

Caracterización química y funcional de bebidas formuladas a base de *Ficus carica* y *Clinopodium gillesii*

Cabana, Roxana del C.¹; Quispe, Cintia L.²; Galeán, Eliana del R.²; Viturro, Carmen I.¹; Moreno, Silvia³.

(1) Laboratorio PRONOA, CIT JUJUY, CONICET, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Jujuy. rcabana@fi.unju.edu.ar, rdlccabana@yahoo.com.

(2) Laboratorio PRONOA, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Jujuy.

(3) Laboratorio de Bioquímica vegetal, Instituto de Investigaciones Bioquímicas Buenos Aires-IIBBA-CONICET.

RESUMEN: Se evalúa el poder antioxidante de bebidas formuladas a partir de frutos de *Ficus carica* aditivadas con distintas concentraciones de un extracto polar de la planta aromática medicinal nativa *Clinopodium gillesii*. Se midió la actividad antirradicalaria (AAR) frente al DPPH• y al NO•; así como el contenido de fenoles totales (FT), de antocianinas monoméricas totales (AMT) y de ácido ascórbico. Además fueron determinados color, °Brix, pH y sólidos solubles totales. Todas las muestras presentaron AAR frente al radical DPPH•, y en menor medida frente al NO•. El agregado del extracto de *C. gillesii* representó un incremento promedio del 25% en la AAR frente a NO•, respecto a la bebida no aditivada, mientras que para el DPPH•, el incremento fue del 38%. El contenido de AMT en la bebida disminuyó con el agregado del extracto, por tanto las AMT no jugarían un rol determinante en dicha AAR. Se observaron correlaciones positivas entre la concentración del extracto activo, los FT y la actividad antirradicalaria de las bebidas formuladas, lo que probaría que el incremento del valor biológico antioxidante de la bebida a base de *Ficus carica*, es debida a la adición del extracto activo de *C. gillesii*.

ABSTRACT: The antioxidant power of beverages from fruits of *Ficus carica*, with the addition of different concentrations of a polar extract medicinal aromatic plant native *Clinopodium gillesii* is evaluated. The antiradical activity (ARA) against DPPH • and NO •; the total monomeric anthocyanins (TMA), ascorbic acid and total phenol content (TP) were measured. They were also determined color, ° Brix, pH and total soluble solids. All samples exhibited ARA against DPPH• radical and ARA against NO • was lesser. The addition of *C. gillesii* extract increases 25% the AAR against NO • regarding not additivated drink, while for DPPH •, the increase was 38%. The content of TMA in the drink decreased with the addition of the extract, so the TMA would not play a decisive role in this AAR. Positive correlations between the concentration of the active extract, TP and antiradical activity of formulated beverages were observed. This would prove that the increased antioxidant biological value of *Ficus carica* drink, was due to the addition of the active extract *C. gillesii*.

Palabras claves: *Ficus carica*, actividad antirradicalaria, *Clinopodium gillesii*, bebida funcional.

Keywords: *Ficus carica*, antiradical activity, *Clinopodium gillesii*, functional beverages

1 INTRODUCCIÓN

Ficus carica o higuera es un árbol de pequeño porte o arbusto de la familia Moraceae, una de las numerosísimas especies del género *Ficus*. Esta

planta, crece principalmente en regiones subtropicales y tropicales de todo el mundo, generalmente con dos cosechas, una de higos en primavera, de mayor tamaño, y otra de higos en otoño (Baby & Raj, 2011).

En la provincia de Jujuy existen cultivos de la variedad Brown turkey en la zona de las yungas y valles, algunos de ellos llegan a exportarse, sin ningún agregado de valor.

El fruto es comestible, incluyendo su piel, cuando ha llegado a su punto óptimo de maduración, desarrollando su exquisito sabor y agradable aroma característico. Contiene una cantidad de azúcares superior al resto de la mayoría de las frutas. Es pobre en grasas y en proteínas, pero rico en agua, fibras y minerales, especialmente calcio. Se le atribuyen algunas propiedades beneficiosas para la salud como: expectorante, laxante, antiirreumático, y regulador de la presión arterial (Vinson, 1999; Guarrera, 2005).

Existe información en la literatura científica sobre la caracterización nutricional y fitoquímica de variedades, genotipos, cultivares de higos (Solomon et al., 2006; Oliveira et al., 2009; Ercisli et al., 2012; Crisosto et al., 2010, entre otros autores), pero muy poca sobre productos manufacturados de higo (Tanwar et al., 2014; Chauhan et al., 2015).

Clinopodium gilliesii, es una planta aromática y medicinal, propia de la región Andina, donde suele ser abundante. En anteriores trabajos evaluamos la actividad antioxidante de distintas poblaciones de esta especie y distintos extractos de la misma (Cabana et al., 2009; Cabana et al., 2013), en forma preliminar, el aporte de minerales de infusiones (Viturro et al., 2004); identificamos sus metabolitos volátiles (Viturro et al., 2000) y los no volátiles que serían responsables de la actividad antioxidante (Cabana et al., 2013).

En este trabajo se evalúa el valor biológico antioxidante de formulaciones en base al jugo del fruto de *Ficus carica* obtenidas artesanalmente y aditivadas con distintas concentraciones de un extracto polar de *Clinopodium gilliesii*.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materia prima

Se utilizó higo maduro de la cosecha de primavera-verano, proveniente de la localidad de Arroyo Colorado (Santa Clara-Jujuy).

Se colectó *Clinopodium gilliesii* en una población nativa de la especie cercana a la localidad de Abra Pampa, departamento Cochínoca, Jujuy.

2.2 Obtención del extracto activo

Hojas y tallos tiernos triturados de *C. gilliesii* se secaron a temperatura ambiente hasta una humedad promedio del 40%. Este material

vegetal, tras el agregado de agua destilada fue llevado a ebullición. El extracto resultante fue filtrado a través de un embudo Büchner y luego concentrado al vacío en un rotavapor BÜCHI no superando los 50°C. El extracto concentrado fue conservado a -4°C hasta su utilización. La extracción fue realizada por triplicado.

2.3 Formulaciones de bebidas

Las formulaciones de jugo de *Ficus carica* con y sin el extracto activo de *C. gilliesii* fueron las siguientes:

(a) Jugo del fruto entero de *Ficus carica* (JH) obtenido por el productor en la zona de origen del cultivo, con frutos seleccionados según las Buenas Prácticas Agrícolas (EUREPGAP 2004), y tratados en una despulpadora de frutas.

(b) JH Pasteurizado (JHP), el jugo JH sin el agregado de ningún aditivo se sometió a una pasteurización tipo artesanal, y posteriormente se envasó.

(c) JF1: al jugo JH se le agregó ácido cítrico para corrección de acidez, inmediatamente se lo sometió a pasteurización y la bebida obtenida se envasó.

(d) JF2: al jugo JH se le agregó ácido cítrico para corrección de acidez y se le aditivó extracto de *C. gilliesii* hasta 500 ppm. La bebida resultante inmediatamente se homogeneizó, pasteurizó y envasó.

(e) JF3: al jugo JH se le agregó ácido cítrico para corrección de acidez y se le aditivó extracto de *C. gilliesii* hasta 1000 ppm. La bebida resultante inmediatamente se homogeneizó, pasteurizó y envasó.

Todas las formulaciones fueron envasadas en caliente en frascos previamente esterilizados.

2.4 Determinaciones fisicoquímicas

Los grados Brix de las bebidas resultantes, se midieron con un refractómetro de ABBE Modelo 2WAJ siguiendo las pautas del método AOAC 932.14C.

El pH fue medido con un pHmetro Adwa AD111. Los sólidos Solubles Totales (SST) se midieron según AOAC 920.151 (método gravimétrico) y se expresaron como mg/mL de SST.

Se midieron los parámetros de color según CIE (Comisión Internacional de l'Eclairage): L* (luminosidad), a* (valor de verde-rojo), y b* (valor de azul-amarillo), usando un Espectrofotómetro UV-V Hunter Lab. Se utilizó una placa blanca D65 de referencia para la calibración, un ángulo de visión de 10°. Se calculó Chroma ($C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$), que indica la intensidad del color.

2.5 Determinaciones químico-biológicas

Las determinaciones en el extracto y bebidas formuladas fueron realizadas en un microplate reader EPOCH BioTeK.

La actividad antirradicalaria (AAR) frente al radical sintético DPPH se determinó utilizando solución metanólica del radical estable DPPH• y una solución de Trolox como referencia. Se evaluó el porcentaje de decoloración (%D) por la disminución de la absorbancia del DPPH• a 517 nm en la mezcla de reacción, de acuerdo a lo descrito por Oliveira et al. (2009). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado con tres repeticiones.

La AAR frente al radical Oxido Nítrico (NO•) por parte del extracto y bebidas, se determinó según Oliveira et al. (2009) con algunas modificaciones. En soluciones acuosas y a pH fisiológico el Nitroprusiato de sodio (SNP) genera espontáneamente NO• (a los 60 minutos en presencia de luz), éste reacciona con el oxígeno para producir nitrito. El nitrito se determina por su reacción con sulfanilamida para dar una sal de diazonio que al reaccionar con naftiletildiamina da un compuesto coloreado que absorbe a 526 nm (reacción de Griess). En presencia de compuestos secuestradores del radical oxido nítrico, la absorbancia disminuye.

El contenido de antocianinas monoméricas Totales (AMT) fue determinado usando el método diferencial de pH (Lee et al., 2005) con algunas modificaciones. La absorbancia fue medida a 513 y 700 nm y se expresa como equivalentes de cianidina-3-rutinosido (mg ECi-3-Ru /100mL), ya que ésta es la antocianina mayoritaria en frutos de *Ficus carica* (Dueñas et al., 2008).

El ácido ascórbico (AA) fue determinado mediante la técnica descrita por Barros et al. (2010) y Klein & Perry (1982), con algunas modificaciones. Se preparó una curva de calibración de 1-0,0625 mg/mL de AA en ácido metafosfórico al 3%. Las muestras previamente preparadas fueron mezcladas con 2,6-dicloroindofenol y la absorbancia fue medida a los 30 minutos a 517 nm. Los resultados fueron expresados como µg de AA/100 mL de muestra. Contenido total de polifenoles (FT): Para determinar la cantidad total de polifenoles, se usó la técnica colorimétrica con el reactivo de Folin Ciocalteu descrita en la norma internacional ISO 14502-parte 1, adaptándola a un microplate reader (Ainsworth y Gillespie, 2007). Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico (EAG) equivalente/100mL de muestra.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El Color de las bebidas JHP, JF1, JF3 fue medido en modo transmitancia y en términos de L*, a, b* y C, valores que se muestran en la tabla 1 .L* varía de la siguiente forma: JHP< JF1<JF3 y C lo hace inversamente: JHP> JF1>JF3, reflejando que la corrección de acidez y aditivación oscurece el color púrpura (provisto por fruto de *Ficus carica*) a la vez que se intensifica. La variación de a* y b* muestra que el pH y la aditivación del extracto favorecen los rojos y amarillos. Los valores medidos de los parámetros de color en modo reflectancia L*:30-27; a*:10-13, b*:4-7 se encuentran dentro de los que presentan los frutos maduros de la variedad Brown-Turkey (Solomon et al., 2006), que es la que se usó para la formulación de las bebidas.

Los grados Brix (tabla 1) de las bebidas resultantes resultaron estar en el orden de los valores sugeridos en el CAA para bebidas de otras frutas de las mismas características que las formuladas con *Ficus carica* sin agregado alguno de azúcares. En cambio fue necesario el agregado de ácido cítrico para regular el pH (tabla 1).

Los resultados de la actividad antirradicalaria (AAR) de las bebidas en diluciones sucesivas de las mismas, expresada como porcentaje de decoloración del radical DPPH, y de radical NO, se muestran en las figuras 1 y 2

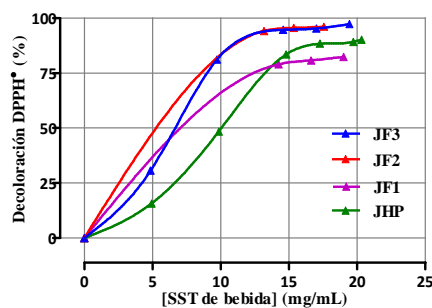


Figura 1. porcentaje de decoloración del radical DPPH vs las diluciones de las bebidas formuladas. (SST: sólidos solubles totales).

Todas las bebidas presentaron una actividad antirradicalaria superior al 50% frente al radical sintético DPPH. Para calcular el IC50 (concentración inhibitoria del 50% de radicales) de cada una de ellas, fue necesario preparar diluciones sucesivas. El menor IC50 ($5,3 \pm 0,1$ mg SST/mL) corresponde a la de la formulación JF3 y el mayor IC50 ($8,9 \pm 0,2$ mg SST/mL) corresponde a la formulación sin ninguna aditivación, JHP. Los IC50 se contrastaron con los del antioxidante de referencia: Trolox, para el cual el IC50 resulto $9,7 \pm 0,5$ μ g/mL. Así, las bebidas tienen TEAC_{DPPH} (capacidad antioxidante equivalente en Trolox frente al DPPH•) de 124,1 μ mol/100mL para JF3 y 73,9 para JHP.

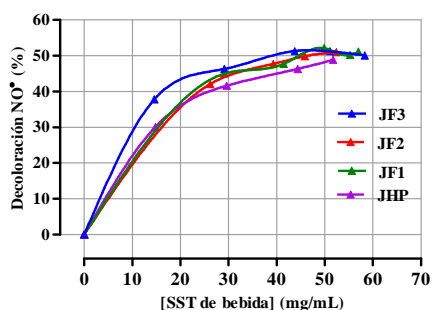


Figura 2. Porcentaje de decoloración del radical NO vs las diluciones de las bebidas formuladas. (SST: sólidos solubles totales)

Todas las muestras presentaron una actividad antirradicalaria frente al radical NO, sin embargo esta fue menor a la presentada frente al radical DPPH. El agregado del extracto de *C. gl.* representó un incremento del 25% en la actividad antirradicalaria frente a NO, respecto a la bebida no aditivada, mientras que para el DPPH, el incremento fue del 38%.

Los resultados obtenidos respecto al contenido de AMT de las distintas preparaciones, permite inferir que La incorporación de ácido cítrico (para la disminución del pH) no implica diferencia significativa en el contenido de AMT con respecto al producto no aditivado (JHP).

Sin embargo el agregado del extracto de *C. gl.* determina una disminución (concentración dependiente) de las AMT, probablemente por interacción de estas últimas con los compuestos del extracto. Por otro lado las AMT no contribuirían significativamente al poder

antioxidante de los productos, ya que su disminución no se traduce en una disminución concomitante de la capacidad antirradicalaria.

La corrección de acidez mejora el color de la bebida, debido al corrimiento batocrómico producido en las antocianinas de *Ficus carica*, y no se ve afectado por la aditivación con el extracto de *C. gl.*, ya que el valor de a^* no varía significativamente.

En general el color TEAC, AMT y FT determinados se corresponden a los informados por Solomon et al (2006) y Ercisli et al. (2012) para higos maduros de piel negra-púrpura.

4 CONCLUSIONES

La variación de los parámetros de color L y C reflejan que la corrección de acidez y aditivación mejoran el color púrpura (provisto por fruto de *Ficus carica*). Los grados Brix deseables en una bebida frutal son logrados sin necesidad de azúcar agregado.

El agregado del extracto de *C. gl.* representó un incremento del 25% en la actividad antirradicalaria frente a NO, respecto a la bebida no aditivada, mientras que para el DPPH, el incremento fue del 38%.

El contenido de AMT en la bebida disminuyó con el agregado del extracto, por tanto las AMT no jugarían un rol determinante en dicha AAR

Se observaron correlaciones positivas entre la concentración del extracto activo, los FT y la actividad antirradicalaria de las bebidas formuladas, lo que probaría el incremento del valor biológico antioxidante de la bebida a base de *Ficus carica*, con la adición del extracto activo de *C. gillesii*.

El fruto de *Ficus carica* con un buen potencial nutricional y fitoquímico, actualmente cultivado en Jujuy, se comercializa sin un agregado de valor relevante. En el presente trabajo mostramos que bebidas formuladas con un extracto vegetal de la zona podrían representar una alternativa relevante de agregado de valor.

Tabla 1. Determinaciones químico-biológicas y fisicoquímicas de las bebidas obtenidas a base de *Ficus carica*

	JHP ⁽¹⁾		JF1 ⁽¹⁾		JF2 ⁽¹⁾		JF3 ⁽¹⁾		
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	
% D del DPPH•	89,2	0,9	82,3	0,4	96,1	0,1	96,1	0,5	
IC50 DPPH [mg/mL]	10,0	0,1	7,03	0,1	5,26	0,1	5,26	0,1	
IC50 NO [mg/mL]	53,3	0,9	52,0	3,7	nd	----	39,1	1,3	
mg ECi-3-Ru /100mL	1,41	0,06	1,42	0,02	1,32	0,02	1,23	0,04	
mg de EAG/ 100 mL	29,2	0,9	28,4	0,9	44,1	2	59,6	2	
µg AA /100mL	< a 1		< a 1		< a 1		< a 1		
Color	L	72,8	0,2	51,8	0,2	---		42,7	0,2
	a	16,8	0,1	39,0	0,1	---		38,8	0,1
	b	25,6	0,1	36,0	0,1	---		45,0	0,1
	Chr	30,6	0,3	53,1	0,3	---		59,4	0,3
pH	4,3	0,1	3,5	0,1	3,6	0,1	3,6	0,1	
°Brix	16,0		16,3		16,5		16,7		
SS totales mg/mL	172,0	0,7	171,5	0,5	172,5	0,7	175,0	0,7	

(1)JHP: bebida no aditivada; JF1:bebida con corrección de acidez; JF2 y JF3: bebidas aditivadas y con corrección de acidez.

5 REFERENCIAS

- Ainsworth, E.A., K.M. Gillespie, Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2(4):875-877, 2007.
- Baby, J and Raj, J., Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* Linn – An overview. *International Journal of Pharm Tech Research* 3 (1):08-12, 2011.
- Barros, L., S.A., Heleno, A.M. Carvalho, I.C.F.R Ferreira, Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics, *LWT - Food Science and Technology*. 43(3): 544 – 550, 2010.
- Cabana R., L. R. Silva, P. Valentao, C. I. Viturro, P. B. Andrade, Effect of different extraction methodologies on the recovery of bioactive metabolites from *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling (Lamiaceae), *Journal Industrial Crops and Products* 48: 49-56, 2013.
- Cabana, R. C., Viturro, C.I., Molina A. C. Estudios preliminares de la actividad antirradicalaria de extractos de *satureja parvifolia* de zonas Áridas de Jujuy. *Libro de resúmenes XVII SINAQO*:PN-21,2009.
- Chauhan, A., B Tanwar, and Intelli, Influence of Processing on Physicochemical, Nutritional and Phytochemical Composition of *Ficus carica* (Fig) Fruit, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 6(6): 1474-1489, 2015.
- Crisosto, CH., V. Bremer, L. Ferguson, G.M. Crisosto, Evaluating quality attributes of four fresh fig (*Ficus carica* L.) cultivars harvested at two maturity stages. *HortScience* 45:707–710, 2010.
- Dueñas, M., J.J. Perez-Alonso, C. Santos-Buelga, T. Escribano-Bailon, Anthocyanin composition in fig (*Ficus carica* L.), *J Food Comp Anal* 21:107–115, 2008.
- Ercisli, S; M. Tosun, H. Karlidag, A. Dzibur, S. Hadziabulic and Y. Aliman, Color and Antioxidant Characteristics of Some Fresh Fig (*Ficus carica* L.) Genotypes from Northeastern Turkey, *Plant Foods for Human Nutrition* 67(3):271–276, 2012.
- Guarrera, P. M. Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia* 76: 1 – 25, 2005.
- Klein, B. P. and A. K. Perry, Ascorbic Acid and Vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *Journal Of Food Science* 47:941- 945, 1982.
- Lee, J.; R. W. Durst, R. Wrolstad, Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Colaborative Study, *Journal of AOAC International* 88(5) 1269-1278, 2005.
- Oliveira, A.P., P.Valentão, J.A. Pereira, B.M. Silva, F.Tavares, P.B. Andrade, *Ficus carica* L.

- Metabolic and biological screening, *Food Chem. Toxicol.* 47, 2841–2846, 2009.
- Solomon, A., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H. E., et al., Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7717–7723, 2006.
- Tanwar, B., , B. Andallul and R. Modgil, Influence of processing on physicochemical, nutritional and phytochemical composition of *Ficus carica* L. (Fig) Products, *Asian J. Dairy & Food Res.* 33 (1) : 37 - 43, 2014
- Vinson, J. A., Functional food properties of figs. *Cereal Foods World*, 44(2):82-87,1999.
- Vituro, C. I.; Molina, A.; González, M. A. Aporte de Minerales de Infusiones de Especies de Satureja y de *Xenophyllum Poposum* del NO Argentino. *Resumenes del IX Taller Internacional sobre Calidad Sanitaria, Evaluación y Conservación de Alimentos: PEC-21*, 2004.
- Vituro, C.I.; Molina, A.C.; Guy, I.; Charles, B.; Guinaudeau, H.; Fournet, A. (2000). Essential oils of *Satureja boliviana* and *S. parvifolia* growing in the region of Jujuy, Argentina. *Flavour and Fragrance Journal* 15(6):377-382, 2000.

Agradecimientos

- Al Ing. Elias Sarrouf Galli, por proveernos de la materia prima (*Ficus carica*).
- Al SeCTER-UNJu por el soporte económico.
- Al CONICET por la beca pos doc otorgada a R.Cabana.