

APLICACIÓN DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS, CROMATOGRÁFICAS Y METABOLÓMICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN, AUTENTIFICACIÓN Y TRAZABILIDAD DE LA FRESA

Raúl González-Domínguez, Ana Sayago, Ángeles Fernández-Recamales
Análisis Agroalimentario, Salud y Economía Circular, Facultad de Ciencias Experimentales,
Universidad de Huelva. Huelva, España.

Introducción

La composición química de los alimentos está estrechamente relacionada con sus propiedades organolépticas, nutricionales y nutracéuticas. Sin embargo, el contenido de nutrientes, compuestos bioactivos y de otros componentes en los alimentos puede verse influenciado por múltiples factores, incluyendo el origen geográfico y factores ambientales (e.g., clima, tipo de suelo), el genotipo (e.g., variedad, raza), así como las condiciones de cultivo (e.g., tipo de riego) o de cría (e.g., alimentación) [1]. Además, la calidad de los alimentos también depende en gran medida de un correcto control a lo largo de toda la cadena de suministro, desde la producción inicial, pasando por el procesado, envasado y transporte, hasta su comercialización final [2]. Por lo tanto, estrictas estrategias de control de calidad son necesarias en la industria alimentaria con el fin de asegurar la autenticidad, trazabilidad y seguridad de los alimentos. En este sentido, uno de los campos de investigación de mayor auge en análisis agroalimentario es la optimización y validación de herramientas analíticas precisas, robustas y de alto rendimiento (*high-throughput*) para la caracterización química de los alimentos y la búsqueda de posibles marcadores de autenticidad, trazabilidad y adulteración. Con este fin, numerosos métodos físico-químicos se han propuesto en los últimos años, desde el empleo de técnicas tradicionales basadas en espectroscopía (e.g., Infrarrojos, Raman, Ultravioleta-Visible) y en la determinación cromatográfica de determinados analitos de interés (e.g., análisis del perfil de azúcares mediante cromatografía líquida, o de ácidos grasos mediante cromatografía de gases) [3], hasta la aplicación de herramientas no dirigidas (e.g., metabolómica) [4]. A su vez, estas técnicas de análisis normalmente generan grandes conjuntos de datos que requieren del empleo de herramientas quimiométricas avanzadas con el fin de extraer la mayor cantidad de información posible (e.g., métodos de reconocimiento de patrones, *machine learning*) [5].

La fresa (*Fragaria × ananassa* Duch.) es uno de los frutos rojos de mayor producción y consumo en todo el mundo. Aunque se puede cultivar en un amplio abanico de zonas climáticas, la mayor parte de la producción comercial se limita a zonas con temperaturas templadas estacionales como Huelva (suroeste de España), donde la fresa es uno de los cultivos más importantes gracias a sus características climáticas, calidad del suelo y del agua. Debido a su alto contenido en nutrientes,

compuestos esenciales y bioactivos, la fresa es considerada como un alimento funcional cuyo consumo ha demostrado reducir el estrés oxidativo posprandial, la hiperglucemia, la hiperlipidemia y la inflamación, y se ha asociado con la prevención y una menor incidencia de enfermedades crónicas y degenerativas, como enfermedades cardiovasculares y cáncer [6-7]. En particular, la fresa es una fuente rica en compuestos fenólicos, entre los que destacan los antocianos, flavan-3-oles, flavonoles y derivados del ácido elágico, los cuales poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y cardioprotectoras [8]. Además, este fruto rojo también presenta un alto contenido en fibras dietéticas, minerales y vitaminas. Aparte de estos compuestos bioactivos, la fresa también contiene numerosos metabolitos primarios que participan en el metabolismo central responsable del crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas. Entre ellos, los principales componentes solubles de la fresa son los azúcares (e.g., glucosa, fructosa, sacarosa) y ácidos orgánicos (e.g., ácido cítrico, ácido málico), los cuales a su vez juegan un papel crucial en el sabor y el aroma de esta fruta [9].

En este contexto, en el grupo de investigación "Análisis Agroalimentario, Salud y Economía Circular" de la Universidad de Huelva se han desarrollado durante los últimos años distintas metodologías analíticas para la caracterización de la composición química de los alimentos, y en particular de la fresa. Asimismo, estas técnicas han sido empleadas como herramientas de trazabilidad y autenticidad para estudiar la influencia del genotipo y las condiciones de cultivo sobre el perfil químico característico de la fresa.

Análisis de los componentes mayoritarios de la fresa: azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y elementos minerales

Para obtener una caracterización exhaustiva del perfil nutricional y nutracéutico de la fresa, empleamos un enfoque multi-analítico basado en la combinación de técnicas de cromatografía líquida con detector ultravioleta (HPLC-UV), cromatografía líquida con detector de índice de refracción (HPLC-RI) y espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) para el análisis de ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, azúcares, y elementos minerales, respectivamente [10]. Con el fin de evaluar el impacto de los factores varietales y agronómicos en la composición química de la fresa, esta

metodología fue aplicada a muestras de cinco variedades distintas (Aromas, Camarosa, Diamante, Medina, Ventana) producidas en dos sistemas de cultivo (sistema de cultivo “sin suelo” abierto/cerrado) en dos campañas consecutivas bajo diferentes condiciones climáticas. Los análisis mostraron un alto contenido de azúcares en todas las muestras, siendo predominantes los monosacáridos (i.e., glucosa, fructosa) en todas las variedades excepto en Camarosa, donde se detectó una mayor concentración de sacarosa. El ácido cítrico fue el ácido orgánico mayoritario, seguido de los ácidos málico y, en menor medida, ascórbico y tartárico. Con respecto a los polifenoles, los antocianos fueron las especies predominantes, mientras que el perfil mineral estuvo principalmente representado por cinco elementos mayoritarios (potasio, fósforo, calcio, sodio y magnesio). El análisis multivariante de los resultados evidenció que las cinco variedades investigadas mostraron diferencias significativas en el contenido de antocianos, ácidos fenólicos, sacarosa y ácido málico. Por otro lado, las condiciones climáticas y el sistema de cultivo fueron responsables de pequeños cambios en el perfil fenólico, observándose un mayor contenido de antocianos y polifenoles totales en los frutos cultivados bajo temperaturas más extremas y mayor tasa de precipitaciones, así como en sistemas cerrados de cultivo “sin suelo”.

Caracterización del perfil de compuestos fenólicos de la fresa

Un método simple, sensible y rápido basado en el empleo de cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) fue optimizado y validado para la determinación de compuestos fenólicos típicos de la fresa, incluyendo ácidos fenólicos, ácido elágico y derivados, flavonoles, flavonas, flavan-3-oles y antocianos [11]. A continuación, esta metodología fue aplicada con el objetivo de investigar el efecto del genotipo y de las diferentes condiciones agronómicas (conductividad eléctrica de irrigación, tipo de sustrato, tipo de macrotúnel) en la producción de estos metabolitos secundarios. El estudio de tres variedades de fresa con diferente sensibilidad a las condiciones ambientales (Camarosa, Festival, Palomar) evidenció que el cultivar más resistente (Camarosa) se caracteriza por un perfil fenólico más abundante, con un mayor contenido en antocianos, ramnósido del ácido elágico, quercetina 3-glucurónido y procianidina B2, lo que podría indicar la sobre-expresión de la ruta metabólica del shikimato-malonato (Figura 1). Asimismo, el empleo de macrotúneles cerrados, alta conductividad eléctrica de irrigación y fibra de coco como sustrato indujo la acumulación de varios antocianos y derivados del ácido elágico en las tres variedades estudiadas.

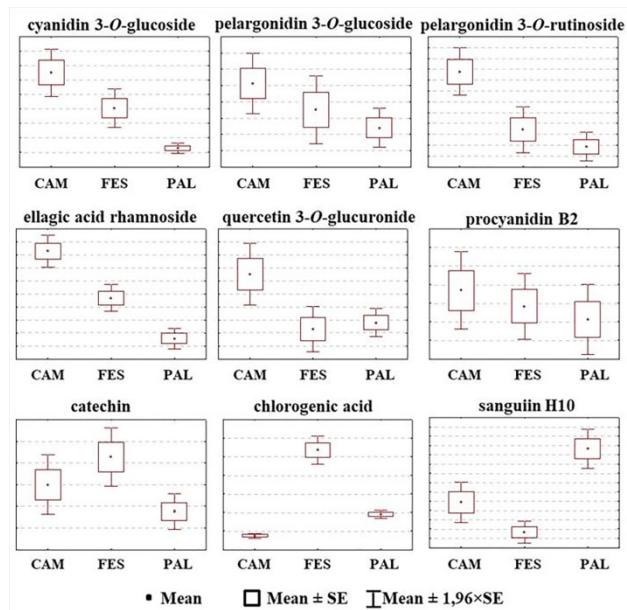


Figura 1. Diferencias en el contenido de compuestos fenólicos entre las variedades Camarosa (CAM), Festival (FES) y Palomar (PAL). Reproducido de Akhatou et al. 2017 [11].

Caracterización del perfil de compuestos volátiles de la fresa

Los compuestos volátiles juegan un papel esencial en las características organolépticas de los alimentos, y por lo tanto pueden ser de gran utilidad como posibles marcadores de autenticidad y trazabilidad. En este contexto, en nuestro grupo de investigación se ha optimizado un método basado en micro-extracción en fase sólida con espacio de cabeza acoplado a cromatografía de gases (HS-SPME-GC) para evaluar la influencia varietal (Festival, Candonga, Camarosa) en el perfil volátil de fresas cultivadas en sistemas “sin suelo” [12]. Se observó que las variedades Festival y, en menor medida, Candonga se caracterizaron por un mayor contenido de compuestos aromáticos, entre los que se incluyen ésteres, furanonas y terpenos. En particular, los compuestos volátiles más abundantes detectados en las tres variedades de fresa fueron el butirato de metilo, hexanoato de hexilo, linalol, geraniol y furaneol. De manera complementaria, la aplicación de enfoques quimiométricos de reconocimiento de patrones, incluido el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante lineal (LDA), demostró que estos compuestos volátiles podrían emplearse como descriptores químicos para discriminar entre variedades de fresa, siendo el geraniol y el hexanoato de hexilo los marcadores con un mayor poder de diferenciación entre grupos.

Aplicación de técnicas metabolómicas para investigar el efecto del genotipo y de las condiciones de cultivo en el metaboloma primario

La metabolómica ha emergido en los últimos años como una herramienta muy poderosa para la caracterización de los alimentos de forma global, complementando así

otras técnicas tradicionales de análisis dirigido. En particular, el metaboloma primario, constituido por azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y otros metabolitos de bajo peso molecular, juega un papel vital en el crecimiento de las plantas y la maduración de los frutos, y por tanto contribuyen de manera significativa en la calidad y características sensoriales de los alimentos. Con el fin de caracterizar el metaboloma primario de la fresa de forma precisa y sensible, se propuso el empleo de una plataforma metabolómica no-dirigida basada en el acoplamiento cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) (Figura 2) [13]. El análisis metabolómico de tres variedades de fresa (Camarosa, Festival, Palomar) cultivadas en sistemas "sin suelo" puso de manifiesto que el genotipo y las condiciones de cultivo son responsables de importantes diferencias en los niveles de varios azúcares (fructosa, glucosa), ácidos orgánicos (ácido málico, ácido cítrico), aminoácidos (alanina, treonina, ácido aspártico), y otros metabolitos (mio-inositol).

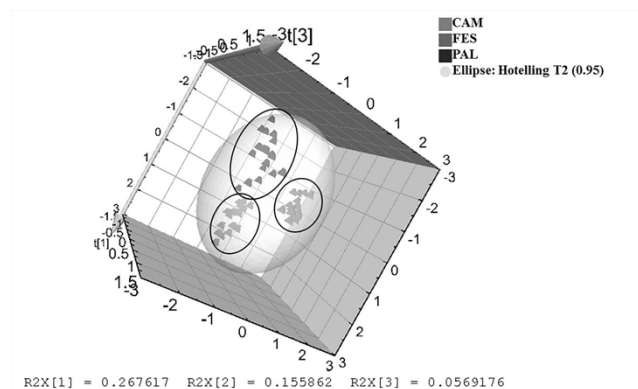


Figura 2. Clasificación multivariante mediante PCA de las variedades Camarosa (CAM), Festival (FES) y Palomar (PAL) en base a su perfil metabolómico obtenido mediante GC-MS. Reproducido de Akhatou et al. 2016 [13].

En conjunto, estos resultados evidencian el gran potencial de la metabolómica para caracterizar las alteraciones metabólicas producidas en la fresa en respuesta a los mecanismos de tolerancia frente al estrés medioambiental.

Conclusiones

La composición de los alimentos, y en particular de la fresa, puede verse influenciada por factores genéticos, medioambientales y relacionados con las condiciones de cultivo. Por tanto, la caracterización de los perfiles nutricionales y de compuestos bioactivos destaca como una herramienta de gran potencial en estudios de autenticidad y trazabilidad.

Referencias

1. Sobolev AP, Circi S, Capitani D, Ingallina C, Mannina L. Molecular fingerprinting of food authenticity. *Current Opinion in Food Science*, 2017, 16, 59-66.
2. Aung MM, Chang YS. Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives. *Food Control*, 2014, 39, 172-184.
3. Wadood SA, Boli G, Xiaowen Z, Hussain I, Yimin W. Recent development in the application of analytical techniques for the traceability and authenticity of food of plant origin. *Microchemical Journal*, 2020, 152, 104295.
4. Li S, Tian Y, Jiang P, Lin Y, Liu X, Yang H. Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 22, 1-22.
5. Roberts JJ, Cozzolino D. An Overview on the Application of Chemometrics in Food Science and Technology-An Approach to Quantitative Data Analysis. *Food Analytical Methods*, 2016, 9, 3258-3267.
6. Giampieri F, Forbes-Hernandez TY, Gasparrini M, Alvarez-Suarez JM, Afrin S, Bompadre S, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food & Function*, 2015, 6, 1386-1398.
7. Basu A, Nguyen A, Betts NM, Lyons TJ. Strawberry as a functional food: an evidence-based review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2014, 54, 790-806.
8. Battino M, Beekwilder J, Denoyes-Rothan B, Laimer M, McDougall GJ, Mezzetti B. Bioactive compounds in berries relevant to human health. *Nutrition Reviews*, 2009, 67, S145-S150.
9. Kallio H, Hakala M, Pelkkikangas AM, Lapveteläinen A. Sugars and acids of strawberry varieties. *European Food Research and Technology*, 2000, 212, 81-85.
10. González-Domínguez R, Sayago A, Akhatou I, Fernández-Recamales Á. Multi-Chemical Profiling of Strawberry as a Traceability Tool to Investigate the Effect of Cultivar and Cultivation Conditions. *Foods*, 2020, 9, 96.
11. Akhatou I, Sayago A, González-Domínguez R, Fernández-Recamales Á. Application of Targeted Metabolomics to Investigate Optimum Growing Conditions to Enhance Bioactive Content of Strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65, 9559-9567.
12. González-Domínguez R, Sayago A, Akhatou I, Fernández-Recamales Á. Volatile Profiling of Strawberry Fruits Cultivated in a Soilless System to Investigate Cultivar-Dependent Chemical Descriptors. *Foods*, 2020, 9, 768.
13. Akhatou I, González-Domínguez R, Fernández-Recamales Á. Investigation of the effect of genotype and agronomic conditions on metabolomic profiles of selected strawberry cultivars with different sensitivity to environmental stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 101, 14-22.