Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Especialidad en Ingeniería de Invernaderos

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE GENOTIPOS MEXICANOS DE FRESA (*Fragaria* x *ananassa* Duch.)

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Especialidad en Ingeniería de Invernaderos

Presenta:
Mariela Berenice Soria Saborío

Dirigido por:
Dr. Irineo Torres Pacheco

Codirigido por:
Dr. Pedro A. Dávalos González
Dra. Sandra O. Mendoza Díaz

SINODALES

Dr. Irineo Torres Pacheco
Presidente

Firma

Dr. Pedro A. Dávalos González
Secretario

Pedro Antonio Dávalos
Firma

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz
Vocal

Firma

Dr. Ramón Guevara González
Suplente

Firma

Dra. Rosalía Ocampo Velázquez
Suplente

Firma

Dr. Gilberto Herrera Ruíz
Director de la Facultad de Ingeniería

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Agosto de 2010
México

RESUMEN

México necesita desarrollar sus propias variedades de fresa para la mejor adaptación de las plantas a las condiciones agronómicas, geográficas y climáticas de nuestro país. La selección de cierto material vegetal obedece a los requerimientos de los productores como lo son: resistencia a plagas y enfermedades, mayores rendimientos, mayor tamaño de fruto, etc. La calidad nutricional, nutracéutica y sensorial también deberían formar parte de estos criterios de selección, ya que están directamente relacionadas con los requisitos del consumidor. Es por esto que el objetivo de este trabajo fue el cuantificar el contenido de azucares, acidez titulable, fenoles totales, antocianinas y la actividad antioxidante de nueve genotipos de fresas mexicanas desarrolladas por el INIFAP. Los frutos fueron recolectados en madurez y tamaño comercial de un campo experimental en la ciudad de Irapuato, Guanajuato. Las muestras fueron homogenizadas y centrifugadas para obtener el sobrenadante. El contenido de azúcar o solidos solubles totales y acidez titulable se determinaron de acuerdo a la norma oficial mexicana correspondiente para néctares de frutas. El contenido de fenoles y antocianinas se determinaron por ensayos espectrofotométricos. La capacidad antioxidante fue evaluada por los ensayos de ABTS y FRAP. Los genotipos 01.7, 02.11, 99.717 y 99.777 muestran valores interesantes tanto en características de sabor como en capacidad antioxidante por lo que se pueden proponer como futuras variedades mexicanas comerciales de fresa.

(**Palabras clave**: genotipos de fresa, fitoquímicos, actividad antioxidante)

SUMMARY

Mexico needs to develop varieties of strawberries for the best adaptation of plants to agronomic, geographical and climatic conditions of the country. The selection of certain plant material is due to the requirements of producers such as: resistance to pests and diseases, higher yields, bigger fruit, etc. The nutritional quality, nutraceutical and sensory properties should also be part of these criteria, as they are directly related to the requirements of the consumer. Therefore the aim of this study was to quantify the sugar content, acidity, total phenols, anthocyanins and antioxidant activity of nine genotypes of Mexican strawberries developed by INIFAP. The fruits were collected at commercial maturity and market size at experimental field in the city of Irapuato, Guanajuato. The samples were homogenized and centrifuged to obtain the supernatant. The content of sugar or total soluble solids and titratable acidity were determined according to the corresponding Official Mexican Standard for Fruit Nectars. The content of total phenols and anthocyanins were determined by spectrophotometric assays. The antioxidant capacity was evaluated by ABTS and FRAP assays. The genotypes 01.07, 02.11, 99.717 and 99.777 show interesting values in organoleptic parameters and antioxidant capacity and may be proposed as future commercial Mexican varieties.

(**Key words**: strawberry genotypes, phytochemicals, antioxidant activity)

Dedicada a las personas que me impulsan a ser mejor cada día:

Miguel Alberto y Angel Emilio

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Irineo Torres y Dr. Pedro Antonio Dávalos por el respaldo, la dedicación, dirección y consejos para llevar a cabo este trabajo.

Muchas gracias Dra. Sandra O. Mendoza por su apoyo incondicional, su asesoría y tiempo brindado, que ayudaron a la terminación de este proyecto y a enriquecer mi vida personal y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por permitirme estudiar este posgrado al brindarme una beca.

Agradezco a Alma, Bety y Lety por sus consejos y apoyo en el laboratorio y por compartir su amistad sincera conmigo.

A mi familia, mis padres Mauro y Maricela por todo lo que han hecho por mí, a mi hermana por su apoyo y a mi esposo e hijo, la razón por la que estoy aquí.

Por último pero no menos importante a las chavas de la especialidad: Paty, Lupita, Nancy y Flor por compartir sus experiencias y brindarme su apoyo y amistad. A Jerry y Carlitos que sin su transporte no hubiera podido llegar temprano a la escuela, gracias por compartir su coche, tiempo y pláticas de carretera.

I N D I C E

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Indice de cuadros	vi
Indice de figuras	vii
I. INTRODUCCION	1
II.REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Botánica del cultivo	3
2.2 Importancia del Cultivo	4
2.3 Compuestos de interés en la fresa	5
2.3.1 Antocianinas	6
2.4 Radicales libres	7
2.5 Capacidad antioxidante	7
III.METODOLOGIA	9
3.1 Material vegetal	9
3.2 Material químico	9
3.3 Método de extracción	9
3.4 Medición de sólidos solubles totales	10
3.5 Determinación de acidez titulable	10
3.6 Cuantificación de fenoles totales	10
3.7 Cuantificación de antocianinas	11
3.8 Determinación de capacidad antioxidante	12
3.8.1 Método ABTS	12
3.8.2 Poder antioxidante de reducción férrica. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)	12
3.9 Diseño y análisis estadístico	13
IV.RESULTADOS Y DISCUSION	14
4.1 Medición de sólidos solubles totales	14
4.2 Determinación de acidez titulable	15
4.3 Cuantificación de fenoles totales	17
4.4 Cuantificación de antocianinas	18
4.5 Determinación de capacidad antioxidante	20
BIBLIOGRAFIA	23

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
4.1	Contenido de sólidos solubles totales, acidez titulable y cociente SST/AT de los genotipos de fresa y variedades comerciales.	16
4.2	Determinación de fenoles y antocianinas de los genotipos y variedades comerciales.	19
4.3	Capacidad antioxidante de los genotipos y variedades comerciales de fresa	22

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
4.1	Valores de sólidos solubles totales de los genotipos de fresa.	14
4.2	Gramos de ácido citrico por cada 100 mL de muestra.	15
4.3	Contenido de fenoles de los genotipos de fresa y variedades comerciales.	18
4.4	Contenido de antocianinas en los genotipos y variedades comerciales de fresa.	19
4.5	Valores de la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de los genotipos y variedades comerciales de fresa.	20
4.6	Actividad antioxidante de los genotipos y variedades comerciales de fresa.	21

I. INTRODUCCION

La fresa es un fruto suave que es cultivado por su agradable sabor y por los beneficios a la salud que conlleva su consumo. Además es una importante fuente dietética de fibra y compuestos bioactivos, tanto micronutrientes como fitoquímicos, además es particularmente rica en vitamina C y se encuentra entre las fuentes de alimentos más ricos en folatos.

México se encuentra dentro de los diez primeros productores de fresa a nivel mundial según la Organización para la Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO, por sus siglas en inglés), por lo que tiene un papel importante ya que la producción no sólo satisface el consumo nacional sino que también se exporta a otros países de América y Europa principalmente.

El cultivo de fresa en México enfrenta un problema general en su cultivo, debido a diferentes factores que influyen en la productividad y otros aspectos del cultivo. El materia vegetal utilizado para el cultivo comercial no está concebido para las características de nuestro país, ya que son variedades extranjeras y por esta razón no se adaptan a los agroecosistemas locales (suelos arcillosos, pH alcalino, falta de frío invernal a la planta, alta oscilación térmica en invierno, exceso de calor en primavera), y la susceptibilidad a las enfermedades y plagas endémicas de la región son entre otras causas, las deficiencias más importantes observadas en estas variedades. Por lo que la generación de variedades mexicanas ayudará a mejorar la productividad y adaptabilidad de la fresa a las condiciones regionales.

Existen programas de mejoramiento genético de las plantas de fresa y son usualmente utilizados para la producción de nuevas variedades con características agronómicas específicas (rendimiento y tamaño), características sensoriales (firmeza, contenido de azúcares, acidez, color y aroma), considerando un incremento en la resistencia a enfermedades y adaptabilidad de la planta.

Actualmente, además de todos estos parámetros, es necesario buscar los compuestos bioactivos específicos conocidos por su efecto sobre la salud humana, ya que este aspecto es altamente solicitado por el consumidor. Al ser evaluadas diferentes variedades de fresa, se han detectado diferencias en producción y calidad del fruto, relacionadas con su capacidad de adaptación a las condiciones locales de evaluación.

En cuanto a su valor nutricional, hoy en día solo algunas variedades se diferencian por su alto contenido de fenoles y capacidad antioxidante total. Algunos programas de mejoramiento han empezado a tomar en cuenta este conocimiento para incrementar el valor nutricional del fruto.

La generación de nuevas variedades de fresas mexicanas debería de estar enfocada no solo al mejoramiento de las características agronómicas y productivas, sino también a la obtención de genotipos que aseguren una alta calidad nutricional y sensorial para mejorar la aceptación del producto por parte de los consumidores.

Es por esto que se propone realizar el estudio fitoquímico preliminar y de capacidad antioxidante de algunos genotipos de fresas generados por programas mexicanos de mejoramiento genético de fresa, para identificar aquellas variedades con mayores atributos nutricionales y de la misma manera conocer las posibles correlaciones que estos compuestos pudieran tener entre sí.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Botánica de la fresa.

Las fresas y los fresones pertenecen a la familia *Rosaceae* y al género *Fragaria* con más de veinte especies y 1,000 variedades. Actualmente en el mundo, *Fragaria* x *ananassa* es en la práctica la única especie del género *Fragaria* que es cultivada; sólo marginalmente se cultivan: *Fragaria* chiloensis, *Fragaria moschata*, *Fragaria ovalis*, *Fragaria vesca*, *Fragaria alpina* y *Fragaria virginiana*.

La planta es pequeña, de no más de 50 cm de altura, con numerosas hojas trilobuladas de pecíolos largos que se originan en una corona o rizoma muy corto, se encuentra a nivel del suelo y constituye la base de crecimiento de la planta; en ella se encuentran tres tipos de yemas; unas originan más tallos que crecen junto al primero, otras los estolones que en contacto con el suelo emiten raíces y forman nuevas plantas, y el tercer tipo de yemas forman los racimos florales cuyas flores son hermafroditas y se agrupan en racimos. La planta de fresa es herbácea y perenne ya que por su sistema de crecimiento, constantemente está formando nuevos tallos, que la hacen permanecer viva en forma indefinida.

Lo que se conoce como fruta de fresa es en realidad un fruto falso, producto de engrosamiento del receptáculo floral; sobre ese fruto falso se encuentran gran cantidad de semillas pequeñas, que son frutos verdaderos llamados aquenios. Las raíces de la fresa son fibrosas y poco profundas. La flor de la fresa tiene de 5 a 6 pétalos, de 20 a 35 estambres y varios cientos de pistilos sobre un receptáculo carnoso. Sobre cada óvulo fecundado da lugar a un fruto aquenio.

Las variedades de fresa se pueden clasificar en dos:

- Variedades de día corto

Su inducción floral ocurre cuando los días comienzan a acortarse y las temperaturas medias son moderadas (finales de verano a otoño). Pasan el invierno en reposo y producen concentradamente en primavera, generalmente en los meses de noviembre y diciembre. Algunas de las variedades más conocidas: Pajaro, Chandler, Douglas, Oso Grande, Camarosa.

- Variedades de día neutro

Su inducción floral ocurre independiente del fotoperíodo (número de horas de luz), las yemas son inducidas en forma permanente, sólo las altas o las bajas temperaturas afectan el fenómeno inductivo.En este tipo de variedades, la producción no es concentrada en primavera, si no que se prolonga desde la primavera hasta el otoño. Alguna de las variedades más conocidas: Selva y Brighton, Fern, Sweet Charlie (Barreiro, 1999).

2.2 Importancia del cultivo.

México ocupó el quinto lugar de producción mundial en el 2007 según la FAOSTAT, siendo Estados Unidos el primer productor de fresa a nivel mundial. Por otro lado la fresa mexicana tiene una fuerte demanda en el exterior, siendo Estados Unidos de América el destino principal. En los años 2000 al 2002, el 99% de las exportaciones mexicanas de fresa tuvieron como destino Estados Unidos. El restante 1% se exportó a Gran Bretaña, Canadá, Italia, Japón y Francia.

Por lo que se refiere a las importaciones, pese a que México tiene una importancia relativa en la producción de fresa a nivel mundial y a que exporta un monto considerable de este producto, también tiene una cantidad considerable de importaciones, siendo Estados Unidos el único proveedor de fresa a México (CONAFRESA, 2008). Este fenómeno se debe a la temporada de baja producción a la que está sometido el cultivo de fresa a campo abierto debido a las temperaturas y horas luz presentadas en el país.

El cultivo de fresa en México se da en su mayoría a campo abierto con un total nacional de 6214 hectáreas cultivadas, repartidas en once estados. Estos estados son: Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Sinaloa, Veracruz y Zacatecas, dando un total de once estados productores de fresa en México. Solamente tres de ellos resultan tener un nivel significativo de producción: Michoacán, Baja California y Guanajuato. Entre estos tres estados generan el 93.5% del total de producción nacional de fresa y solamente uno de ellos que es Michoacán genera el 51% de la producción nacional de fresa situándose como el Estado productor más importante de fresa en México por su volumen de producción aunque no por su productividad, ya que en el año 2008 su rendimiento por hectárea fue de 33.25 toneladas. Baja California destaca por su alta productividad, teniendo un rendimiento de 51.96 toneladas por hectárea (SAGARPA, 2008).

Los estados de Michoacán, Baja California y Baja California Sur han tenido un incremento en el rendimiento, debido principalmente a la aplicación de mejores tecnologías de producción, asistencia técnica especializada, incremento en la tecnificación del riego y el uso de la fertirrigación (SAGARPA, 2005).

2.3 Compuestos de interés en la fresa.

Las fresas contienen niveles significativos de compuestos con actividad biológica que proveen beneficios de salud más allá de una nutrición básica. Las fresas son una fuente importante de antioxidantes en la dieta, lo que garantizar su eficacia en la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad en los humanos y prevenir o aliviar diversas enfermedades causadas como resultado del estrés oxidativo (Heinonen *et al.*, 1998). La fresa contiene altos niveles de micronutrientes y compuesto fitoquímicos, que además de tener un papel importante en el metabolismo y crecimiento de las plantas, estos también son

esenciales para los parámetros de calidad nutricional y organoléptica, como es el caso del contenido de azúcares, acidez, sólidos solubles, acido ascórbico, compuestos fenólicos, flavonoides, entre otros (Tulipani *et al.*, 2008).

2.3.1 Antocianinas

La fresa es una fuente importante de fitoquímicos; en particular, la composición fenólica parece influir fuertemente en la calidad de los frutos, contribuyendo tanto a sus atributos sensoriales-organolépticos y a su valor nutricional. Las antocianinas son cuantitativamente el tipo más importante de polifenoles en la fresa. Las principales antocianinas presentes en la fresa ya han sido identificadas: pelargonidina-(PG) y cianidina-(Cy) en forma acilada o glucósilada (Lopez-da-Silva *et al*., 2002). Las antocianinas son un grupo de pigmentos solubles en agua, responsables del color azul, naranja, rojo, violeta y magenta. Las antocianinas pertenecen a los compuestos fenólicos llamados flavonoides. La función mas importante de las antocianinas, en la naturaleza, es la percepción visible para la atracción de animales polinizadores y dispersores de semillas (Delgado-Vargas *et al.*, 2000)

Las antocianinas pueden estar presentes en diferentes estructuras reversibles y tener cambios es sus espectros de absorción cambiando el pH de la solución. Por lo que la concentración de antocianinas puede ser determinada por el método de pH diferencial. Este método permite una medición rápida y precisa de las antocianinas totales aún en presencia de pigmento degradado, polimerizado o en presencia de cualquier otro compuesto interferente (Wrolstad *et al.*, 2004)

2.4 Radicales libres

Un radical libre se define como cualquier especie capaz de tener una existencia independiente que contiene uno o más electrones libres en forma singulete. La presencia de electrones libres hace a los radicales libres altamente reactivos debido a que requieren otro electrón para completar el orbital y volverse estables. El estrés oxidativo se refiere a la situación en la que existe un desbalance significativo entre radicales libres y el sistema de defensa antioxidante (Willcox *et al.*, 2004)

2.5 Capacidad antioxidante

Un antioxidante biológico se define como "cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato" (Halliwel y Gutteridge, 1995). Existen por lo menos cuatro fuentes de antioxidantes: enzimas como la superoxidodismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa; moléculas grandes como la albúmina, ferritina y otras proteínas; moléculas pequeñas como acido ascórbico, tocoferol, carotenoides, polifenoles, etc.; y algunas hormonas como el estrógeno, melatonina , etc. Por otro lado, existen múltiples radicales libres y fuentes oxidantes ($O2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, $NO^{\bullet}$, $RO(O)^{\bullet}$, $LO(O)^{\bullet}$, etc.), y ambos oxidantes y antioxidantes tienen diferentes características físicas y químicas. Un solo antioxidante, en algunos casos, actúa por múltiples mecanismos en un mismo sistema, además, los antioxidantes responden de diferentes maneras a diferentes radicales o fuentes oxidantes (Ishige *et al.*, 2001).

La actividad antioxidante de un compuesto puede ser determinada por diferentes métodos, entre los que se encuentra el método ABTS (llamado así por el reactivo 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) y la técnica FRAP (Poder Reductor Antioxidante del Fierro). Dentro de los métodos más rápidos, simples operacionalmente y más reproducibles se encuentran los métodos antes

mencionados. El método ABTS consiste en la generación del radical $ABTS^{\bullet+}$, por la reacción entre el ABTS y el persulfato de potasio para producir un cromóforo azul verdoso con absorciones máximas a longitudes de onda de 415, 645, 734 y 815 nm. En presencia de antioxidantes se produce una disminución de la absorbancia del radical $ABTS^{\bullet+}$. Los resultados suelen ser expresados como µmol equivalentes de Trolox/g material analizado. Este método puede ser utilizado en un amplio rango de pH y se aplica para sistemas tanto acuosos como orgánicos (Prior *et al.*, 2005). Por otro lado, el método FRAP está basado en la habilidad de los antioxidantes de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+}. El Fe^{2+} es medido espectrofotométricamente por su coloreado acomplejamiento con 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazina (TPTZ), que tiene su máxima absorbancia a los 595 nm. Desde que la actividad antioxidante de una sustancia es usualmente correlacionada con su capacidad reductora, la técnica FRAP es un método seguro para estudiar la capacidad antioxidante de varios compuestos. Este método ha sido comúnmente usado para la rápida evaluación de la capacidad antioxidante total de varias frutas y bebidas (Benzie y Strain, 1999).

III. METODOLOGIA

3.1 Material Vegetal.

Los frutos de fresa se colectaron en el mes de abril del 2010 de una parcela experimental del INIFAP en la ciudad de Irapuato, Guanajuato. Aproximadamente 200 g de frutos frescos de nueve diferentes genotipos de fresa (*Fragaria* x *ananassa* Duch.) sin defectos físicos y con una madurez comercial mínima de ¾ de rojo fueron seleccionados al azar. Los genotipos a estudiar fueron: 01.165, 01.7, 02.11, 03.76, 06.75, 06.76, 99.514, 99.717 y 99.777, híbridos resultantes del proyecto de formación, propagación y validación de variedades nacionales de fresa para la zona central de México a cargo del Dr. Antonio Pedro Dávalos Gonzales en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Como testigos se utilizaron los frutos de dos variedades comerciales desarrolladas por la Universidad de California de Estados Unidos Sweet Charlie (SC) y Camino Real (CR).

3.2 Material Químico.

Para la determinación de la acidez titulable, capacidad antioxidante, cuantificación de fenoles totales y antocianinas los reactivos de grado analítico empleados fueron: hidróxido de sodio, reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio, nitrato de sodio, reactivo de FRAP, acetato de sodio, 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), cloruro ferrico, acido clorhídrico, metanol, sulfato de hierro, cloruro ferroso, ferrozina, acido2,2´-azinobis-3-etilbenzoazolina-6-sulfonico (ABTS), acido gálico, acetato de sodio y cloruro de potasio.

3.3 Método de extracción.

Los frutos maduros y sin defectos de cada genotipo se lavaron, se les retiro el pedúnculo y procesaron de acuerdo a la metodología utilizada por Wang, S.Y. y Lin H. (2002), con algunas modificaciones. Los frutos fueron licuados hasta su total homogenización. El producto obtenido se centrifugo a 8000 rpm durante 10 minutos a 4 °C en una centrifuga refrigerada. El sobrenadante resultante de la centrifugación se sometió a un filtrado para la eliminación total de sólidos suspendidos, después de lo cual las muestras liquidas se guardaron a -70 °C en un ultrarefrigerador hasta el momento de su análisis.

3.4 Determinación de sólidos solubles totales.

Los sólidos solubles totales se determinaron de acuerdo a la norma oficial mexicana NMX-F-103-1982 para alimentos, frutas y derivados, por medio de la medición de los grados Brix del jugo en un refractómetro portátil ATAGO. Una alícuota del sobrenadante se colocó sobre el lente del equipo. Los valores fueron tomados a temperatura ambiente y se realizó por triplicado, para ser reportados como porcentaje de sólidos solubles totales o grados Brix $\pm$ desviación estandar.

3.5 Determinación de acidez titulable.

La acidez titulable del jugo de fresa se realizó por medio del método potenciométrico de acuerdo a la norma oficial mexicana NMX-F-102-S-1978 para jugos y néctares de frutas. 10 ml de jugo fueron aforados a 50 ml con agua destilada. Se colocó el electrodo del potenciómetro dentro de la solución en constante agitación y se tituló con hidróxido de sodio 0.1 N hasta alcanzar el pH 8.3. La determinación llevo a cabo por triplicado y se reportó como gramos de acido cítrico por cada 100 ml de muestra, por medio de la conversión de que 1 ml de hidróxido de sodio 0.1 N equivale a 0.006404 g de acido cítrico. Ya que el ácido cítrico es el ácido orgánico en mayor proporción en la fresa.

3.6 Cuantificación de fenoles totales.

El contenido de fenoles solubles totales del jugo de fresa se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu descrito por Dewanto y colaboradores (2002). La diluciones apropiadas del jugo y las diferentes concentraciones de la curva estándar (0-16 μg acido gálico) fueron oxidados por la adicción de 25 μL reactivo Folin-Ciocalteu 1 N y posteriormente de una agitación, la reacción fue neutralizada con 125 μL de carbonato de sodio al 20%. Finalmente después de 2 horas la absorbancia producida por la coloración azul se midió a 760 nm en un espectrofotómetro UV/Visible. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco $\pm$ su desviación estándar.

3.7 Cuantificación de antocianinas.

Las antocianinas pueden estar presentes en diferentes estructuras reversibles y tener cambios en sus espectros de absorción cambiando el pH de la solución, por lo que la concentración de antocianinas se determinó por medio de la técnica de pH diferencial de acuerdo a lo descrito por Giusti y Wrolstad (2000). Una alícuota del jugo de fresa se diluyó en amortiguador de cloruro de potasio 0.025 M a pH 1. También se diluyó otra alícuota en amortiguador de acetato de sodio 0.4 M a pH 4.5. Las muestras diluidas fueron equilibradas por 15 minutos en la obscuridad y usando un espectrofotómetro UV/Visible se determinó la absorbancia de las muestras a 510 nm (absorbancia máxima) y a 700 nm (lectura del grado de degradación del compuesto y lectura de corrección debido a las sustancias interferentes). La concentración de antocianinas se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar de la cianidina, ya que es la reportada mayoritariamente para fresa mediante la aplicación de las siguientes formulas:

$$\frac{mg}{litro} = \left(\frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\left(\frac{\varepsilon}{L}\right)} \right)$$

Donde:

A= $[(A510 - A700)pH1 - (A510 - A700)pH4.5]$

MW= peso molecular de cianidina-3-glucosido (mol^{-1})

DF= factor de dilución

ε=coeficiente de absortividad molar de antocianina (29,600 L cm^{-1} mol^{-1})

L= longitud de la celda (cm)

Los resultados se expresa como mg del pigmento de antocianina monomérica cianidina-3-glucosido por cada100 g de muestra fresca.

3.8 Determinación de capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante de los jugos de fresa se llevo a cabo mediante dos técnicas:

3.8.1 Método ABTS.

La técnica de capacidad antioxidante para reducir el radical $ABTS^{\bullet+}$, se realizó de acuerdo a lo descrito por Nenadis y colaboradores (2004) y se basa en la habilidad de un antioxidante para atrapar radicales. Para esta técnica se elaboró de una curva estándar de trolox (vitamina E) con concentraciones que van de 50 a 800 μM. El reactivo ABTS (2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) es el agente oxidante de esta técnica y se genera el radical $ABTS^{\bullet+}$ mediante la adición de persulfato de potasio 140 mM. Con esta técnica se obtuvieron los porcentajes de inhibición para cada muestra, mediante la comparación de los cambios de la absorbancia del control (radical ABTS•+ sin antioxidantes) con respecto a los cambios en las muestras. Una disminución o desaparición del color azul característico del radical $ABTS^{\bullet+}$ al reaccionar con una muestra, significa que ésta tiene capacidad de inhibir al oxidante. Este cambio de coloración se indica por una disminución en la absorbancia a 734 nm. Los resultados fueron reportados como mmol equivalentes de trolox por gramo de peso fresco.

3.8.2 Poder antioxidante de reducción férrica. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).

La técnica de poder antioxidante de reducción ferrica (FRAP) por sus siglas en ingles, se llevó a cabo con forme a lo descrito por Firuzi y colaboradores (2000). Para preparar la solución FRAP se mezclaron 10 ml amortiguador de acetatos 300 mM a pH3.6, 1 ml de cloruro ferrico 20mM y 1 ml de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM disuelta en ácido clorhídrico 40 mM. En una microplaca de 96 pozos se colocaron por cuadruplicado 25 μL de curva estándar de sulfato de hierro (100 a 3000 μM) así como las muestras a estudiar. Posteriormente se agregaron 175 μL de la solución FRAP recién elaborada y precalentada 37 °C. La absorbancia de la microplaca se monitoreo a 595 nm en un lector de microplacas Spectra Max durante diferentes intervalos de tiempo (0, 4, 10, 30, 60 y 90 minutos). Los resultados fueron expresados como mmol equivalente de $FeSO_4$ por gramo de muestra fresca $\pm$ desviación estándar.

3.9 Diseño y Análisis Estadístico

Se planteo un diseño unifactorial (factor: genotipo) y los resultados se reportaron como la media $\pm$ desviación estándar. Se realizo un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y para comparación de medias de cada genotipo se realizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia de α =0-05. Todos los datos se analizaron con el paquete estadístico JMP 5.0.1.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Medición de sólidos solubles totales

Los valores de los sólidos solubles totales o contenido de azúcar de los genotipos y variedades comerciales se muestran en la Figura 4.1. Como se puede observar los valores más altos fueron alcanzados por los genotipos 01.7 y 02.11; Sweet Charlie (SC) que es la variedad comercial también obtuvo un valor alto en el contenido de azúcar. Camino Real (CR) y el genotipo 06.75 son los frutos con menor contenido de azúcares. Los azúcares son los principales compuestos solubles en los frutos de fresa; de los cuales fructosa, glucosa y sacarosa son los que se encuentran en mayor cantidad y determinan los grados Brix. Un mayor contenido de sólidos solubles totales en el fruto de fresa, les confiere una mayor calidad (Hamano *et al.*, 2002).

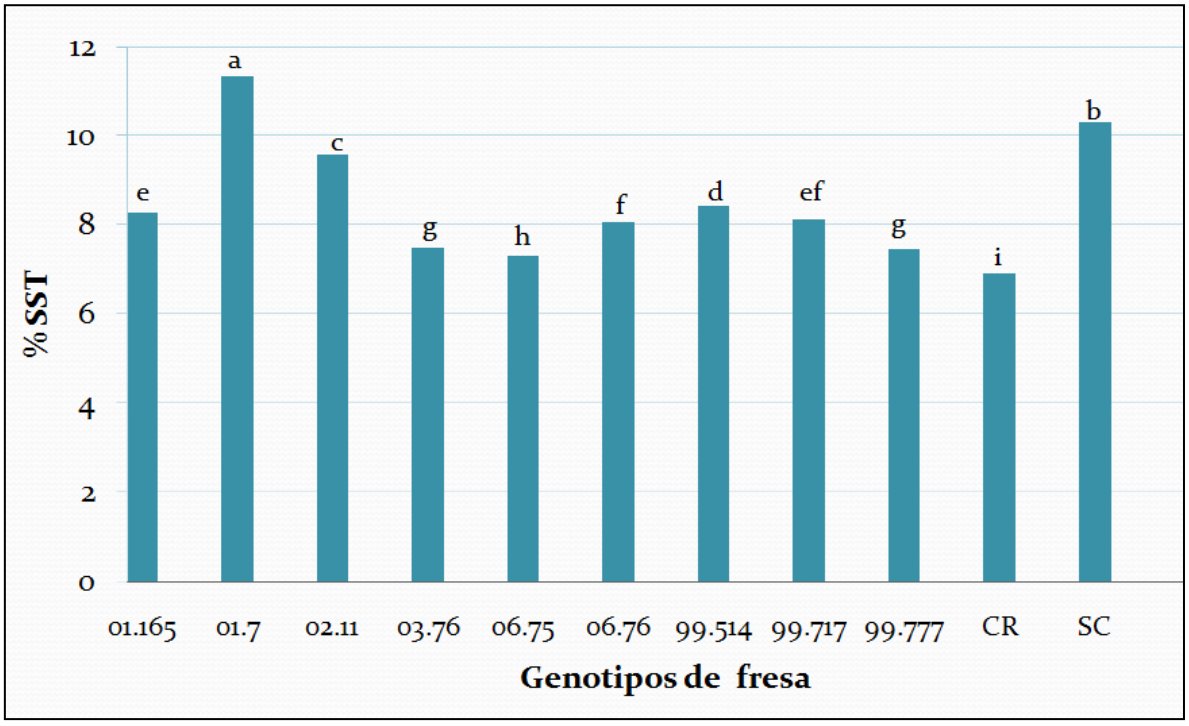

Figura 4.1. Valores de solidos solubles totales de los genotipos de fresa. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey (α = 0.05).

4.2 Determinación de acidez titulable.

A pesar de que las principales normas de calidad para exportacion de fresa (USDA y CCE) no determinan las concentraciones de acidez titulable requeridas en los frutos de fresa para su consumo en fesco; frutos menos ácidos y que no superen la concentración maxima de 0.8 % (o gramos de ácido cítrico en 100 ml de muestra) pueden ser preferidos para el consumo en fresco tanto en el mercado nacional como en el de exportacion (Martinez-Bolaños *et al*, 2008). La figura 4.2 muestra los valores obtenidos para la acidez titulable de los diferentes genotipos y variedades comerciales. Se obseva que los genotipos 99.717 y 99.777 son los que contienen la menor acidez y en cuanto a las variedades comerciales tanto Camino Real (CR) como Sweet Charlie (SC) tienen el mismo valor de acidez. Los genotipos 01.165, 01.7, 02.11 y 99.514 superan los 0.8 g de ácido cítrico que se sugiere como la concentración máxima de acidez para los frutos de fresa.

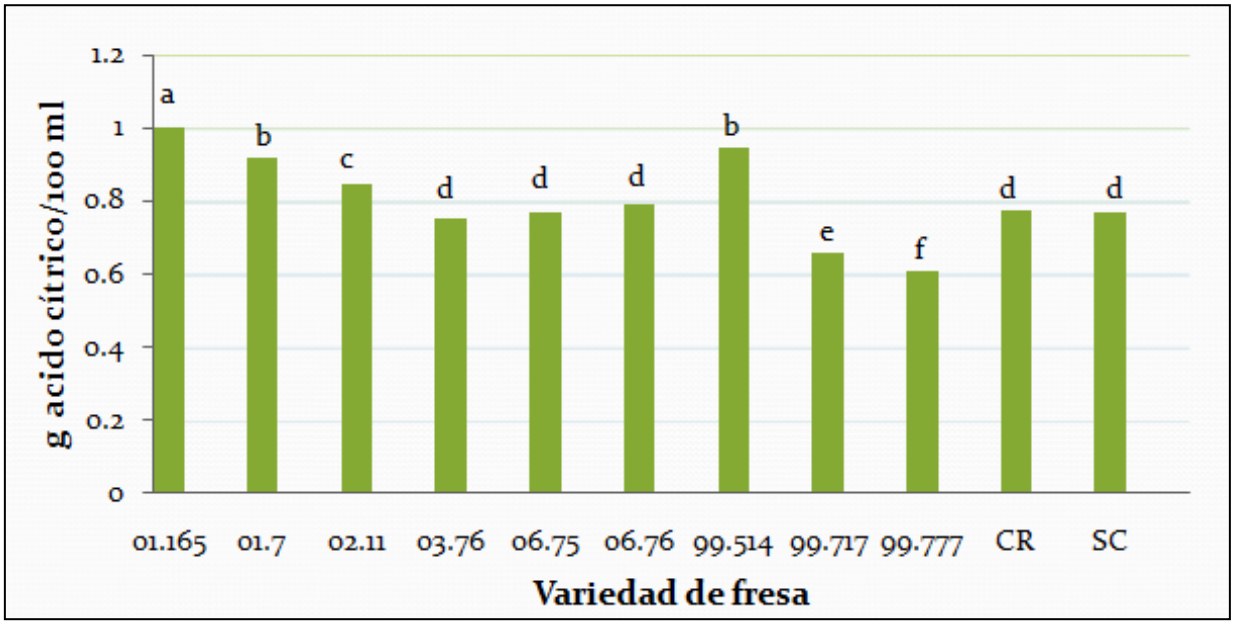

Figura 4.2. Gramos de ácido cítrico por cada 100 ml de muestra. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey (α = 0.05).

De acuerdo a Martínez-Bolaños y colaboradores (2008) la relación de los sólidos solubles totales entre la acidez titulable ($SST*AT^{-1}$) es un indicador que nos permite conocer el grado de aceptación del consumidor hacia el sabor de la fresa. Mientras más alto sea este cociente el grado de aceptación es mayor. El cuadro 4.1 muestra los cocientes para los genotipos evaluados y para las dos variedades comerciales. Los genotipos 99.717, 99.777 y 01.7 son los que obtuvieron el mayor cociente así como también la variedad Sweet Charlie (SC), por lo que son las fresas con mayor aceptación en cuanto al sabor.

En el cuadro 4.1 se observan diferencias significativas entre los genotipos y variedades comerciales para las tres variables medidas, siendo los sólidos solubles y la acidez dependientes de la reserva genética de cada genotipo. En el estudio realizado por Martínez-Bolaños y colaboradores en el 2008 evaluaron tres cultivares de fresa mexicanos y obtuvieron diferencias significativas para la acidez titulable dependientes del genotipo pero no así para los sólidos solubles totales.

Cuadro 4.1 Contenido de sólidos solubles totales, acidez titulable y cociente SST/AT de los genotipos de fresa y variedades comerciales.

Genotipos de fresa	%SST[a]	g ac. cítrico /100 ml muestra[a]	SST/AT
01.165	8.27 ± 0.058 ^{e}	1.001 ± 0.020 ^{a}	8.25 ^{g}
01.7	11.33 ± 0.058 ^{a}	0.920 ± 0.010 ^{b}	12.31 ^{b}
02.11	9.58 ± 0.058 ^{c}	0.843 ± 0.004 ^{c}	11.34 ^{c}
03.76	7.50 ± 0.0 ^{g}	0.751 ± 0.029 ^{d}	9.98 ^{de}
06.75	7.30 ± 0.0 ^{h}	0.771 ± 0.007 ^{d}	9.47 ^{ef}
06.76	8.07 ± 0.058 ^{f}	0.790 ± 0.004 ^{d}	10.21 ^{d}
99.514	8.43 ± 0.058 ^{d}	0.946 ± 0.007 ^{b}	8.92 ^{f}
99.717	8.13 ± 0.058 ^{ef}	0.660 ± 0.006 ^{e}	12.33 ^{b}
99.777	7.47 ± 0.058 ^{g}	0.611 ± 0.010 ^{f}	12.23 ^{b}
Camino Real	6.90 ± 0.0 ^{i}	0.775 ± 0.017 ^{d}	8.9 ^{f}
Sweet Charlie	10.30 ± 0.10 ^{b}	0.766 ± 0.020 ^{d}	13.44 ^{a}

[a] Valores reportados como promedio ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

4.3 Cuantificación de fenoles totales.

El mecanismo basico de la técnica Folin-Ciocalteu es una reacción de oxido reducción, y como tal, una serie de sustancias interfieren en este método . En particular, la presencia de azúcares reductores como sacarosa o fructosa, el ácido ascórbico, aminas aromáticas y algunos aminoácidos como la tirosina, triptófano y cisteína pueden influir en los resultados de este ensayo. Para eliminar estas interferencias se puede usar una extraccion de fase sólida antes de realizar el ensayo. Generalmente no se utiliza este paso con el objetivo de seguir la tendencia de utilizar este ensayo como una prueba rapida para efectos de selección entre un gran numero de muestras (Tulipani *et al.*, 2008).

De igual forma en este estudio no se llevo a cabo ningun método de extración antes de realizar el ensayo Folin-Ciocalteu o cualquier otro, ya que el objetivo fue caracterizar el fruto de fresa de la forma en que es consumido generalmente: en fresco. Es por esto que los resultados de esta técnica se ven sobrevalorados por la presensia de azúcares reductores y otras sustancias presentes en el jugo de fresa.

La figura 4.3 muestra que los genotipos 01.7, 99.514 y Sweet Charlie (SC) tienen el mayor contenido de fenoles totales de acuerdo con la técnica utilizada con 17.5, 13.1 y 9.06 miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco respectivamente. El contenido de fenoles en los furtos de fresa en este estudio fueron incluso superiores a los reportados por Tulipani y colaboradores (2008) de 3.13 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco para los dos genotipos de fresa con mayor contenido de fenoles. Shiow y Wang (2000) reportan valores de 91 a 278 mg equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de peso fresco para diferentes estados de madurez de los frutos de fresa.

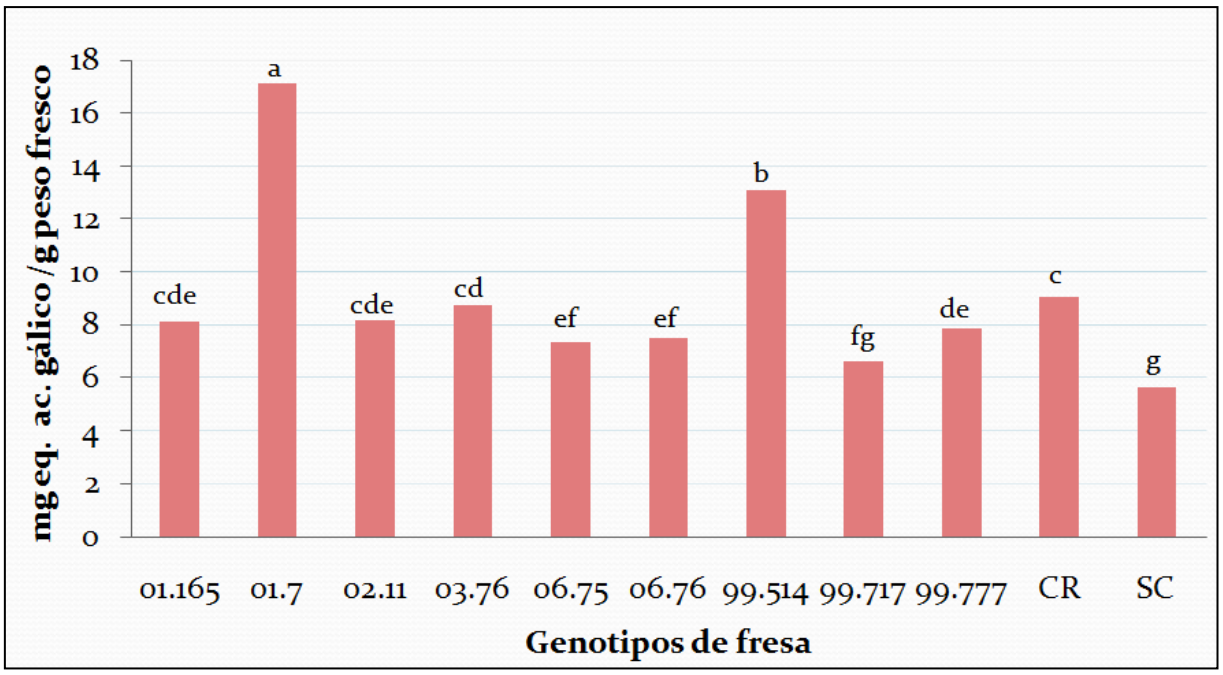

Figura 4.3 Contenido de fenoles de los genotipos de fresa y variedades comerciales. Valores expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey (α = 0.05).

4.4 Cuantificación de antocianinas.

De acuerdo a la figura 4.4 la variedad Sweet Charlie (SC) presenta el mayor contenido de antocianinas de todos los genotipos estudiados, seguido por el genotipo 03.76 y 99.514. Se ha observado que las antocianinas no son los unicos polifenoles que influyen en la capacidad antioxidante de los frutos de fresa, es decir que no existe una asociacion entre la cantidad de fenoles en forma de antocianinas y las propiedades antioxidantes de la fresa (Tuilipani *et al.*, 2008).

Los valores de fenoles totales y antocianinas de los genotipos y variedades comerciales de fresa se muestran en el cuadro 4.2.

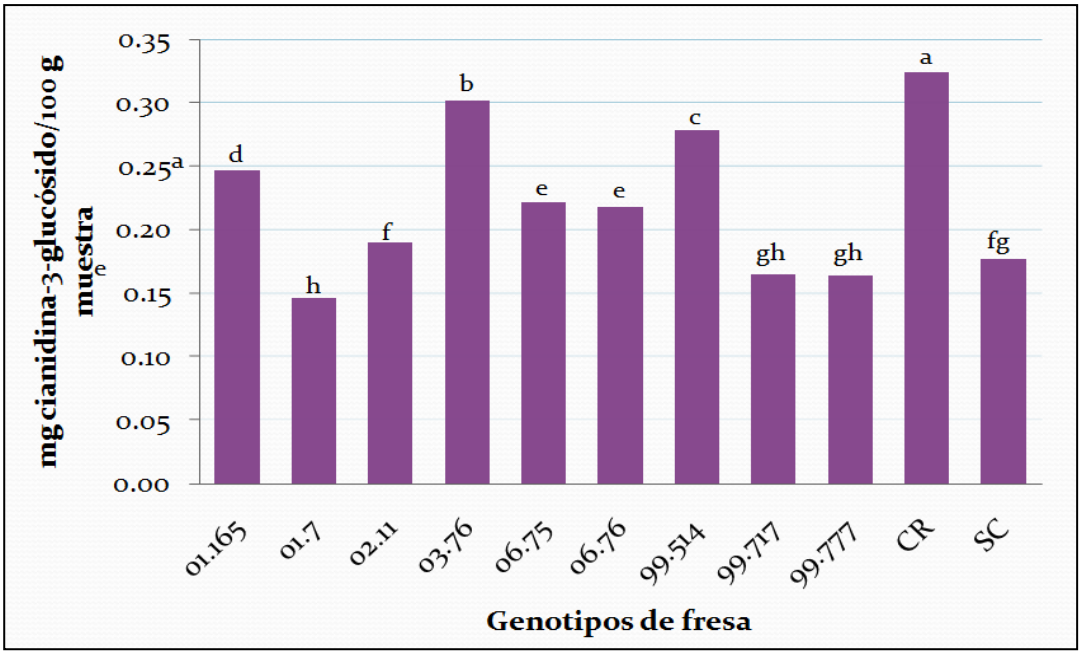

Figura 4.4 Contenido de antocianinas en los genotipos y variedades comerciales de fresa. Los resultados se expresan como miligramos de cianidina-3-glucosido por 100 g de muestra. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey (α = 0.05).

Cuadro 4.2 Determinación de fenoles y antocianinas de los genotipos y variedades comerciales. [a]

Genotipos	Fenoles Totales	Antocianinas
	mg ac. Gálico/g peso fresco	mg cianidina3-glucosido/100 g muestra
01.165	8.10±0.11 cde	0.247±0.001 d
01.7	17.14±0.64 a	0.147±0.003 h
02.11	8.19±0.11 cde	0.190±0.010 f
03.76	8.75±0.15 cd	0.302±0.003 b
06.75	7.34±0.03 ef	0.222±0.008 e
06.76	7.50±0.20 ef	0.218±0.003 e
99.514	13.10±0.90 b	0.278±0.003 c
99.717	6.60±0.20 fg	0.165±0.005 gh
99.777	7.86±0.27 de	0.164±0.005 gh
Camino Real	9.06±0.17 c	0.324±0.015 a
Sweet Charlie	5.61±0.07 g	0.177±0.005 fg

[a] Valores reportados como promedio ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey (α = 0.05)

4.5 Determinación de capacidad antioxidante.

La capaciadad antioxidante se determinó mediante dos técnicas diferentes. Para la técnica del ABTS el genotipo con mayor capacidad antioxidante fue el 06.75 y la variedad de Camino Real (CR). Los genotipos 99.717, 99.777 y Sweet Charlie (SC) fueron los que demostraron tener la menor capacidad antioxidante como se muestra en la figura 4.5. Los valores de TEAC van desde los 9 a 16 mmoles equivalentes de trolox por gramo de peso fresco (Cuadro 4.3) y se muestran parecidos a los obtenidos por Tulipani y colaboradores (2008) donde estudiaron diferentes genotipos de fresas desarrollados y cultivados en Italia. Ellos reportan valores de 11 a 19. 4 mmoles equivalentes de trolox por gramo de peso fresco. Estos resultados demuestran que las características genéticas de cada genotipo influyen marcadamente en la capacidad antioxidante de sus frutos.

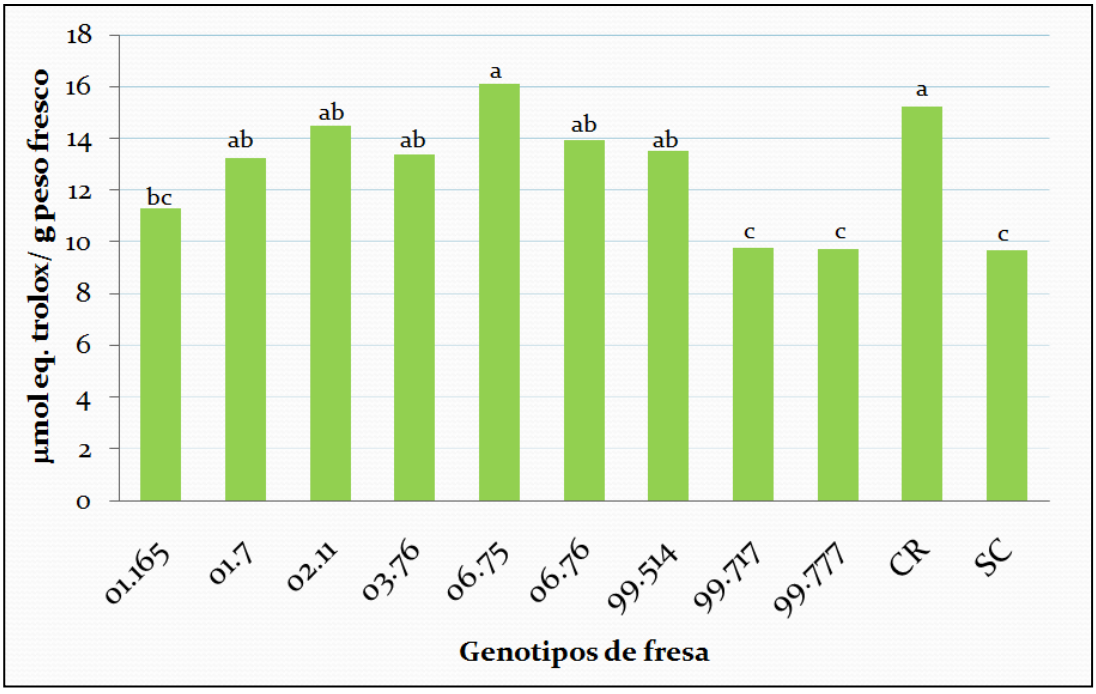

Figura 4.5 Valores de la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de los genotipos y variedades comerciales de fresa. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Por otra parte en la figura 4.6 se representa la capacidad antioxidante medida a travez de la técnica FRAP donde los genotipos 99.514, 03.76 y la variedad Camino Real (CR) tienen la mayor capacidad antioxidante reportada en mmol de $FeSO_4$ por gramo de peso fresco.

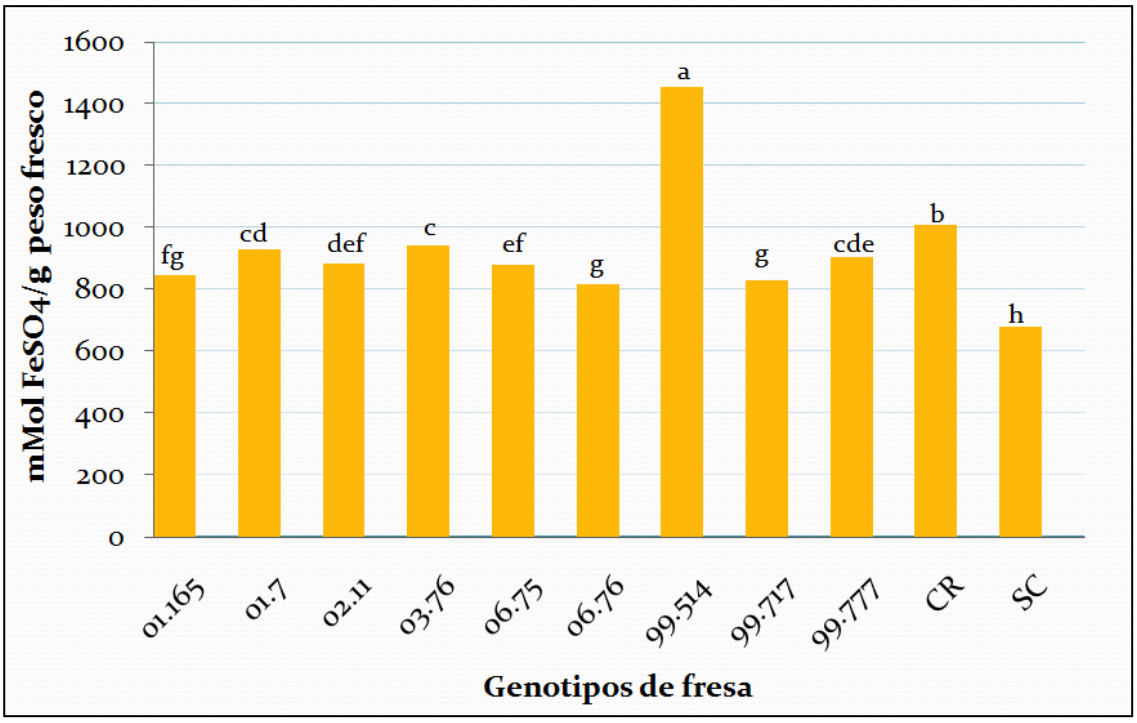

Figura 4.6 Actividad antioxidante de los genotipos y variedades comerciales de fresa. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey (α = 0.05). Los resultados se expresan como mmol de sulfato de fierro por gramo de peso fresco

Entre las dos variedades comerciales, Sweet Charlie (SC) presenta la capacidad antioxidante más baja para ambas técnicas mientras que Camino Real (CR) presenta los valores más altos. En cuanto al contenido de azúcares los valores son contrarios por lo que la variedad más dulce es Sweet Charlie y de la misma manera tiene el valor más alto en el cociente SST/AT.

Cuadro 4.3 Capacidad antioxidante de los genotipos y variedades comerciales de fresa. [a]

Genotipos	ABTS	FRAP
	μmol eq. Trolox/g peso fresco	mmol eq. $FeSO_4$/g peso fresco
01.165	11.27± 0.51 [bc]	844.84± 6.52 [fg]
01.7	13.23± 0.36 [ab]	928.51± 8.74 [cd]
02.11	14.47± 0.58 [ab]	882.77± 9.34 [def]
03.76	13.34± 0.31 [ab]	944.69± 23.12 [c]
06.75	16.11± 0.33 [a]	878.53± 4.88 [ef]
06.76	13.92± 2.11 [ab]	818.93± 36.46 [g]
99.514	13.49± 1.36 [ab]	1457.14± 23.26 [a]
99.717	9.76± 0.41 [c]	831.72± 3.26 [g]
99.777	9.69± 0.94 [c]	906.19± 7.24 [cde]
Camino Real	15.21± 1.00 [a]	1007.45± 4.18 [b]
Sweet Charlie	9.67± 2.09 [c]	678.28± 10.17 [h]

[a] Valores reportados como promedio ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Al evaluar los parámetros de sabor y capacidad antioxidante de los genotipos de fresa, se observa que el genotipo 01.7 tiene un buen cociente SST/AT y capacidad antioxidante, por lo que se puede considerar como un buen candidato para ser validado y liberado como variedad mexicana comercial, ya que presenta buen sabor y buena capacidad antioxidante. Otros genotipos como el 99.514 tiene una excepcional capacidad antioxidante pero su sabor se ve comprometido ya que es uno de los genotipos con valores más bajos en el cociente SST/AT. Los genotipos 02.11, 99.717 y 99.777 también cuentan con una aceptable capacidad antioxidante y cociente SST/AT, por lo que se podrían proponer como buenas variedades también.

Estos genotipos podrían ser estudiados bajo invernadero y además evaluar su capacidad antioxidante, contenido de fitoquímicos, acidez titulable y contenido de azúcares durante las diferentes etapas de producción.

BIBLIOGRAFÍA

Barreiro M.,1999. Fresa. La producción en México y la generación de divisas. Claridades Agropecuarias. Vol 55: 1-36

Benzie y Strin, 1999 en Firuzi, O., A. Lacanna, R. Petrucci, G. Marrosu, and L. Saso. 2000. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “Ferric Reducing Antioxidant Power” assay and cyclic voltametry. Biochimica of Biophysica Acta, 1721:174-184.

CONAFRESA: Consejo Nacional de Fresa. http://conafresa.com/

Dávalos-González, P.A., A. E. Jofre-Garfias, A.R. Hernández-Razo, J. Narro-Sánchez, J. Castro-Franco, N. Vázquez-Sánchez and R. Bujanos-Muñiz. 2006. Strawberry breeding for the central plateau of México. Acta Hort., 708:547-552.

Delgado –Vargas F., A. R. Jimenez, and O. Paredes-Lopez. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains -Characteristics, biosynthesis, processing and stability-. Food Science and Nutrition, 40(3):173-289.

Dewanto, V., X. Wu, K. Adom, and R. Lui. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. J. Agric. Food Chem., 50:3010-3014.

FAO-FAOSTAT: Organización de las naciones unidad para la agricultura y la alimentación. 2010. http://faostat.fao.org/

Firuzi, O., A. Lacanna, R. Petrucci, G. Marrosu, and L. Saso. 2000. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “Ferric Reducing Antioxidant Power” assay and cyclic voltametry. Biochimica of BiophysicaActa, 1721:174-184.

Giusti, M. M., and R.E. Wrolstad. 2000. Caracterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Unit F1.2 pag 1-3.

Hamano M.Y., Yamazaki Y.H., Miura H. 2002. Change in sugar contens and composition of strawberry fruit during development. Acta Horticulturae 567: 369-367.

Halliwel y Gutteridge, 1995 en Benzie, I. F. F., and Strain J. J.. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power; The FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239:70-76.

Heinonen et al., 1998 en Wang, S. and H. S. Lin. 2003. Compost as a soil supplement increases the level of antioxidant compounds and oxygen radical absorbance capacity in strawberries. J. Agric. Food Chem., 51:6844-6850

Ishige et al., 2001 en Prior, R. L., X. Wu, and K. Schaich. 2005. Satndardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J. Agric. Food Chem., 53:4290-4302.

Lopez-da-Silva, F. S. Pascual-Teresa, J.C. Rivas-Gonzalo, and C. Santuos-Buelga. 2002. Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv. Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. Eur. Food Res. Technol., 214:248–253.

Martinez-Bolaños M., D.Nieto-Angel D., D. Téliz-Ortiz, J. Rodríguez-Alcazar, M. Martínez-Damian,H. Vaquera-Huerta, y O. Carrillo-Mendoza. 2008. Comparación cualitativa de fresas (Fragaria x ananassaDuch.) de cultivares mexicanos y estadounidenses. Revista Chapingo Serie Horticultura,14(2):113-119.

Nenadis, N., L. Wang, M. Tsimidou, and H. Zhang. 2004, Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS assay. J. Agric. Food Chem., 52:4669-4674.

SAGARPA-SIAP: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México-Servicio de información agropecuaria y pesquera. 2010. http://www.siap.gob.mx/

Tulipani, S., B. Mezzetti, F. Capocasa, S. Bompadre, J. Beekwilder, H. Ric de vos, E. Capanoglu, A. Bovy, and M. Battino. 2008. Antioxidants, Phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotipes J. Agric. Food Chem., 56(3):696–704.

Wang, S. y., Lin H. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of Blackberry, Raspberrry and Satrawberry varies with cultivar and developmental stage. J. Agric. Food Chem., 48:140-146.

Wang, S. Y., W. Zheng, and G. J. Galletta. 2002. Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries. J. Agric. Food Chem., 50(22):6534-6542.

Willcox, J.K., S. L. Ash, and G.L. Catignani. 2004. Antioxidan and prevention of cronics disease. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44:275-295.

Wrolstad R.E., T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D.M. Smith and P. Sporns (Eds). 2004. Handbook of Food Analytical Chemistry.Vol2. Cap1. Ed Wiley, pp. 19-29.