different Degrees of Polymerization Showed Different Metabolism through Gastrointestinal Tract of Rats. *J. Agric. Food Chem.* 65, 10738–10748. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04120>
- Moilanen, J., 2015. Ellagitannins in Finnish Plant Species - Characterization, Distribution and Oxidative Activity.
- Mokrani, A., Madani, K., 2016. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit, Separation and Purification Technology. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.043>
- Monrad, J., Howard, L., J.W, K., Srinivas, K., Mauromoustakos, A., 2010. Subcritical Solvent Extraction of Anthocyanins from Dried Red Grape Pomace. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2862–2868. <https://doi.org/10.1021/jf904087n>
- Montenegro, S., Orozco, M., Betancur, J., 2014. Cachaza y carbonilla: residuos agroindustriales con potencial de fertilización biológica nitrogenada. *Rev. Investig. Agrar. y Ambient.* 6, 83–89. <https://doi.org/10.22490/21456453.1265>
- Morante Carriel, J., Agnieszka Obrebska, A., Nieto Rodríguez, J.E., Carranza Patiño, M.S., Pico-Saltos, R., Bru-Martínez, R., 2014. Distribución, Localización E Inhibidores De Las Polifenol Oxidasas En Frutos Y Vegetales Usados Como Alimento. *Cienc. y Tecnol.* 7, 23–31. <https://doi.org/10.18779/cyt.v7i1.95>
- Motulsky, H., Christopoulos, A., 2003. Fitting curves with GraphPad Prism, Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression. <https://doi.org/10.1002/pst.167>
- Mudnic, I., Modun, D., Brizic, I., Vukovic, J., Generalic, I., Katalinic, V., Bilusic, T., Ljubenkovic, I., Boban, M., 2009. Cardiovascular effects in vitro of aqueous extract of wild strawberry (*Fragaria vesca*, L.) leaves. *Phytomedicine* 16, 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.11.004>
- Muñoz, C., Chavez, R., Ludy, C., Rendón, F., Margarita, R., Ángela, M., C, W.M., R, W.C., Pabón, L.C., F, M.R.R., Otálvaro-álvarez, Á.M., 2015. Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa

- (*Campomanesia lineatifolia*). Rev. CENIC. Ciencias Químicas 46, 38–46.
- Na, M., Phuong, T., Bae, K.H., 2011. Natural compounds with antioxidant activity: Recent findings from studies on medicinal plants. Nat. Prod. Sci. 17, 65–79.
- Naeem, S., Ali, M., Mahmood, A., 2012. Optimization of extraction conditions for the extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* leaves. Pak. J. Pharm. Sci. 25, 535–541.
- Naemura, A., Mitani, T., Ijiri, Y., Tamura, Y., Yamashita, T., Okimura, M., Yamamoto, J., 2005. Antithrombotic effect of strawberries. Blood Coagul. Fibrinolysis - BLOOD COAGULAT FIBRINOL 16, 501–509.  
<https://doi.org/10.1097/01.mbc.0000184737.50594.a8>
- Navia-CUETIA, C., ZEMANATE-CORDOBA, Y., MORALES-VELASCO, S., PRADO, F., ALBÁN LÓPEZ, N., 2013. EVALUACIÓN DE DIFERENTES FORMULACIONES DE COMPOSTAJE A PARTIR DE RESIDUOS DE COSECHA DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*). Biotecnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial 11, 165–173.
- Nicolas, J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J., Aubert, S., 1994. Enzymatic Browning Reactions in Apple and Apple Products, Critical Reviews in Food Science and Nutrition. <https://doi.org/10.1080/10408399409527653>
- Nirmal, N.P., Benjakul, S., 2011. Use of tea extracts for inhibition of polyphenoloxidase and retardation of quality loss of Pacific white shrimp during iced storage. LWT - Food Sci. Technol. 44, 924–932. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.007>
- Noipa, T., Srijaranai, S., Tuntulani, T., Ngeontae, W., 2011. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. Food Res. Int. - FOOD RES INT 44, 798–806.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.034>
- Nowicka, A., Kucharska, A.Z., Sokół-Łętowska, A., Fecka, I., 2019. Comparison of polyphenol content and antioxidant capacity of strawberry fruit from 90 cultivars of *Fragaria × ananassa* Duch. Food Chem. 270, 32–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.015>
- Oh, E., Jeon, B., 2015. Synergistic anti-*Campylobacter jejuni* activity of fluoroquinolone and macrolide antibiotics with phenolic compounds. Front. Microbiol. 6, 1–9.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01129>
- Oszmia, J., Wojdyl, A., 2011. Jf203052J[1].Pdf 12830–12835.
- Oszmiański, J., Wojdyło, A., Gorzelany, J., Kapusta, I., 2011. Identification and characterization of low molecular weight polyphenols in berry leaf extract by HPLC-DAD and LC-ESI/MS. J. Agric. Food Chem. 59, 12830–12835.  
<https://doi.org/10.1021/jf203052j>
- Pagani, M., 2011. Análisis de factibilidad de Exportación de Frutillas frescas de la región Centro Este de la provincia de Santa Fe hacia nuevos mercados internacionales. Universidad Abierta Interamericana.
- Palma, D., Zavala, J., J.C., C.-R., Ruiz-Maldonado, E., Salgado-García, S., 2016. USO DE RESIDUOS DE LA AGROINDUSTRIA DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum spp.*) PARA ELABORAR ABONOS ORGÁNICOS. Agroproductividad 9, 29–34.
- Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G.G., McHugh, T.H., 2011. Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. Ultrason. Sonochem. 18, 1249–1257. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.01.005>



- Pefaur, J., 2014. El Mercado de las frutillas, Odepa.
- Peng, Y., Zhang, Y., Ye, J., 2008. Determination of Phenolic Compounds and Ascorbic Acid in Different Fractions of Tomato by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1838–1844. <https://doi.org/10.1021/jf0727544>
- Pereira, P., Cebola, M.-J., Bernardo-Gil, G., 2012. Comparison of antioxidant activity in extracts of *Myrtus communis* L. obtained by SFE vs solvent extraction. *J. Environ. Sci. Eng. A* 1, 115–120.
- Perez-Gregorio, M.R., Simal-Gandara, J., 2017. A Critical Review of the Characterization of Polyphenol-Protein Interactions and of Their Potential Use for Improving Food Quality. *Curr. Pharm. Des.* 23, 2742–2753. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170202112530>
- Piagentini, A.M., Güemes, D.R., Pirovani, M.E., 2003. Mesophilic Aerobic Population of Fresh-cut Spinach as Affected by Chemical Treatment and Type of Packaging Film. *J. Food Sci.* 68, 602–606. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05717.x>
- Piagentini, A.M., Pirovani, M.E., 2017. Total Phenolics Content, Antioxidant Capacity, Physicochemical Attributes, and Browning Susceptibility of Different Apple Cultivars for Minimal Processing. *Int. J. Fruit Sci.* 17, 102–116. <https://doi.org/10.1080/15538362.2016.1262304>
- Pineli, L. de L. d. O., Moretti, C.L., dos Santos, M.S., Campos, A.B., Brasileiro, A. V., Córdova, A.C., Chiarello, M.D., 2011. Antioxidants and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars at different ripeness stages. *J. Food Compos. Anal.* 24, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.05.004>
- Pizzocaro, F., TORREGGIANI, D., GILARDI, G., 2007. Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. *J. Food Process. Preserv.* 17, 21–30. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1993.tb00223.x>
- Putnik, Predrag, Bursać Kovačević, D., Dragović-Uzelac, V., 2016. Optimizing Acidity and Extraction Time for Polyphenolic Recovery and Antioxidant Capacity in Grape Pomace Skin Extracts with Response Surface Methodology Approach. *J. Food Process. Preserv.* 40, 1256–1263. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12710>
- Putnik, P., Kovačević, D.B., Radojčin, M., Dragović-Uzelaca, V., 2016. Influence of acidity and extraction time on the recovery of flavonoids from grape skin pomace optimized by response surface methodology. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 30, 455–464. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2016.914>
- Putnik, P., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Roohinejad, S., Jambrak, A.R., Granato, D., Montesano, D., Kovačević, D.B., 2018. Novel food processing and extraction technologies of high-added value compounds from plant materials. *Foods* 7. <https://doi.org/10.3390/foods7070106>
- Queiroz, C., Lopes, M., Fialho, E., Valente-Mesquita, V., 2008. Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Rev. Int. - FOOD REV INT* 24, 361–375. <https://doi.org/10.1080/87559120802089332>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L., 2011. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 50, 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Quirós B., A.M., 2016. Obtención de un extracto etanólico en polifenoles a partir de un subproducto del procesamiento industrial de mora. *Univ. Costa Rica* 90.

- Radenkovs, V., Juhnevica-Radenkova, K., Górnas, P., Seglina, D., 2018. Non-waste technology through the enzymatic hydrolysis of agro-industrial by-products. *Trends Food Sci. Technol.* 77, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.013>
- Rajbhar, K., Dawda, H., Mukundan, U., 2015. POLYPHENOLS : METHODS OF EXTRACTION 5, 1–6.
- Ramírez-Cortina, C., Alonso-Gutiérrez, M., Rigal, L., 2012. Valorización de residuos agroindustriales del tequila para alimentación de rumiantes. *Rev. Chapingo. Ser. ciencias For. y del Ambient.* 18, 449–457. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.08.059>
- Ramirez, L.S., Marin Castaño, D., 2009. METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Sci. Tech.* 263–268.
- Rana, R., Gulliya, B., 2019. Chemistry and Pharmacology of Flavonoids- A Review. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 53, 8–20. <https://doi.org/10.5530/ijper.53.1.3>
- Reichardt, C., 1984. *Solvent Effects in Organic Chemistry.*
- Reichardt, C., Welton, T., 2010. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry: Fourth Edition.* Solvents Solvent Eff. Org. Chem. Fourth Ed. <https://doi.org/10.1002/9783527632220>
- Restrepo, A., Rodríguez, E., Manjarrés, K., 2011. Cortezas de naranja comestibles: una aproximación al desarrollo de productos con valor agregado a partir de residuos agroindustriales. *Prod. + Limpia* 6, 47–57. <https://doi.org/10.1134/S1560354712020013>
- RESTREPO D, A., & CORTÉS R, M., & ROJANO, B., 2010. DE FRESA ( *Fragaria ananassa* Duch . ) POR INCORPORACIÓN. *Vitae, Rev. La Fac. Química Farm.* 17, 135–140.
- Reuveni, S., Urbakh, M., Klafter, J., 2014. Role of substrate unbinding in Michaelis-Menten enzymatic reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 4391–4396. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318122111>
- Rezaie, M., Farhoosh, R., Iranshahi, M., Sharif, A., Golmohamadzadeh, S., 2015. Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties. *Food Chem.* 173, 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.081>
- Ricce, C., Leyva, M., Medina, I., Miranda, J., Saldarriaga, L., Rodriguez, J., Siche, R., 2013. Using waste of La Libertad agroindustry in developing a bread. *Agroindustrial Sci.* 3, 41–46. <https://doi.org/10.17268/agroind.science.2013.01.05>
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66, 401–436. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(99\)00093-x](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(99)00093-x)
- Rocha, A.M.C.N., Morais, A.M.M.B., 2001. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from “Jonagored” apple. *Food Control* 12, 85–90. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(00\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(00)00026-8)
- Rodríguez-Arzuaga, M., Piagentini, A.M., 2018. New antioxidant treatment with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) infusion for fresh-cut apples: Modeling, optimization, and acceptability. *Food Sci. Technol. Int.* 24, 223–231.

<https://doi.org/10.1177/1082013217744424>

- Rodríguez-Arzuaga, M., Ríos, G., Piagentini, A.M., 2019. Mild heat treatments before minimal processing reduce browning susceptibility and increase total phenolic content of low-chill apple cultivars. *J. Food Process. Preserv.* 43, 1–10.  
<https://doi.org/10.1111/jfpp.14209>
- Rodríguez-Arzuaga, M., Salsi, M.S., Piagentini, A.M., 2020. Storage quality of fresh-cut apples treated with yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *J. Food Sci. Technol.*  
<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04528-w>
- Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., Cocero, M.J., 2012. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *J. Food Eng.* 109, 98–103.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.029>
- Rodríguez Saucedo, E.N., 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai* 153–170.  
<https://doi.org/10.35197/rx.07.01.2011.14.er>
- Rong, T., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* 2, 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Roopchand, D., Krueger, C., Moskal, K., Fridlender, B., Lila, M., Raskin, I., 2013. Food-compatible method for the efficient extraction and stabilization of cranberry pomace polyphenols. *Food Chem.* 141, 3664–3669.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.050>
- Rosas, M., Rafols, C., Ortega, J., Bosch, E., 1995. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2* Volume issue 8 1995 [doi 10.1039\_P29950001607] Rosas, Marti; Rafols, Clara; Ortega, Jose; Bosch, Elisabet -- Solute\_solvent and solvent\_solvent .pdf 1.
- Rotbart, T., Reuveni, S., Urbakh, M., 2018. Single-molecule theory of enzymatic inhibition. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02995-6>
- Safdar, M.N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., Saddozai, A.A., 2017. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *J. Food Drug Anal.* 25, 488–500.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>
- Şahin, S., Aybastier, Ö., Işık, E., 2013. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology. *Food Chem.* 141, 1361–1368.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.003>
- Şahin, S., Şamli, R., 2013. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* 20, 595–602. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.029>
- Salaheen, S., Nguyen, C., Hewes, D., Debabrata, B., 2014. Cheap extraction of antibacterial compounds of berry pomace and their mode of action against the pathogen *Campylobacter jejuni*. *Food Control* 46, 174–181.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.026>
- Salaheen, S., Peng, M., Joo, J., Teramoto, H., Biswas, D., 2017. Eradication and sensitization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to methicillin with bioactive extracts of berry pomace. *Front. Microbiol.* 8, 1–10.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00253>
- Sánchez, F., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R.M., Bastida, J., Francesc, V., Codina, C.,

2003. Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1008, 57–72. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00964-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00964-6)
- Sánchez, W., Murillo, E., Méndez, J., 2010. Antioxidant potential of agroindustrial residues from three high consumption fruits in Tolima. *Sci. et. Tech.* 46, 138–143.
- Sanhueza, L., Melo, R., Montero, R., Maisey, K., Mendoza, L., Wilkens, M., 2017. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS One* 12, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172273>
- Sant'Anna, V., Brandelli, A., Marczak, L.D.F., Tessaro, I.C., 2012. Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Sep. Purif. Technol.* 100, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.09.004>
- Sargent, D., Clarke, J., Simpson, D., Tobutt, K., Arús, P., Monfort, A., Vilanova, S., Denoyes, B., Rousseau-Gueutin, M., Folta, K., Bassil, N., Battey, N., 2006. An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *Theor. Appl. Genet.* 112, 1349–1359. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0237-y>
- Satish Kuchi, V., Sai Ratna Sharavani, C., 2019. Fruit Physiology and Postharvest Management of Strawberry, in: *Strawberry - Pre- and Post-Harvest Management Techniques for Higher Fruit Quality*. pp. 1–20. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84205>
- Saval, S., 2012. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro. *BioTecnología* 16, 14–46.
- Schofield, P., Mbugua, D., Pell, A., 2001. Analysis of condensed tannins: A review. *Anim. Feed Sci. Technol. - ANIM FEED SCI TECH* 91, 21–40. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)
- Serna Cock, L., Torres León, C., 2015. Potencial agroindustrial de cáscaras de mango (*Mangifera indica*) variedades Keitt y Tommy Atkins. *Acta Agronómica* .
- Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K., 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* 67, 2058–2070. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.002>
- Shen, X., Sun, X., Xie, Q., Liu, H., Zhao, Y., Pan, Y., Hwang, C.A., Wu, V.C.H., 2014. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. *Food Control* 35, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.040>
- Sies, H., 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.* 69, 965–968. <https://doi.org/10.1007/BF01645140>
- Silva, F., Escribano, T., Alonso, J., Rivas-Gonzalo, J., Santos-Buelga, C., 2007. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT- Food Sci Technol. Lwt - Food Sci. Technol.* 40, 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.018>
- Simirgiotis, M.J., Schmeda-Hirschmann, G., 2010. Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* form *chiloensis*) using HPLC-DAD-ESI-MS and free radical quenching techniques. *J. Food Compos. Anal.* 23, 545–553. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.08.020>
- Simirgiotis, M.J., Theoduloz, C., Caligari, P.D.S., Schmeda-Hirschmann, G., 2009. Comparison of phenolic composition and antioxidant properties of two native Chilean

- and one domestic strawberry genotypes. *Food Chem.* 113, 377–385.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.043>
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144 LP – 158.
- Skupieñ, K., Oszmiañski, J., 2004. Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *Eur. Food Res. Technol.* 219, 66–70.  
<https://doi.org/10.1007/s00217-004-0918-1>
- Soares, A., 2014. *Strawberries - Cultivation, Antioxidant Properties and Health Benefits.* pp. 283–308.
- Sordo, M., Travadelo, M., Pernuzzi, C., 2017. Evolución del cultivo de frutilla en la provincia de Santa Fe (Argentina) en los últimos 50 años. *Hortintl.Cals.Ncsu.Edu* 36, 13–24.
- Soysal, Ç., 2009. Effect of green tea extract on golden delicious apple polyphenoloxidase and its browning. *J. Food Biochem.* 33, 134–148. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2008.00201.x>
- Spigno, G., Tramelli, L., Dante Marco, D.F., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng. - J FOOD ENG* 81, 200–208.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
- Srinivas, K., J.W, K., Monrad, J., Howard, L., Zhang, D., 2011. Pressurized solvent extraction of flavonoids from grape pomace utilizing organic acid additives. *Ital. J. Food Sci.* 23, 90–105.
- Stoyan, D., Högger, P., 2019. Screening of Inhibitory Effects of Polyphenols on Akt-Phosphorylation in Endothelial Cells and Determination of Structure-Activity Features. *Biomolecules* 9. <https://doi.org/10.3390/biom9060219>
- Sukhonthara, S., Kaewka, K., Theerakulkait, C., 2016. Inhibitory effect of rice bran extracts and its phenolic compounds on polyphenol oxidase activity and browning in potato and apple puree. *Food Chem.* 190, 922–927.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.016>
- Sulaiman, A., Soo, M.J., L., Y., Mohammed, F., M., S., 2015. Modeling the polyphenoloxidase inactivation kinetics in pear, apple and strawberry purees after High Pressure Processing. *J. Food Eng.* 147, 89–94.
- Szabo, K., Dulf, F.V., Diaconeasa, Z., Vodnar, D.C., 2019. Antimicrobial and antioxidant properties of tomato processing byproducts and their correlation with the biochemical composition. *Lwt* 116. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108558>
- Taghizadeh, S.F., Rezaee, R., Davarynejad, G., Karimi, G., Nemati, S.H., Asili, J., 2018. Phenolic profile and antioxidant activity of *Pistacia vera* var. Sarakhs hull and kernel extracts: the influence of different solvents. *J. Food Meas. Charact.* 12, 2138–2144.  
<https://doi.org/10.1007/s11694-018-9829-x>
- Takeuchi, T., Pereira, C.G., Braga, M.E., Maróstica, M.R., Leal, P.F., Meireles, M.A., 2008. Low-Pressure Solvent Extraction (Solid, Liquid Extraction, Microwave Assisted, and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants. *Extr. Bioact. Compd. Food Prod. Theory Appl.* 137–218. <https://doi.org/10.1201/9781420062397.ch4>
- Tamayo, L.M.A., Cartagena, C.J., Londoño, J.L., 2011. Aprovechamiento de residuos agroindustriales para mejorar la calidad sensorial y nutricional de productos avícolas. (Spanish). *Prod. + Limpia* 6, 108–127.

- Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M.M., Pavan, S., Montemurro, C., 2017. Polyphenol oxidases in crops: Biochemical, physiological and genetic aspects. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18020377>
- Teow, C.C., Truong, V. Den, McFeeters, R.F., Thompson, R.L., Pecota, K. V., Yencho, G.C., 2007. Antioxidant activities, phenolic and  $\beta$ -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chem.* 103, 829–838. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.033>
- Terefe, N., Yang, Y., Knoerzer, K., Buckow, R., Versteeg, C., 2010. High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.009>
- Thompson, L.U., Robb, P., Serraino, M., Cheung, F., 1991. Mammalian lignan production from various foods. *Nutr. Cancer* 16, 43–52. <https://doi.org/10.1080/01635589109514139>
- Tipton, K.F., 1996. Patterns of enzyme inhibition. *Enzymol. Labfax.* Acad. Press Inc., San Diego 115–174.
- Toivonen, P.M.A., Brummell, D.A., 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 48, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.004>
- Torres-Aguirre, G.A., Muñoz-Bernal, Ó.A., Álvarez-Parrilla, E., Núñez-Gastélum, J.A., Wall-Medrano, A., Sáyago-Ayerdi, S.G., de la Rosa, L.A., 2018. Optimización de la extracción e identificación de compuestos polifenólicos en anís (*Pimpinella anisum*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas. *Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* 21, 103–115. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.4>
- Torres, J., Varela, B., Garcia, M.T., Carilla, J., Matito, C., Centelles, J., Cascante, M., Sort, X., Bobet, R., 2003. Valorization of Grape (*Vitis vinifera*) Byproducts. Antioxidant and Biological Properties of Polyphenolic Fractions Differing in Procyanidin Composition and Flavonol Content. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7548–7555. <https://doi.org/10.1021/jf025868i>
- Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., Iinuma, M., 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 50, 27–34. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)85514-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)85514-0)
- Tulipani, S., Mezzetti, B., Capocasa, F., Bompadre, S., Beekwilder, J., De Vos, R., Capanoglu, E., Bovy, A., Battino, M., 2008. Antioxidants, Phenolic Compounds, and Nutritional Quality of Different Strawberry Genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 56, 696–704. <https://doi.org/10.1021/jf0719959>
- Valdés-hernández, G.V., Cruz-viera, L., Comet-rodríguez, R., 2015. Influencia de las condiciones de operación en la extracción de polifenoles a partir de hojas de *Moringa oleifera* Lam. *Rev. CENIC. Ciencias Químicas* 46, 135–145.
- Van de Velde, F., Esposito, D., Grace, M.H., Pirovani, M.E., Lila, M.A., 2019a. Anti-inflammatory and wound healing properties of polyphenolic extracts from strawberry and blackberry fruits. *Food Res. Int.* 121, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.059>
- Van de Velde, F., Esposito, D., Overall, J., Méndez-Galarraga, M.P., Grace, M., Élida Pirovani, M., Lila, M.A., 2019b. Changes in the bioactive properties of strawberries

- caused by the storage in oxygen- and carbon dioxide-enriched atmospheres. *Food Sci. Nutr.* 2527–2536. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1099>
- Van de Velde, Franco, Grace, M.H., Esposito, D., Pirovani, M.É., Lila, M.A., 2016. Quantitative comparison of phytochemical profile, antioxidant, and anti-inflammatory properties of blackberry fruits adapted to Argentina. *J. Food Compos. Anal.* 47, 82–91. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2016.01.008>
- Van de Velde, F., Grace, M.H., Pirovani, M.T., Lila, M.A., 2016. Impact of a new postharvest disinfection method based on peracetic acid fogging on the phenolic profile of strawberries. *Postharvest Biol. Technol.* 117. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.03.005>
- Van de Velde, F., Méndez-Galarraga, M.P., Grace, M.H., Fenoglio, C., Lila, M.A., Pirovani, M.É., 2019c. Changes due to high oxygen and high carbon dioxide atmospheres on the general quality and the polyphenolic profile of strawberries. *Postharvest Biol. Technol.* 148, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.10.015>
- Van De Velde, F., Tarola, A., Güemes, D., Pirovani, M., 2013. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Camarosa and Selva Strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Foods* 2, 120–131. <https://doi.org/10.3390/foods2020120>
- Vargas, J., Alvarado, P., Vega Baudrit, J., Porras, M., 2013. Caracterización del subproducto cascarilla de arroz en búsqueda de posibles aplicaciones como materia prima en procesos. *Rev. Científica* 23, 87–102.
- Vatai, T., Škerget, M., Knez, Ž., 2009. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *J. Food Eng.* 90, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.028>
- Verma, N., Shukla, S., 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 2, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002>
- Verraes, C., Boxstael, S., Van Meervenue, E., Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., Marie-Athénaïs, de S., Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., Block, J., Dewulf, J., Herman, L., 2013. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 2643–2669. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>
- Viteri, L., Ben, G., 2013. Script-Tmp-Inta\_Viteri\_Benes\_Mincyt-10-Frfinas 1–88.
- Wang, S.Y., HsinShan, L., 2000. Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry,. *J. Agric. Food Chem.* 48, 140–146. <https://doi.org/10.1021/JF9908345>
- Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J., Gao, Y., 2016. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 56, 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.004>
- Waszkowiak, K., Gliszczyńska-Wigło, A., Barthet, V., Skręty, J., 2015. Effect of Extraction Method on the Phenolic and Cyanogenic Glucoside Profile of Flaxseed Extracts and their Antioxidant Capacity. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* 92, 1609–1619. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2729-x>
- Wedge, D., Meepagala, K., Magee, J., Smith, S., Huang, G., Larcom, L., 2001. Anticarcinogenic Activity of Strawberry, Blueberry, and Raspberry Extracts to Breast and Cervical Cancer Cells. *J. Med. Food* 4, 49–51. <https://doi.org/10.1089/10966200152053703>

- White, P., 2002. Recent advances in fruit development and ripening: An overview. *J. Exp. Bot.* 53, 1995–2000. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf105>
- Wijekoon, M.M.J.O., Bhat, R., Karim, A.A., 2011. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etlingera elatior* Jack.) inflorescence. *J. Food Compos. Anal.* 24, 615–619. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.09.018>
- Wiley, R., 2017. Preservation Methods for Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables, in: *Food Engineering Series*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7018-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7018-6_6)
- Williamson, G., 2003. Common Features in the Pathways of Absorption and Metabolism of Flavonoids, in: *Phytochemicals: Mechanisms of Action*. pp. 21–33. <https://doi.org/10.1201/9780203506332.ch2>
- Xi, J., Shen, D., Zhao, S., Lu, B., Li, Y., Zhang, R., 2009. Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. *Int. J. Pharm.* 382, 139–143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.023>
- Yang, C., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M.D., Nakamura, N., Hayashi, N., 2000. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2732–2735. <https://doi.org/10.1021/jf991037+>
- Yang, D., Xie, H., Jiang, Y., Wei, X., 2016. Phenolics from strawberry cv. Falandi and their antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities. *Food Chem.* 194, 857–863. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.091>
- Yen, G.-C., Duh, P.-De., Tsai, H.-L., 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem.* 79, 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00145-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00145-0)
- Zamora., J., 2007. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Rev. Chil. Nutr.* 34, 0. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182007000100002>
- Zhang, L., Tu, Z., Wang, H., Fu, Z., Wen, Q.-H., Chang, H., Huang, X., 2015. Comparison of different methods for extracting polyphenols from *Ipomoea batatas* leaves, and identification of antioxidant constituents by HPLC-QTOF-MS2. *Food Res. Int.* 70. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.012>
- Zhang, Z.-Y., Wong, Y., 2005. Enzyme Kinetics for Clinically Relevant CYP Inhibition. *Curr. Drug Metab.* 6, 241–257. <https://doi.org/10.2174/1389200054021834>
- Zhu, Q., Nakagawa, T., Kishikawa, A., Ohnuki, K., Shimizu, K., 2015. In vitro bioactivities and phytochemical profile of various parts of the strawberry (*Fragaria × ananassa* var. Amaou). *J. Funct. Foods* 13, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.026>
- Zielinski, A.A.F., Haminiuk, C.W.I., Beta, T., 2016. Multi-response optimization of phenolic antioxidants from white tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and their identification by LC-DAD-Q-TOF-MS/MS. *LWT - Food Sci. Technol.* 65, 897–907. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.020>
- Zulkifli et al., 2012. Bioactive Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Selected Fruit Peels. *Int. Conf. Environ. Chem. Biol.* 49, 66–70. <https://doi.org/10.7763/IPCBEE>
- Zuo, Y., Chen, H., Deng, Y., 2007. AGFD 61-Isolation and identification of flavonol glycosides in American cranberry fruit using HPLC and GC-MS. *ACS Natl. Meet. B. Abstr.* 233, 4.



- Zuo, Y., Chen, H., Deng, Y., 2002. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta* 57, 307–316. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00030-9)
- Zuo, Y., Wang, C., Lin, Y., Guo, J., Deng, Y., 2008. Simultaneous determination of anthraquinones in radix *Polygoni multiflori* by capillary gas chromatography coupled with flame ionization and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 1200, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.058>