

Influencia del procesamiento del fruto de membrillo (*Cydonia Oblonga Miller*) en el contenido de polifenoles y actividad antioxidante del mismo

Baroni MV (1), Gastaminza J (1), Wunderlin D (1,2), Rovasio JL (3), Dotti R (3), Rosso JC (3), Ghione S (3), Ribotta P (1).

(1) ISIDSA-UNC / ICYTAC- CONICET, Argentina.

(2) Dto. Química Orgánica, Fac. Cs. Qcas, UNC, Argentina.

(3) Grupo DULCOR.

Resumen

Los polifenoles son metabolitos secundarios presentes en gran proporción en las frutas, en su mayoría representados por los flavonoides y ácidos fenólicos. El creciente interés por estas sustancias es principalmente debido a su capacidad antioxidante y la asociación entre su consumo y la prevención de algunas enfermedades. Entre las frutas, el membrillo es una importante fuente de componentes que promueven la salud, tales como compuestos fenólicos. Si bien el membrillo no se consume fresco debido a su dureza, amargor y astringencia, es muy apreciado como materia prima para la producción de dulces y jaleas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la propiedad antioxidante del fruto de membrillo, su dulce y los productos intermediarios de su elaboración, con el fin de estudiar el efecto del procesado térmico en las características nutricionales del mismo.

Se analizaron el fruto (pulpa+piel), la mezcla cruda (pulpa+piel+azúcar) y el dulce regular y el reducido en carbohidratos. Se midió el contenido de polifenoles totales (PT), perfil de polifenoles por HPLC-DAD-MSMS y la actividad antioxidante *in vitro* por las técnicas DPPH (capacidad de atrapamiento de radicales libres) y FRAP (poder reductor).

Todas las muestras analizadas presentaron un alto contenido de polifenoles en un rango de 200-500 mg ac. gálico/100g muestra (futo, mezcla cruda, dulce). Se demostró la actividad

antioxidante *in vitro* por ambos métodos en todas las muestras. Los valores obtenidos variaron entre 400 y 1500 μmol TROLOX/100g muestra (futo, mezcla cruda, dulce). Tanto para la línea regular como la reducido en carbohidratos se mantuvo el contenido de polifenoles desde el fruto al dulce, conteniendo el regular 370 mg de ác. gálico/100 g de dulce y el light 184 mg ác. gálico/100g de dulce. Por otro lado se lograron identificar 16 compuestos polifenólicos, siendo los mayoritarios los ácidos cafeoil-quinicos, seguidos por los derivados del ácido cumárico, catequina y quercetina. La proporción de los distintos compuestos también se mantuvo desde el fruto al dulce, lo que significa que el procesado térmico no afecta cuantitativamente ni cualitativamente el contenido de polifenoles. Con respecto a la capacidad antioxidante determinada por DPPH y FRAP, como era de esperarse al mantenerse el contenido de polifenoles, no hubo tampoco pérdida de la actividad debido al procesamiento del membrillo.

Los resultados obtenidos demuestran que el dulce de membrillo realiza un aporte importante de antioxidantes en la dieta, y además que no existe perdida en la calidad nutricional debido al procesado térmico.

Palabras clave: membrillo, dulce, capacidad antioxidante.

1. Introducción

La composición nutricional de un alimento es motivo de permanente atención por parte de los consumidores y profesionales de la alimentación. Esto se debe principalmente al aporte de los elementos necesarios para el desarrollo normal de niños y adultos, así como al mantenimiento de la buena salud y a su utilidad para el tratamiento de enfermedades (nutracéuticos). Asimismo, en los últimos años ha crecido el interés por el estudio de la capacidad antioxidante de extractos de plantas medicinales y de alimentos debido a que la producción de radicales libres está fuertemente relacionada a una gran variedad de enfermedades como así también al proceso de envejecimiento. En este sentido, se ha definido a un antioxidante biológico como “una molécula que, cuando está presente en pequeñas concentraciones en relación a un sustrato oxidable puede prevenir, reducir o retrasar la destrucción oxidativa de biomoléculas” (Halliwell, 1995).

Las células en aerobiosis producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) como consecuencia del normal metabolismo celular. Por otra parte, el hombre está sometido permanentemente a la acción de radicales libres externos por exposición a diferentes factores ambientales, como radiaciones ionizantes, rayos UV, tabaco (genera RNS), radiación gamma, stress, etc. (Elsayed, 2001). En condiciones óptimas el organismo es capaz de contrarrestar la generación de los radicales libres mediante distintos sistemas antioxidantes endógenos, a través de la descomposición de ROS por un aumento (*up-regulation*) en enzimas de detoxificación (por ejemplo catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa) y moléculas captadoras de radicales libres como el glutatión y la tioredoxina. Sin embargo, la generación en exceso de estas especies reactivas puede conducir a un “estrés oxidativo”, definido como un incremento en la producción de ROS, tales como el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (HO^{\bullet}), etc. (Gozin *et al.*, 1999), produciendo un desequilibrio en el estatus antioxidante/oxidante del cuerpo humano. Estas moléculas son capaces de dañar o destruir la función de otras macromoléculas, como por ejemplo lípidos de membranas celulares (peroxidación lipídica), proteínas, enzimas, ADN y pueden llevar incluso a la muerte celular (apoptosis) (Pereira *et al.*, 2003). Es por eso que el sistema de defensa endógeno debe ser reforzado por los antioxidantes provenientes de la dieta, ayudando a mantener el estatus antioxidante en el organismo.

Hoy en día, las propiedades funcionales de los alimentos son de gran interés por sus implicancias en la salud humana. La acción antioxidante es una de las funciones fisiológicas más estudiadas en los alimentos, debido a la protección que brinda a los organismos vivos frente al daño oxidativo de células y tejidos, resultando en la prevención de varias enfermedades como el cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares, entre otras. Las principales fuentes de antioxidantes son las frutas y verduras, y en varios casos esta propiedad viene dada por su contenido en compuestos fenólicos. Los polifenoles son fitoquímicos bioactivos, que poseen elevada actividad antioxidante (Rice-Evans, 2001; Scalbert *et al.*, 2005), por lo que tienen un rol muy importante en la prevención del cáncer (Hertog *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2000) y enfermedades cardiovasculares (Akhlaghi *et al.*, 2009). Los polifenoles también exhiben acción neuroprotectiva (Campos-Esparza *et al.*, 2009), antidiabética (Matsui *et al.*, 2002), y contribuyen también a la reducción de la obesidad (Ahn *et al.* 2008). Su acción es proteger a los constituyentes celulares frente al daño oxidativo generado por la sobreproducción de los radicales libres, evitando de ese modo los efectos del deterioro de los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos celulares (Rice-Evans, 2001). Por estas razones, en la actualidad se trabaja en la búsqueda de alimentos naturales ricos en estos compuestos y en la evaluación de estas propiedades antioxidantes. Uno de los factores extrínsecos que modifican, el valor nutritivo de un alimento, es el tipo de procesamiento o tratamiento culinario al que se lo somete. Los nutrientes en los alimentos son vulnerables a distintos tipos de tratamientos fisico-químicos, implícitos en los procesos tecnológicos industriales y culinarios del procesado de los alimentos. Por lo tanto, el valor nutricional de los alimentos procesados variará con respecto a su materia prima, situación que muchas veces no se contempla en las tablas de composición nutricional de los mismos

El membrillo (*Cydonia oblonga* Miller, Rosaceae family) es un fruto que normalmente no se consume como tal debido a su sabor amargo y astringente por lo que es consumido normalmente como mermeladas, jaleas y dulces. Numerosos estudios han demostrado que el membrillo es un fruto rico en polifenoles, ácidos orgánicos y aminoácidos con reconocido efecto benéfico sobre la salud debido a su acción antioxidante (Kaur *et al.*, 2001; Acuna, *et al.*, 2002). Efectivamente el membrillo es reconocido como una fuente dietaria importante de compuestos que promueven la salud, debido a su actividad antioxidante, antimicrobiana y antiulcerativa (Fattouch *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007).

2. Objetivos

- Evaluar el perfil de polifenoles y capacidad antioxidante en la materia prima, los productos en proceso y productos finales de la elaboración de dulce de membrillo.
- Investigar la influencia del procesado del membrillo en el perfil de polifenoles y actividad antioxidante del dulce.

3. Materiales y métodos

3.1 Muestras: Se analizaron el fruto de membrillo (pulpa+piel), la mezcla cruda (pulpa+piel+azúcar) y el producto final del dulce regular y el reducido en carbohidratos (light).

3.2 Extracción de Polifenoles: Las muestras fueron primero liofilizadas (50 g aproximadamente), y luego dependiendo de su estructura (ej. fruto de membrillo) se trituraron en un molinillo con nitrógeno líquido. Luego se tomó 1 g de muestra liofilizada y/o pulverizada y se procedió a la extracción con 20mL Metanol:Agua 80:20 HCl 0,1% con UltraTurrax. Luego se agita la solución por dos horas en hielo y en oscuridad. Posteriormente se centrifuga y se vuelve a extraer el precipitado. Se juntan los extractos y se almacenan a -80°C para su posterior análisis.

3.3 Determinación de Polifenoles Totales: El método comúnmente utilizado para la determinación de polifenoles totales (PT) es el de Folin-Ciocalteu (FC), en el cual el conjunto de compuestos polifenólicos se oxida por acción del reactivo de FC (mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico) dando una coloración azul directamente proporcional al contenido de polifenoles y medible a 750 nm. (Arnous *et al.*, 1999).

3.4 Actividad antioxidante in vitro

3.4.1 Poder reductor sobre el Fe – FRAP: Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el hierro férrico (Fe+3) presente en un complejo con TPTZ (2, 4, 6-tri(2-piridil)-s-triazina) hasta la forma ferrosa (Fe+2), cuyo máximo de absorbancia se encuentra entre 590-595 nm (Benzie y Strain, 1996).

3.4.2 Captación del radical DPPH (Ensayo de decoloración del catión radical α - α -difeníl- β -picrilhidrazilo): Para cuantificar la capacidad captadora de radicales libres de los extractos se determina el grado de decoloración que provocan sus componentes a una solución metanólica de DPPH mediante el método de Brand-Willams *et al.* 1995.

3.4.3 Perfil de polifenoles por HPLC-DAD-MS/MS (Q/TOF): Evaluación del perfil fenólico se realizó en un Sistema LC Agilent 1200 acoplado a un detector de DAD (arreglo de diodo) y espectrómetro de masas MicrOTOF Q II (Bruker Daltonics. Los análisis de HPLC se realizaron utilizando una columna Phenomenex Luna C18 250 x 4,6 mm (5 micras) termostaticada (40 °C) a flujo de 0,4 mL/min utilizando 0,5% (v/v) de ácido fórmico en H₂O (solvente A) y metanol (solvente B) con el siguiente gradiente: de 20% a 50% de solvente B en 3 min, mantenido durante 5 min, seguido de una segunda rampa a 80% de B en 5 min, se mantuvo durante 17 min, una tercera rampa a 20% de B en 1 min, manteniéndose en esta última condición durante 10 min antes de la siguiente corrida. El volumen de inyección fue de 40 μ L. La detección se realizó utilizando un DAD (Arreglo de Diodo) y por espectrometría de masas la cual se realizó en modo negativo con la adquisición de masas entre 100 y 1500 Da. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y de secado (7L/min y 3,5 bar, respectivamente), y 180 °C para la temperatura de secado. Para los experimentos de MS/MS, la fragmentación se logró mediante el uso de la opción MS² automático utilizando argón como gas de colisión. Para el análisis de DAD se adquirió en el intervalo entre 200 y 700 nm.

3.5 Análisis estadísticos

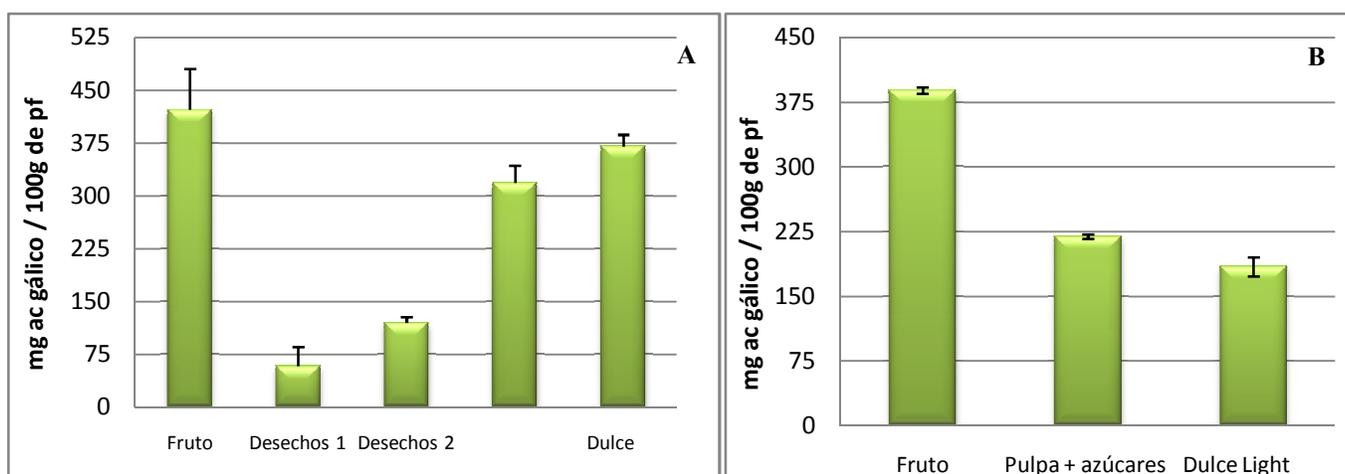
A los resultados obtenidos se los analizó por medio de ANOVA utilizando el software Infostat (UNC).

4. Resultados y discusión

En la **Figura 1 A y B** pueden observarse las concentraciones de polifenoles determinadas por el método Folin- Ciocalteu expresadas en mg de ac gálico/100 g de muestra peso fresco. El contenido de polifenoles en el fruto (pulpa + piel) fue de 400mg/100g en promedio. En el caso de la línea regular, la mezcla (pulpa+piel+azúcares) fue de 320mg/100g y en el dulce fue

de 370mg/100g. Se observa que el contenido de polifenoles totales en el dulce se corresponde con la proporción de pulpa en el producto final. Esto estaría indicando que el proceso productivo no afectaría la concentración de estos compuestos bioactivos. Por otro lado, se puede observar que tanto en el desecho 1 como en el 2 (conformados principalmente por restos de piel y semillas) la proporción de polifenoles es alta, a partir de la cual se podría plantear la recuperación de los mismos y posterior utilización. En el caso de la línea baja en hidratos de carbono, se observa la misma tendencia que en la regular, manteniéndose el contenido de polifenoles en el dulce de acuerdo a la proporción de pulpa en la misma.

Figura 1. Concentración de polifenoles totales en muestras analizadas. **A)** Línea regular **B)** Línea Light.

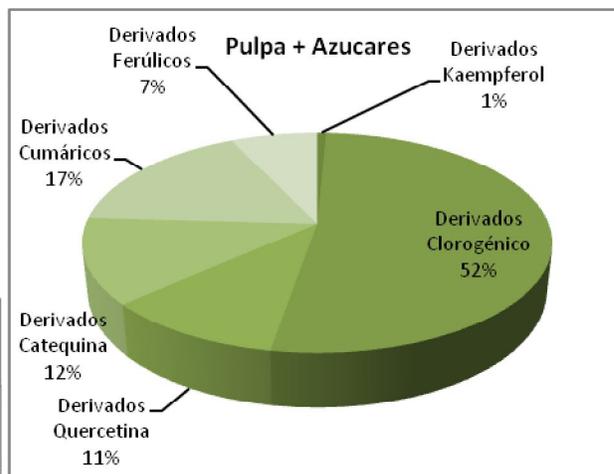
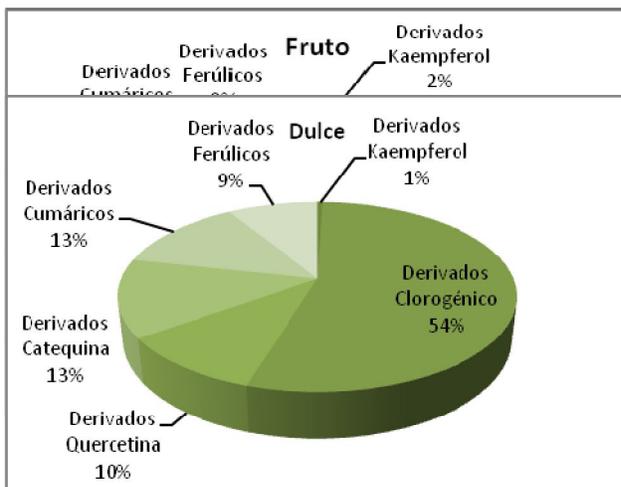


Teniendo en cuenta la proporción de polifenoles totales encontrados en las muestras, se prosiguió con la identificación de los mismos por HPLC-DAD-MS/MS (Cromatografía Líquida de Alta Performance con detección UV-Vis y espectrometría de Masas). La identificación de los compuestos fue llevada a cabo mediante el análisis del espectro de masas (MS), del patrón de fragmentación (MS/MS) y de los espectros UV-VIS. En total se pudieron identificar 16 compuestos polifenólicos en las muestras a saber: Ácido quínico, Ácidos hidroxixinámicos (dicafeico, 5-O-cafeoylquinico, 4-O-cafeoylquinico, 5-O-coumaroylquinico, 3-O-coumaroylquinico y 5-O-feruoylquinico); Flavanoles (dímero de procianidinas, catequina y epicatequina) y Flavonoles (quercetina, quercetina-rutinosido, quercetina hexósido, kaempferol hexósido y kaempferol rutinósido).

En la **Figura 2** puede observarse que la composición en polifenoles, agrupados según la estructura química, a lo largo del proceso no varía al igual que los polifenoles totales. Además puede observarse que los derivados del ácido clorogénico son los mayoritarios en todas las matrices. Los resultados aquí encontrados coinciden con los publicados por (Silva, *et al.*, 2002; 2004).

Figura 2. Porcentajes de polifenoles según la familia a la que pertenecen según tipo de muestra.

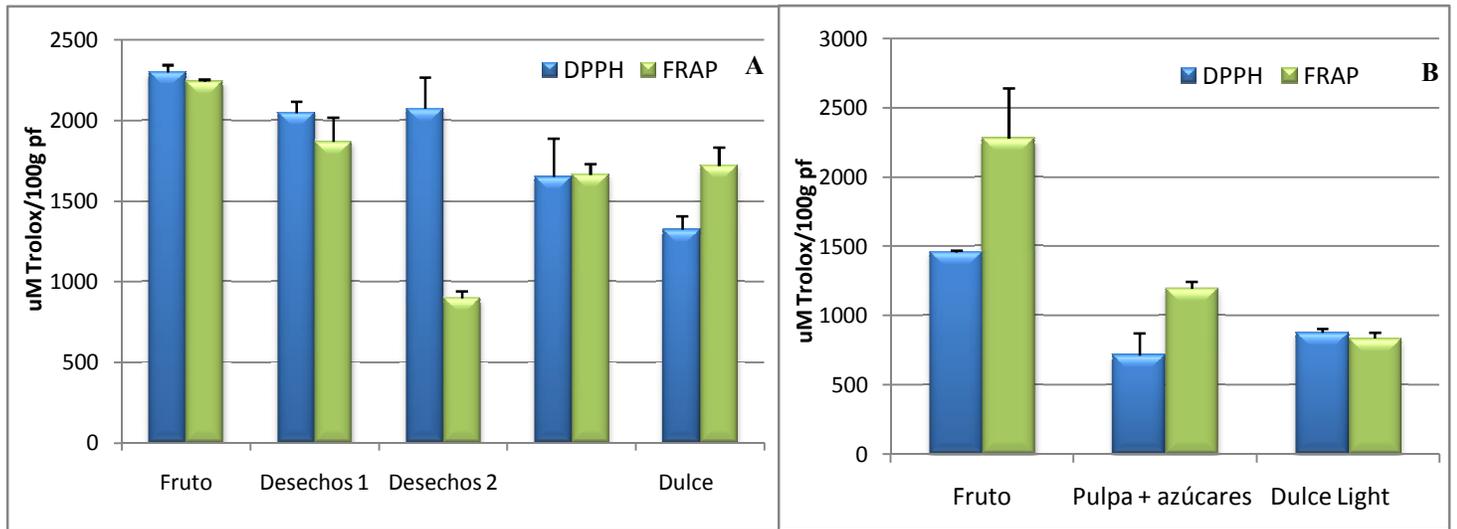
Se conoce que los polifenoles son capaces de actuar en nuestro organismo captando radicales libres, a través de su poder



reductor o a través del estímulo del sistema de defensa endógeno. Teniendo en cuenta su forma de acción se utilizaron dos métodos in vitro para la evaluación de la actividad antioxidante. Por un lado el poder de captar radicales libres a través del método DPPH y

el poder reductor a través del método FRAP. En la **Figura 3** pueden observarse los resultados obtenidos de actividad antioxidante para las muestras estudiadas, en donde se puede ver que sigue una tendencia similar que el contenido de polifenoles totales.

Figura 3. Actividad antioxidante in vitro. A) Línea regular B) Línea light.



5. Conclusiones

Todas las muestras analizadas en este estudio presentaron cantidades significativas de polifenoles y actividad antioxidante (fruto, pulpa y dulce). Por otro lado, se pudo comprobar que no hay pérdida significativa en la cantidad de polifenoles ni de la actividad antioxidante durante el proceso productivo. Una porción de dulce de membrillo regular aporta **148 mg de polifenoles** que es comparable con la cantidad ingerida en **media copa de vino**. Los compuestos polifenólicos identificados son reconocidos científicamente como beneficiosos para la salud (anti cancerígeno, antiinflamatorio, antineurodegenerativo, etc).

Bibliografía

- Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996, 239, 70-76.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens. Wiss. Technol.* 1995, 28, 25–30.
- Campos-Esparza, M.R.; Sanchez-Gomez, M.V.; Matute, M. Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidante polyphenols. *Cell calcium*. 2009, 45, 358-368.
- Elsayed, N.M. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: A dynamic environmental-nutritioanl interaction. *Nutrition*. 2001, 17, 828-834.
- Fattouch, S.; Caboni, P.; Coroneo, V.; Tuberoso, C.I.G.; Angioni, A.; Dessi, S.; Marzouki, N.; Cabras, P. Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 963-969.
- Gozin, A; Sellak, H.; Franzini, E.; Pasquier, C. Reactive oxygen species increase neutrophil adherence to endothelial cells and activate tyrosine phosphorylation of cytoskeleton proteins. En: *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. Packer, L. ; Hiramatsu, M. ; Yoshikawa, T. (Eds.) Academic Press., San Diego pp. 371, (1999).
- Halliwell, B. Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*. 1995, 49, 1341-1348.
- Hertog, M.G.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; Fehily, A.M.; Sweetnam, P.M.; Elwood, P.C.; Kromhout, D. Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996, 5, 673-677.
- Kaur, C.; Kapoor, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables. The millennium’s health. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2001, 36, 703-725.
- Matsui, T.; Kobayashi, M.; Hayashida, S.; Matsumoto, K. Luteolin, a Flavone, Does Not Suppress Postprandial Glucose Absorption Through an Inhibition of α -Glucosidase Action. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002, 66, 689-692.
- Oliveira, A.P.; Pereira, J.A.; Andrade, P.B.; Valentao, P.; Seabra, R.M.; Silva, B. Phenolic profile of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 7926-7930.

Pereira, M.D., Herdeiro, P.N.; Fernandes, P.N.; Eleutherio, E.C.A.; Panek, A.D. Targets of oxidative stress in yeast sod mutants. *Biochimica et Biophysica acta*. 2003, 1620, 245-251.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999, 26, 1231–1237.

Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem*. 2001, 8, 797-807.