



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Evaluación de las Propiedades Bioactivas de Mora (*Rubus glaucus*) y Agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*), en Fresco y Durante Procesos de Transformación**

**Luisa Juana Bernal Roa**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos

Medellín, Colombia

2012



# **Evaluación de las Propiedades Bioactivas de Mora (*Rubus glaucus*) y Agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*), en Fresco y Durante Procesos de Transformación**

**LUISA JUANA BERNAL ROA**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Directora:

Ph.D. Amanda Consuelo Díaz

Línea de Investigación:

Bioactivos en matrices vegetales

Grupo de Investigación:

Aseguramiento de la calidad de alimentos y desarrollo de nuevos productos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos

Medellín, Colombia

2012

Evaluación de las Propiedades Bioactivas de Mora (*Rubus glaucus*) y Agrad  
(*Vaccinium meridionale* Swartz), en Fresco y Durante Procesos de  
Transformación

---

## **Agradecimientos**

A mis papás por su incondicional apoyo.

A la profesora Amanda Consuelo Díaz, directora de la tesis, por su acompañamiento durante el desarrollo del trabajo.

A la profesora Martha Cecilia Quicaán, por abrirme las puertas y permitirme trabajar al lado de las personas tan valiosas que conforman el ICTA.

A las profesoras Susanna Buratti y Gabriella Giovanella, DISTAM- Università degli Studi di Milano, por ese impulso inicial que fue el trabajar bajo su orientación.

Al Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores Virginia Vallejo 2009, del Departamento de Ciencia, Tecnología e Innovación-Colciencias.

Al equipo de trabajo del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos- ICTA.

A mis amigos y a las personas que llegaron a apoyar el camino: Pilar, Carlos Z., Carlos F., Juliana, Mónica, Christian, Ivonne, Jefferson, Claudia, Carolina, Nathalia, Dayan, Felipe, Laura...



## Resumen

Se planteó como objetivo del trabajo evaluar el comportamiento de las características bioactivas de la mora (*Rubus glaucus*) y agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*) durante procesos de maduración y transformación. La muestra de mora se obtuvo de un cultivo y el agraz de plantas silvestres. Se estudiaron tres estados de maduración encontrando que se presenta acumulación de antocianinas a medida que madura cada fruto, además en la mora las propiedades antioxidantes permanecen constantes mientras que en el agraz hay aumentos significativos. Se evaluó el perfil aromático de cada estado y se encontró que es posible diferenciar el estado de cosecha de los otros dos. Se evaluó los efectos del despulpa o y concentrado sobre las propiedades antioxidantes de estos frutos en el estado de cosecha, los efectos del comportamiento dependen de la muestra y de las condiciones del proceso.

**Palabras clave:** Capacidad Antioxidante, Procesamiento Frutas, Fenoles Totales, TEAC, FRAP, Nariz electrónica

## Abstract

The set objective of this project was to evaluate the behaviour of the bioactive characteristics of the blackberry and the blueberry during the ripening and transformation processes. The blackberry sample was obtained from a crop, and the blueberry from wild plants; three stages of ripening were studied where the anthocyanin accumulated as the fruit ripened. Furthermore in the blackberry antioxidant properties remained constant while there were significant increases in the blueberry. The flavor profile of each state was also evaluated and it was concluded that it is possible to differentiate the state of the crop among two others. The effects of pulping were assessed with a focus on the antioxidant properties of these fruit during the harvest stage. The behavioural effects depend on the sample and the conditions of the process.

**Keywords: Antioxidant Capacity , Fruit Process, Total Polyphenols, TEAC, FRAP, Electronic Nose**



# Contenido

Pág.

Contenido

<b>1. Objetivos.....</b>	<b>5</b>
1.1    Objetivos específicos.....	5
<b>2.    Influencia del procesamiento en el contenido de sustancias bioactivas     presentes en alimentos vegetales.....</b>	<b>7</b>
<b>3.    Materiales y Métodos.....</b>	<b>20</b>
3.1    Muestras .....	20
3.2    Determinación del Perfil Aromático .....	20
3.3    Propiedades Antioxidantes .....	22
<b>4.    Resultados.....</b>	<b>24</b>
4.1    Evaluación de las propiedades antioxidantes y el perfil aromático durante la maduración de mora ( <i>Rubus glaucus</i> Benth) y agraz ( <i>Vaccinium meridionale</i> Swartz) .....	24
4.2    Evaluación del efecto del despulpado y la concentración en las propiedades antioxidantes de mora ( <i>Rubus glaucus</i> Benth) y agraz ( <i>Vaccinium meridionale</i> Swartz) .....	48
<b>5.    Otros Resultados .....</b>	<b>67</b>
5.1    Evaluación de la capacidad antioxidante durante el proceso de obtención de pulpas vegetales.....	67
5.2    Análisis de la capacidad antioxidante en frutos rojos durante el proceso de obtención de pulpa .....	69
5.3    Evaluación del perfil aromático y propiedades antioxidantes durante la maduración de mora ( <i>Rubus glaucus</i> Benth) .....	80
5.4    Influencia de los tratamientos térmicos sobre la capacidad antioxidante de espinaca ( <i>Spinacea oleracea</i> ) .....	96
5.5    Evaluación de las condiciones de proceso y capacidad antioxidante en la elaboración de productos hortofrutícolas .....	105
<b>6.    Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>108</b>
6.1    Conclusiones .....	108
6.2    Recomendaciones .....	109

## Introducción

Los antioxidantes en general son sustancias que retrasan o previenen las reacciones de oxidación porque están en la capacidad de estabilizar radicales libres debido a la deslocalización de los anillos aromáticos que en general los conforman [1]. En este grupo de sustancias se encuentran los polifenoles (flavonoides, antocianinas, flavonoles, flavonas e isoflavononas), la vitamina C, la vitamina E, entre otros [2]. En recientes estudios se ha evaluado su importancia en la prevención de enfermedades del corazón, cáncer y enfermedades degenerativas como el Alzheimer y Parkinson [3-4].

Las principales fuentes naturales de antioxidantes son las frutas y los vegetales, por esta razón estos productos han sido investigados con la idea de determinar su poder antioxidante y las sustancias que juegan un papel importante en esta propiedad.

La mora es una buena fuente de vitaminas, minerales y fitoquímicos, es una fruta que se cultiva sin inconvenientes en Colombia y tiene proyecciones de exportación [5]. El balance azúcar/ácido, la textura, el perfil aromático y el color, derivado del contenido de antocianinas, se perciben como atributos de calidad [6]. La cosecha de mora en el país es constante y está determinada por las lluvias, en promedio en los meses de marzo, abril y mayo se observan picos de producción, el departamento con mayor representación en la producción nacional es Cundinamarca [7].

El agraz, mortiño o *bilderry* es una fruta silvestre de la familia de los arándanos reconocida por su contenido de fibra y de sustancias fitoquímicas [8]. En Colombia aún no se cuenta con datos de cultivos formalmente establecidos, pero se sabe, gracias a un estudio de análisis de riesgo de plagas, en Antioquia, que

las zonas en las que se favorece el crecimiento de este fruto son las comprendidas entre los 2.200 y 3.400 msnm [9]. Se han identificado a los departamentos de Antioquia y Boyacá como los mayores productores [10].

La industria de alimentos y bebidas en el país representa más del 20% de la industria nacional, el sector se está adaptando a las necesidades de los consumidores y está innovando hacia productos que tengan un mayor valor nutricional y contenido de bioactivos [11]. Una de las alternativas para la comercialización de frutas y la disminución de pérdidas postcosecha es su procesamiento, la elaboración de pulpas y concentrados ha tomado un papel importante ya que es un producto que facilita la fabricación de bebidas, jaleas, mermeladas, entre otros. Por éste motivo y dado que el consumidor actual está interesado en alimentos que le aporten beneficios adicionales a los de la nutrición (alimentos funcionales) se hace importante evaluar el comportamiento de las propiedades antioxidantes durante la maduración de frutas como mora y agraz, atractivas desde el punto de vista comercial, y los efectos que tienen diferentes operaciones de transformación sobre estas características.

Para lograr este objetivo el trabajo se dividió tres etapas: búsqueda de información, análisis del comportamiento de las propiedades antioxidantes y perfil aromático durante la maduración de mora y agraz y evaluación de las propiedades antioxidantes durante el procesamiento.

En la primera fase se realizó una etapa de capacitación en el *Dipartimento Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche- DISTAM* de la *Università degli Studi di Milano, Italia*, en los métodos de análisis físicoquímico: Fenoles Totales empleando el reactivo Folin-Ciocalteu, Antocianinas Totales según pH diferencial, Capacidad Antioxidante mediante reacción con los radicales DPPH y FRAP.

Los métodos fueron validados en el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos del Instituto de Ciencia y Tecnología- ICTA de la Universidad Nacional de Colombia, adicionalmente se buscaron las condiciones óptimas de trabajo para la cuantificación de la capacidad antioxidante por el método TEAC, determinación del perfil aromático de bayas utilizando nariz electrónica y el contenido de vitamina C por HPLC. Durante el desarrollo de estas actividades se realizó un trabajo como Joven Investigador-COLCIENCIAS denominado: “**Evaluación de las condiciones de proceso y capacidad**

**antioxidante en la elaboración de productos hortofrutícolas”** en el que se aplicaron las metodologías analíticas en diferentes frutas: lulo, feijoa, maracuyá, mango, mora, agraz y fresa, y hortalizas: espinaca, zanahoria y remolacha; este trabajo permitió estandarizar y documentar los procedimientos. Durante la fase inicial del trabajo de Tesis de Maestría se realizó una búsqueda bibliográfica sobre la **“Influencia del procesamiento en el contenido de sustancias bioactivas presentes en alimentos vegetales”** cuyos resultados fueron enviados a evaluación a la Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial.

La segunda etapa del trabajo consistió en la recolección de las muestras de mora y agraz en diferentes estados de maduración para ser evaluadas según parámetros fisicoquímicos, características antioxidantes, contenidos de bioactivos como fenoles totales, vitamina C y antocianinas totales, los resultados se muestran en el artículo: **“Evaluación de las propiedades antioxidantes y el perfil aromático durante la maduración de mora (*Rubus glaucus* Benth) y agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz)”** artículo que está siendo evaluado en la revista Facultad Nacional de Agronomía.

Por último en la evaluación del efecto de las operaciones de despulpado, concentración y liofilización sobre los contenidos de vitamina C, antocianinas totales, fenoles totales y poder antioxidante. Los resultados fueron dispuestos en formato de artículo científico denominado: **“Effect of pulping and concentration on antioxidant properties of the Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) and bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz)”** para ser evaluado por la revista VITAE de la Universidad de Antioquia.

# 1. Objetivos

Evaluar el comportamiento de las características bioactivas de la mora (*Rubus glaucus*) y el agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) durante procesos de maduración y transformación.

## 1.1 Objetivos específicos

Evaluar las características bioactivas durante el proceso de maduración de mora (*Rubus glaucus*) y agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) y establecer una correlación con el perfil aromático, utilizando nariz electrónica.

Cuantificar la actividad antioxidante, el contenido de fenoles totales, antocianinas totales y vitamina C de mora y agraz y evaluar los cambios en frente a diferentes operaciones de transformación en procesos de despulpado, concentración y deshidratación.

Analizar el comportamiento de las propiedades bioactivas durante diferentes procesos para evaluar el efecto de las operaciones y las diferencias entre productos.



## **2. Influencia del procesamiento en el contenido de sustancias bioactivas presentes en alimentos vegetales**

# **INFLUENCIA DEL PROCESAMIENTO EN EL CONTENIDO DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS PRESENTES EN ALIMENTOS VEGETALES**

## **THE INFLUENCE OF THE PROCESSING ON BIOACTIVE COMPOUNDS IN VEGETABLES**

## **INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO NO CONTEÚDO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS PRESENTES EM ALIMENTOS VEGETAIS**

**LUISA JUANA BERNAL R.<sup>1</sup>, AMANDA CONSUELO DÍAZ-MORENO.<sup>2</sup>**

### **RESUMEN**

La importancia que tienen los compuestos bioactivos en las tendencias actuales de consumo marca una etapa en la investigación y desarrollo de alimentos, el consumidor desea conocer los efectos que tiene el procesamiento en estos compuestos para establecer los cambios en las características nutricionales y, por lo tanto, el efecto en su salud. Los compuestos bioactivos presentes especialmente en alimentos vegetales, son un amplio grupo de sustancias entre las que se destacan polifenoles, carotenoides y tocoferoles, y la vitamina C; el contenido inicial de estas sustancias está influenciado por la genética, condiciones ambientales y el manejo postcosecha, este trabajo tiene como objetivo describir la influencia de operaciones como escaldado, cocción, pasterización, refrigeración, deshidratación, entre otros, en diferentes alimentos sobre sus compuestos bioactivos más importantes.

### **ABSTRACT**

The importance of bioactive compounds in current consumption trends marks a stage in food research and development. Consumers want to know how the different stages in food production affect bioactive compounds in order to establish changes in nutritional properties and, therefore, the effect on their health. The bioactive compounds present in vegetal foods are a large group of substances such as polyphenols, carotenoids and tocopherols, and vitamin C. The initial content of bioactive compounds is influenced by genetics, environmental conditions and postharvest handling. The objective of this work was to describe the influence of operations such as blanching, cooking, pasteurizing, cooling, dehydration, among others, in different foods over their most important bioactive compounds.

---

<sup>1</sup>Ingeniera Química. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. [libernalr@unal.edu.co](mailto:libernalr@unal.edu.co) (Autor de Correspondencia).

<sup>2</sup> PhD. Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - ICTA Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. [amcdiazmo@unal.edu.co](mailto:amcdiazmo@unal.edu.co)



## RESUMO

A importância dos compostos bioativos sobre as atuais tendências de consumo, marca uma etapa na pesquisa e no desenvolvimento de alimentos, os consumidores desejam conhecer os efeitos do tratamento destes compostos sobre as mudanças nos nutrientes e, portanto, o efeito sobre a saúde. Os compostos bioativos em alimentos, especialmente vegetais, são um grande grupo de substâncias que contêm entre polifenóis, carotenóides, tocoferóis e vitamina C, o conteúdo inicial destas substâncias é influenciada pela genética, condições ambientais e de manuseio pós-colheita, este trabalho tem como objetivo descrever a influência das operações, tais como branqueamento, cozimento, pasteurização, resfriamento, desidratação e outros em diferentes alimentos sobre os mais importantes compostos bioativos.

**PALABRAS CLAVE:** Propiedades antioxidantes, Transformación de alimentos.

**KEYWORDS:** Antioxidant properties, Food processing.

**PALAVRAS-CHAVE:** Propriedades antioxidantes, Processamento de alimentos.

## INTRODUCCIÓN

Dentro de la alimentación humana los vegetales juegan un papel de gran importancia debido a que son fuente de micronutrientes como minerales, vitaminas y fibra; de macronutrientes como proteínas (1%), lípidos (1%), carbohidratos (0-80% del peso seco) y principalmente agua (entre 80 y el 90% del peso total) [1]. Adicional a este grupo de nutrientes se encuentran compuestos, con actividad biológica conocidos como sustancias bioactivas o fitoquímicos, que confieren ciertas propiedades sensoriales como aroma, color y sabor [2], se distinguen 4 familias de sustancias: compuestos fenólicos, terpenos, nitrogenados y azufrados, [3]. Recientes estudios han demostrado que estas sustancias contribuyen al funcionamiento del cuerpo humano [4] aunque su biodisponibilidad depende de la estructura química, del metabolismo y de las interacciones con las diferentes sustancias presentes en el alimento y que acompañan la digestión [5]. La composición de un alimento nunca es

constante, está sujeta a múltiples factores ambientales y genéticos que en la mayoría de los casos no pueden ser controlados; el manejo postcosecha es un factor determinante en la calidad nutricional por lo que resulta importante analizar el comportamiento de estos compuestos bioactivos frente a los procesos que tienen como objetivo la transformación y conservación del alimento.

## INFLUENCIA DEL PROCESAMIENTO

Las frutas y las hortalizas son productos que se consumen frescos y procesados, durante la transformación su composición nutricional puede verse alterada, así mismo las propiedades antioxidantes, el contenido de compuestos bioactivos, su actividad y biodisponibilidad [6]. Es difícil predecir los cambios que una sustancia sufre bajo las diferentes condiciones de proceso (por ejemplo: tratamientos térmicos, secado, etc.), y generalizar su comportamiento ya que depende en gran medida de la matriz, la intensidad del

tratamiento, la concentración de oxígeno, el tiempo y la presencia de luz [7].

Vitamina C: es un nutriente y actúa como agente reductor en los alimentos [8], esta vitamina es inestable en los procesos donde hay contacto con altas concentraciones de oxígeno, altas temperaturas o presencia de enzimas que la degradan. Su inestabilidad es confirmada por diferentes estudios realizados en una gran variedad de matrices, Somsu *et al.* [9] reportan pérdidas en vegetales tailandeses entre el 14 y el 95%. Y Chuah *et al.* en pimientos, fuente reconocida de vitamina, evaluaron el efecto de tres diferentes operaciones: microondas, salteado y cocción, tanto en la vitamina C como en el contenido de carotenoides, quercetina y luteína [10]. Las mayores pérdidas de vitamina C se presentan en la cocción y son directamente proporcionales al tiempo de exposición (se evaluaron 5 y 30min de cocción), en las otras dos operaciones (tiempo de exposición 5min) la reducción en el contenido de ácido ascórbico no fue estadísticamente significativa. Nuevas tecnologías de conservación, como las altas presiones, reducen de manera significativa las pérdidas [11].

Antocianinas: son los flavonoides más importantes, están encargados de actuar como pigmentos y dar coloraciones rojas-azules a las plantas, atraer insectos y protegerlas de diferentes patologías y depredadores [12-13]. Las mayores pérdidas se presentan por la oxidación de las moléculas pero su comportamiento está ligado a la naturaleza del alimento y las condiciones de proceso al que se someta. El tratamiento con ozono de jugo de mora [14], fresa [15] y uva [16] disminuye el contenido significativamente de antocianinas y vitamina C, esto causa un cambio en el color del producto y de la capacidad antioxidante. En el caso de la uva, la antocianina que presenta mayor estabilidad es la cya-3-glu en comparación con del-3-glu y mal-3-glu. El tratamiento

con UV-C en arándanos [17] modifica el contenido de sustancias fitoquímicas: incrementa los compuestos fenólicos y las antocianinas, lo que significa un aumento de la capacidad antioxidante del producto. Un método estudiado en uva Isabella para incrementar la vida media de los pigmentos es la adición de ácido tánico (1:1 p/v) [18], además se estableció que la luz, temperatura, pH y la presencia de nitrógeno también son factores que pueden afectar a las antocianinas.

Quercetina: es un flavonoide que se presenta como aglicona o unido a un azúcar, normalmente glucosa. Lombard *et al.* [19] y Gorinstein *et al.* [20] estudiaron los efectos de diferentes métodos de cocción de vegetales de bulbo como cebolla y ajo, en este flavonoide y encontraron, como en el resto de compuestos bioactivos, que la degradación depende del tiempo e intensidad del tratamiento. El contenido de quercetina disminuye cuando se expone el alimento a escaldado, horneado o salteado, una estimación de las pérdidas están entre el 18%, 1,3% y 12,6% respectivamente. Los procesos que implican contacto con agua o aceite disminuyen significativamente el contenido de compuestos bioactivos, ya sea por la solubilidad de las sustancias en el medio o la homogeneidad de las altas temperaturas que la operación requiere.

Estos estudios ratifican que las matrices juegan un papel importante en la estabilidad de los compuestos antioxidantes y que la generalización de los comportamientos no puede ser posible por la gran cantidad de variables que influyen en las respuestas a los procesos.

Carotenoides y Tocoferoles: estas sustancias son reconocidas como antioxidantes porque se encargan de llevar las reacciones iniciadas por los radicales libres a la etapa de terminación, las fuentes por excelencia son los cereales, frutas y vegetales como la zanahoria, el tomate y la naranja, entre otros. Durante el procesamiento de alimentos la estabilidad

de estas sustancias se relaciona directamente con la presencia de oxígeno en el medio, las variaciones de pH y la presencia de luz, en general se puede decir que son sustancias más estables que la vitamina C, por su carácter liposoluble [21].

En la elaboración de una pulpa de mango, Vázquez-Caicedo *et al.* analizaron el comportamiento del  $\beta$ -caroteno frente a temperaturas de pasterización entre 85 - 93 °C por diferentes tiempos de exposición (0 - 16 min) [21], se encontró que bajo estas condiciones se favorece la isomerización trans-cis del  $\beta$ -caroteno y que se afecta el color de la pulpa, incluso la biodisponibilidad de la provitamina A, sin embargo reportan, que bajo las condiciones de estudio, el 93% de  $\beta$ -caroteno puede ser retenido. Otro caso en el que se favorece la isomerización como consecuencia del tratamiento térmico es en la deshidratación de zanahorias a temperaturas entre 60 y 80°C, aunque este cambio no varía la capacidad antioxidante del producto medida por el método de TEAC [22].

En un estudio sobre la luteína y zeaxantina en dos variedades de maíz sometido a congelación y enlatado se encontró, para el producto fresco un contenido de luteína en la variedad *White Shoepeg* es de 5,5  $\mu\text{g}/100\text{g}$  y de zeaxantina 28,55  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , para la variedad *Golden Whole Kernel* 330  $\mu\text{g}$  de luteína/100g y 209  $\mu\text{g}$  de zeaxantina/100g [23]; valores que no varían en los productos enlatados y que se incrementan, como carotenoides totales, en el producto congelado. Estos datos permiten concluir que la genética del alimento es clave en la determinación de su composición y que se puede relacionar con características físicas como la evidente diferencia de color que se presenta entre las variedades. En el jugo de naranja de Valencia, cultivada en Brasil, el contenido de luteína y zeaxantina, frente a los carotenoides totales, corresponde al 23 y 20% respectivamente, estos valores

disminuyen una vez el jugo es pasterizado y concentrado aunque el análisis global de carotenoides luego de los procesos muestra que las variaciones no son estadísticamente significativas [24].

La vitamina E pertenece al grupo de los tocoferoles, es reconocida por ser uno de los antioxidantes naturales más efectivos, las fuentes más importantes de esta vitamina son los vegetales, cereales, frutos secos; Corsini, M. *et al.* [25] evaluaron el contenido de tocoferoles en aceite de palma, aceite de algodón y aceite de girasol luego de un proceso de fritura a 180°C, los resultados muestran que en los tres casos se presentan pérdidas y que estas se relacionan con el grado de saturación de los aceites.

La actividad antioxidante de carotenoides y tocoferoles se debe al alto grado de insaturación y las sustituciones con grupos hidroxilo presentes a lo largo de la cadena; cualquier cambio en la molécula afecta sus propiedades y su capacidad de capturar los radicales libres.

Licopeno: en comparación con el  $\beta$ -caroteno, el licopeno presenta estabilidad frente a tratamientos térmicos y es mayor su resistencia a la isomerización [26]. Ha sido ampliamente estudiado en tomate, fruto con alto índice de consumo que contiene una cantidad apreciable de licopeno donde actúa como antioxidante y pigmento, estudios puntuales muestran que el jugo pasterizado durante el almacenamiento no presenta variaciones significativas, esto está ligado al tipo de empaque en el que se conserva el producto, en general se sabe que el proceso de pasterización no degrada la sustancia y si tiene un efecto positivo en su biodisponibilidad [27]. Otro proceso estudiado es el secado por aspersion, Goula y Adamopolus [28] analizaron los efectos de las diferentes variables del proceso en la conservación del antioxidante, el rango de pérdidas que obtuvieron está entre el 8,07 y 20,93% y

establecieron que las condiciones en las que se presenta una mayor degradación son a temperatura y flujo del aire mayores, además de concluir que es importante el control del tamaño de partícula y el grado de agregación del producto.

Otra matriz estudiada, con el objetivo de comparar los resultados con los que se presenta el tomate, fue la zanahoria. Mayer-Miebach *et al.* [29] analizaron las consecuencias de homogenizar en presencia o ausencia de aceite de girasol y secar el vegetal a temperaturas entre 25 y 140°C; para el secado aplicaron dos métodos: microondas y convección, se encontró que, al igual que en el tomate, en los procesos de secado, el licopeno permanece estable y su estabilidad depende de la temperatura, pero en la homogenización se favorece la isomerización del compuesto y la posterior degradación cuando las temperaturas de secado son mayores a 70°C.

El análisis del comportamiento de diferentes grupos de fitoquímicos según pérdidas pueden ser minimizadas con el control de la concentración de oxígeno en el medio [31].

Procesos como la *fermentación y cocción* junto con algunas reacciones químicas inherentes al proceso, pueden ser culpables de la degradación de los compuestos fenólicos; durante la fermentación del cacao, por ejemplo, se disminuyen los sabores amargos y astringentes, características organolépticas relacionadas directamente con el contenido de polifenoles en el grano [5]. Las reacciones de Maillard, consecuencia del calentamiento de un producto vegetal, favorecen la formación de sustancias antioxidantes [32].

Las nuevas tecnologías aplicadas en la industria de alimentos tienen como objetivo principal la conservación de nutrientes, sin embargo pueden afectar el contenido de bioactivos, por ejemplo, el ultrasonido destruye las paredes celulares y expone

operaciones de transformación se resume en el Cuadro No 1.

## **Operaciones de transformación**

El escaldado, contrario a lo que se piensa, conserva muchas de las sustancias bioactivas [30] debido a la inactivación de enzimas; mientras que el almacenamiento por largos periodos de un producto fresco favorece la degradación (esto obedece a factores como: actividad acuosa  $a_w$ , pH, tiempo, temperatura, concentración de oxígeno, etc.) como consecuencia, bajo estas condiciones, se disminuye la capacidad antioxidante a una velocidad determinada por las propiedades del alimento.

La pasterización, proceso en el cual se logran temperaturas entre los 60-65°C por tiempos no muy prolongados, trae consigo una destrucción de compuestos fenólicos, carotenoides y vitamina C, aunque las

las sustancias a un medio rico en oxígeno, favorece la formación de radicales que disminuyen la capacidad antioxidante total del alimento; sin embargo los resultados siempre dependerán de la matriz y las condiciones de trabajo [33].

## **CONCLUSIÓN**

Las operaciones de transformación más comunes en la industria de alimentos: escaldado, pasterización, cocción y refrigeración, entre otros, tienen efectos sobre los compuestos bioactivos como vitamina C, polifenoles y terpenos; el estudio del comportamiento de estas sustancias en productos procesados permite conocer la calidad nutricional y funcional de los alimentos tema crítico por la tendencia actual de consumo.

**Cuadro 1. Comportamiento de compuestos bioactivos según operaciones de transformación**

OPERACIÓN	COMPUESTOS FENÓLICOS (CF)
<p>Tratamiento térmico T&gt;T ambiente (escaldado, cocción, pasterización, esterilización)</p>	<p>Las antocianinas (A) se degradan en innumerables sustancias menos coloridas con tonalidades naranjas o marrones [34], algunos autores reportan que estos flavonoides son estables bajo procesos como escaldado, aunque su comportamiento va a depender del producto que se analice [35]. Las A, en productos enlatados, pueden interactuar con las paredes metálicas (si no están recubiertas) y se favorece la decoloración. La estructura química determina la resistencia a la degradación, las moléculas aciladas son más estables que el análogo no acilado [34] así mismo factores como pH, temperatura, presencia de luz, oxígeno, iones metálicos enzimas y azúcares afecta la estabilidad en cualquier producto durante su respectivo proceso [36].</p> <p>La estabilidad de las A durante los procesos de calentamiento se relaciona con la intensidad y tiempo del tratamiento, se dice que la cinética de degradación de las A se comporta de manera logarítmica con un crecimiento proporcional al aumento de temperatura. Durante el proceso de cocción para la elaboración de una mermelada de frambuesa las pérdidas de A están en el rango entre el 10 y el 80% dependiendo del tiempo de calentamiento (10-15min) [36]. La degradación de A en el jugo de grosella negra debido al tratamiento térmico entre los 4-140°C sigue una cinética de primer orden [37].</p> <p>El escaldado con vapor de arándanos aumenta considerablemente la capacidad antioxidante debido a la inactivación de enzimas y a que se favorece la solubilidad de A [38]. En el caso de una pulpa de arándanos donde la fruta se escaldada a 95°C durante 3min y luego se pasteriza se presenta una disminución del 43% en el contenido de A [36].</p> <p>Un estudio realizado en diferentes frutas cultivadas en el Brasil en fresco y procesadas muestra que en jugos concentrados o mermeladas el contenido de flavonoides (kempferol, quercetina o miricetina) disminuye significativamente; pero este valor aumenta cuando la pulpa es congelada (previamente pasterizada). Esto quiere decir que los tratamientos de cocción son mucho más perjudiciales que una simple pasterización [39].</p> <p>En productos como cebollas, brócoli, tomates y espárragos el contenido de flavonoides disminuye por procesos de escaldado [12].</p> <p>El escaldado y la cocción, por ser ambientes acuosos y de altas temperaturas favorecen la pérdida de los CF, estas condiciones afectan en gran proporción a matrices como la col risada, el brócoli, la col de Bruselas, el coliflor, la calabaza, las arvejas y el puerro [40-41]. Aunque en productos como el brócoli y los frijoles verdes el contenido de CF se mantiene luego de la cocción [40].</p>
<p>Temperaturas de refrigeración o congelación</p>	<p>Este proceso es el que presenta una mayor conservación de los pigmentos, la estabilidad va a depender de condiciones como temperatura, pH, contenido inicial de A, ácidos orgánicos y azúcares. Cuando la congelación es rápida y el almacenamiento se realiza a bajas temperaturas se mantiene la integridad de los pigmentos.</p> <p>En los arándanos (cranberries) se presenta una pérdida del 20% del contenido de antocianinas cuando es almacenado a 7°C, pero si la temperatura es de 0°C no hay un cambio en el contenido de pigmentos [34].</p> <p>En un jugo de tomate conservado a 4°C durante 91 días no se ve un cambio significativo en el contenido de CF [5].</p>
<p>Disminución contenido de agua (e.g., deshidratación, evaporación, liofilización)</p>	<p>El proceso de secado al sol de peras disminuye el contenido de flavonoides en un 64% [5]</p> <p>En un estudio con chiles rojos donde se comparó la actividad antioxidante del producto inicial y luego de la deshidratación por el sol, horno y horno microondas, se llegó a la conclusión de que no hay pérdidas en las propiedades antioxidantes y que el factor que más influye es el tiempo de exposición [42].</p>
<p>Pelado y cortado</p>	<p>En las cebollas se ha encontrado que las pérdidas están entre el 21-54% del contenido inicial de flavonoides [12].</p>
<p>Radiación UV</p>	<p>El mango y fresas tratados por un tiempo prolongado con iluminación UV muestran un aumento en sus niveles de fenoles totales. En el mango el cambio se atribuye al aumento del contenido de flavonoides [5]. Un comportamiento similar se observa en arándanos, el contenido de ácido clorogénico, quercetina y resveratrol se incrementa, pero es un efecto que se debilita con el tiempo [17].</p>
<p>Impulsos eléctricos</p>	<p>Dado que algunos CF confieren color a los productos, el impacto de la aplicación de impulsos eléctricos sobre estos podría evaluarse por el análisis en el cambio de la pigmentación. En estudios realizados en bayas (cranberry y fresas) y en jugo de naranja donde se aplicaban impulsos eléctricos para la conservación del producto, no se encontraron cambios significativos en el contenido de antocianinas (en las bayas) ni CF en el jugo de naranja [43].</p>
<p>Altas presiones</p>	<p>El contenido de antocianinas y de fenoles totales en las pulpas de mora y fresa tratadas con</p>

	altas presiones el contenido no se ve significativamente alterado [11].
<b>OPERACIÓN</b>	<b>TERPENOS</b>
Tratamiento térmico T>T ambiente (escaldado, cocción, pasterización, esterilización)	<p>La vitamina A pierde su actividad por oxidación. Los carotenoides se convierten en epóxidos por el calentamiento pero en general son estables a los tratamientos térmicos [5].</p> <p>El <math>\beta</math>-caroteno presenta isomerización y en algunos casos la biodisponibilidad se incrementa por el daño de las paredes celulares [34].</p> <p>Algunos autores han encontrado que el proceso de pasterización mejora el contenido de carotenoides (licopeno, <math>\beta</math>-caroteno y fitoflueno).</p> <p>En zanahorias a menor temperatura y tiempos cortos de cocción favorecen la retención del <math>\alpha</math> y <math>\beta</math>- caroteno. El proceso de escaldado (15 min a 50, 70, 90 °C) no muestra pérdidas significativas de licopeno [5].</p> <p>En el pimentón y en los jalapeños el contenido de provitamina A se ve disminuido en un 25% después del escaldado [44].</p> <p>En el tomate los estudios demuestran que el licopeno es estable frente a los procesos que implican altas temperaturas y aún durante el almacenamiento; si el proceso deteriora las paredes celulares no se presenta estabilidad de la sustancia porque el efecto protector que estas ejercen desaparece; Aunque la biodisponibilidad si se ve favorecida [45].</p> <p>En vegetales como la col risada, el brócoli, la col de Bruselas y el coliflor el escaldado y la cocción disminuye el contenido de carotenoides [41].</p>
Temperaturas de refrigeración o congelación	<p>En un estudio realizado en naranja mínimamente procesada se encontró que el contenido de carotenoides, durante el almacenamiento a 4°C, presentaba un ligero aumento. De los carotenoides presentes en la naranja la luteína, <math>\beta</math>-criptoxantina y zeaxantina son los de mayor incidencia, el único aumento significativo fue el del <math>\beta</math>-caroteno [46].</p> <p>Pigmentos extraídos de la zanahoria, la patata y la cáscara de naranja fueron almacenados a 4°C, 25°C y 40°C y las menores pérdidas luego de 45 días de almacenamiento se presentaron en las muestras refrigeradas [47].</p> <p>En la espinaca el proceso de escaldado seguido del almacenamiento a una temperatura de congelación por 24h y luego un proceso de hervido no afecta el nivel de carotenoides del producto [48].</p>
Disminución contenido de agua (e.g., deshidratación, evaporación, liofilización)	<p>Si un producto debe someterse a evaporación es de esperarse que se presente una destrucción parcial de compuestos como los tocoferoles y carotenoides [44].</p> <p>Condiciones como la presencia de oxígeno, altas temperaturas y una baja actividad acuosa podrían causar la degradación del licopeno. Aunque los estudios demuestran que este compuesto en procesos de secado con aire (condición de alto estrés oxidativo) presenta una alta estabilidad pero se recomienda almacenar el producto bajo una atmósfera de gas inerte que evite el contacto con oxígeno y favorezca la estabilidad del compuesto [26,45].</p> <p>En hojas de espinaca deshidratadas con aire caliente a 65°C previamente tratadas con una solución de sal y bicarbonato presenta una pérdida del 12% de <math>\beta</math>-caroteno, pero no presenta cambios significativos en el contenido de luteína, violaxantina o zeaxantina.</p> <p>En mango la deshidratación induce a la isomerización de N-trans-<math>\beta</math>-caroteno a 13-cis-<math>\beta</math>-caroteno. En el pimentón estudios demostraron que al contenido de carotenoides rojos aumentaba en un 40% [5].</p> <p>En una variedad de cebolla roja de bulbo se estudió el efecto de la liofilización sobre la quercetina y antocianinas, se encontró que éste proceso aumentó el contenido en un 32% del flavonol y en un 25% en las antocianinas [49].</p>
Pelado y cortado	<p>Se presenta pérdida de carotenos debido a la oxidación, favorecida por el contacto con el aire [5].</p> <p>El <math>\beta</math>-caroteno del mango tajado y almacenado presenta una estabilidad durante 10 meses, luego de ese tiempo las pérdidas están alrededor del 50% [5].</p>
Radiación UV	En el mango el $\beta$ -caroteno se ve afectado de la misma forma que el ácido ascórbico [5].
Impulsos eléctricos	<p>Los impulso eléctricos, en un jugo de sandía, aumentaron el contenido de licopeno, la proporción depende de las condiciones del tratamiento (este mismo comportamiento fue visto en el jugo de tomate) este aumento se refleja en el aumento de la capacidad antioxidante del producto [50].</p> <p>Durante la aplicación de impulsos eléctricos en un jugo de naranja y zanahoria el contenido de carotenoides aumento con el incremento del tiempo de tratamiento, pero no se vieron cambios significativos en un jugo de naranja ni en el contenido de licopeno de un jugo de tomate [43].</p>
<b>OPERACIÓN</b>	<b>VITAMINA C</b>
Tratamiento térmico T>T ambiente	Se presenta pérdida de ésta vitamina debido a procesos oxidativos o degradativos favorecidos por las condiciones de procesamiento como las altas temperaturas y la presencia de oxígeno [44-45].

(escaldado, cocción, pasterización, esterilización)	En el pimentón y en los jalapeños el contenido de vitamina C se ve disminuido en un 75% después del escaldado [44]. En el tomate se sabe que las altas temperaturas que se utilizan para la elaboración del jugo y la exposición al oxígeno durante el calentamiento son los factores determinantes en la pérdida de la vitamina C, la retención se favorece (95%) cuando se realiza un precalentamiento a 57°C durante 15s [45]. En vegetales como la col risada, el brócoli, la col de Bruselas y el coliflor bajo procesos de escaldado y cocción pierden su contenido de vitamina C [41].
Temperaturas de refrigeración o congelación	En naranja mínimamente procesada y almacenada a 4°C luego de 12 días disminuye su contenido de vitamina C aproximadamente 23% [46]. En col silvestre, clementinas y papas, almacenadas inicialmente bajo condiciones comerciales y luego de molidas congeladas a -60°C se encontró que el contenido de vitamina C durante un periodo de 49 semanas disminuyó para la col y las papas pero permaneció constante para la clementina; la variación ya era significativa a las 12 semanas [51].
Disminución contenido de agua (e.g., deshidratación, evaporación, liofilización)	Durante el proceso de pelado químico del tomate se presenta una pérdida del 16% del contenido de vitamina C, este valor luego es reducido un 35% debido a la deshidratación osmótica [52].
Radiación UV	En mango fresco y cortado el contenido de ácido ascórbico disminuye significativamente luego del tratamiento prolongado con UV. Se presenta oxidación de la molécula [5].
Impulsos eléctricos	Un jugo de sandía tratado con impulsos eléctricos a diferentes condiciones (tiempo, voltaje, etc.) muestra, en general, una disminución en el contenido de vitamina C que se relaciona con las condiciones a las que se somete [50].
Altas presiones	En pulpas de mora y fresa tratadas con altas presiones el contenido de vitamina C no se ve significativamente afectado [11].

## REFERENCIAS

- VICENTE, A., MANGANARIS, G. A., SOZZI, G., and CRISTOSO, C. En: Postharvest handling: a systems approach. Nutritional quality of fruits and vegetables. 2 ed. Burlintong (E.E.U.U.): Academic Press, 2009, p. 57-106.
- BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., and SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, 99 (1), 2006, p. 191-203.
- MARTÍNEZ-NAVARRETE, N., CAMACHO VIDAL, M. D. M., y MARTÍNEZ LAHUERTA, J. J. Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. Actividad Dietética, 12 (2), 2008, p. 64-68.
- LI, T. S. C. Vegetables and fruits: nutritional and therapeutic values. 1 ed. Boca Raton (E.E.U.U.): CRC Press is an

imprint of Taylor & Francis Group, 2008, 297 p.

- ALVAREZ-PARRILLA, E., ANDRES-LACUEVA, C., BOLAÑOS-VILLAR, A. V., et al. Fruit and vegetable phytochemicals, chemistry, nutritional value and stability. 1 ed. Singapore (India): Wiley Blackwell, 2010, 384 p.
- WOOTTON-BEARD, P. C., and RYAN, L. Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. Food Research International, 44 (10), 2011, p. 3135-3148.
- WEN, T. N., PRASAD, K. N., YANG, B., and ISMAIL, A. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of raw and blanched vegetables. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 11 (3), 2010, p. 464-469.
- LEONG, S. Y., and OEY, I. Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. Food Chemistry, 133 (4), 2012, p. 1577-1587.
- SOMSUB, W., KONGKACHUICHAI, R., SUNGPUAG, P., and CHAROENSIRI, R. Effects of three conventional cooking

methods on vitamin C, tannin, myo-inositol phosphates contents in selected Thai vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (2), 2008, p. 187-197.

10. CHUAH, A. M., LEE, Y.-C., YAMAGUCHI, T., TAKAMURA, H., YIN, L.-J., and MATOBA, T. Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chemistry*, 111 (1), 2008, p. 20-28.

11. PATRAS, A., BRUNTON, N. P., DA PIEVE, S., and BUTLER, F. Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10 (3), 2009, p. 308-313.

12. BROWN, J. E., CHEYNIER, V., CLIFFORD, M., et al. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*, Boca Raton (E.E.U.U.): CRC Press Taylor & Francis Group, 2006, 1212 p.

13. CHEMLER, J. A., DAVIES, K. M., FREITAS, V. D., DEROLES, S., et al. *Anthocyanins biosynthesis, functions, and applications*. 1 ed. New York (E.E.U.U.): Springer New York, 2009, 345 p.

14. TIWARI, B. K., O'DONNELL, C. P., MUTHUKUMARAPPAN, K., and CULLEN, P. J. Anthocyanin and colour degradation in ozone treated blackberry juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10 (1), 2009, p. 70-75.

15. TIWARI, B. K., O'DONNELL, C. P., PATRAS, A., BRUNTON, N., and CULLEN, P. J. Effect of ozone processing on anthocyanins and ascorbic acid degradation of strawberry juice. *Food Chemistry*, 113 (4), 2009, p. 1119-1126.

16. TIWARI, B. K., O'DONNELL, C. P., PATRAS, A., BRUNTON, N., and CULLEN, P. J. Anthocyanins and color degradation in ozonated grape juice. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (11), 2009, p. 2824-2829.

17. WANG, C. Y., CHEN, C.-T., and WANG, S. Y. Changes of flavonoid content and antioxidant capacity in blueberries after illumination with UV-C. *Food Chemistry*, 117 (3), 2009, p. 426-43.

18. BORDIGNON-LUIZ, M. T., GAUCHE, C., GRIS, E. F., and FALCÃO, L. D. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 40 (4), 2007, p. 594-599.

19. LOMBARD, K., PEFFLEY, E., GEOFFRIAU, E., THOMPSON, L., and HERRING, A. Quercetin in onion (*Allium cepa* L.) after heat-treatment simulating home preparation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18 (6), 2005, p. 571-581.

20. GORINSTEIN, S., JASTRZEBSKI, Z., LEONTOWICZ, H., LEONTOWICZ, M., NAMIESNIK, J., NAJMAN, K., PARK, Y.-S., HEO, B.-G., CHO, J.-Y., and BAE, J.-H. Comparative control of the bioactivity of some frequently consumed vegetables subjected to different processing conditions. *Food Control*, 20 (4), 2009, p. 407-413.

21. VÁSQUEZ-CAICEDO, A. L., SCHILLING, S., CARLE, R., and NEIDHART, S. Effects of thermal processing and fruit matrix on [beta]-carotene stability and enzyme inactivation during transformation of mangoes into purée and nectar. *Food Chemistry*, 102 (4), 2007, p. 1172-1186.

22. HIRANVARACHAT, B., SUVARNAKUTA, P., and DEVAHASTIN, S. Isomerisation kinetics and antioxidant activities of [beta]-carotene in carrots undergoing different drying techniques and conditions. *Food Chemistry*, 107 (4), 2008, p. 1538-1546.

23. SCOTT, C. E., and ELDRIDGE, A. L. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18 (6), 2005, p. 551-559.

24. GAMA, J. J. T., and DE SYLOS, C. M. Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. *Food Chemistry*, 100 (4), 2007, p. 1686-1690.

25. CORSINI, M. S., SILVA, M. G., and JORGE, N. Loss in tocopherols and oxidative stability during the frying of frozen



cassava chips. *Grasas y Aceites*, 60 (1), 2009, p. 77-81.

26. WILDMAN, R. E. C. *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. 2 ed. Boca Raton (E.E.U.U.): CRC Press, Taylor & Francis Group, 2007, 562 p.

27. SÁNCHEZ-MORENO, C., PLAZA, L., DE ANCOS, B., and CANO, M. P. Nutritional characterisation of commercial traditional pasteurised tomato juices: carotenoids, vitamin C and radical-scavenging capacity. *Food Chemistry*, 98 (4), 2006, p. 749-756.

28. GOULA, A. M., and ADAMOPOULOS, K. G. Stability of lycopene during spray drying of tomato pulp. *LWT - Food Science and Technology*, 38 (5), 2005, p. 479-487.

29. MAYER-MIEBACH, E., BEHSNILIAN, D., REGIER, M., and SCHUCHMANN, H. P. Thermal processing of carrots: Lycopene stability and isomerisation with regard to antioxidant potential. *Food Research International*, 38 (8-9), 2005, p. 1103-1108.

30. MAZZEO, T., N'DRI, D., CHIAVARO, E., VISCONTI, A., FOGLIANO, V., and PELLEGRINI, N. Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables. *Food Chemistry*, 128 (3), 2011, p. 627-633.

31. RAWSON, A., PATRAS, A., TIWARI, B. K., NOCI, F., KOUTCHMA, T., and BRUNTON, N. Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, 44 (7), 2011, p. 1875-1887.

32. MURCIA, A. M., JIMÉNEZ, A. M., and MARTÍNEZ-TOMÉ, M. Vegetables antioxidant losses during industrial processing and refrigerated storage. *Food Research International*, 42 (8), 2009, p. 1046-1052.

33. SORIA, A. C., and VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review.

*Trends in Food Science & Technology*, 21 (7), 2010, p. 323-331.

34. STRIK, B. C., TALCOTT, S. T., HOWARD, L. R., et al. *Berry fruit: value-added products for health promotion*. 1 ed. Boca Raton (E.E.U.U.): CRC Press, Taylor & Francis Group, 2007, 444 p.

35. AZEVEDO, J., FERNANDES, I., FARIA, A., OLIVEIRA, J., FERNANDES, A., FREITAS, V. D., and MATEUS, N. Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins. *Food Chemistry*, 119 (2), 2010, p. 518-523.

36. PATRAS, A., BRUNTON, N. P., O'DONNELL, C., and TIWARI, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21 (1), 2010, p. 3-11.

37. HARBOURNE, N., JACQUIER, J. C., MORGAN, D. J., and LYNG, J. G. Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods. *Food Chemistry*, 111 (1), 2008, p. 204-208.

38. GANCEL, A.-L., FENEUIL, A., ACOSTA, O., PÉREZ, A. M., and VAILLANT, F. Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Research International*, 44 (7), 2011, p. 2243-2251.

39. HOFFMANN-RIBANI, R., HUBER, L. S., and RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22 (4), 2009, p. 263-268.

40. TURKMEN, N., SARI, F., and VELIOGLU, Y. S. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, 93 (4), 2005, p. 713-718.

41. SIKORA, E., CIESLIK, E., LESZCZYNSKA, T., FILIPIAK-FLOKIEWICZ, A., and PISULEWSKI, P. M. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, 107 (1), 2008, p. 55-59.

42. ARSLAN, D., and ÖZCAN, M. M. Dehydration of red bell-pepper (*Capsicum annuum* L.): Change in drying behavior, colour and antioxidant content. *Food and Bioproducts Processing*, 89 (4), 2011, p. 504-513.
43. SOLIVA-FORTUNY, R., BALASA, A., KNORR, D., and MARTÍN-BELLOSO, O. Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20 (11-12), 2009, p. 544-556.
44. JOHNSON, I., WILLIAMSON, G., VIRGILI, F., SCACCINI, C., RIMBACH, G., PACKER, L., OFFORD, E., SOUTHON, S., FAULKS, R., LUND, E., BOYLE, C., WANG, H., PROVAN, G., HELLIWELL, K., MOZIER, K., BARLOW, T., JEFFERY, B., PAUL, S., BUDDINGTON, R., KIMURA, Y., LINDSAY, D., NAGATA, Y., MAKI, K., BRANCA, F., LORENZETTI, S., BRAMLEY, P., SALONEN, J., SCHMIDT, S., MURSA, J., NURMI, T., VANHARANTA, M., ANDERSEN, M. L., KRAGH-LAURIDSEN, R., SKIBSTED, L. H., POKORNÝ, J., and CHERUVANKY, R. *Phytochemical functional foods*. 1 ed. Cambridge, (England): Woodhead Publishing, 2003, 398 p.
45. JONGEN, W., SOUTHON, S., FAULKS, R., HEINONEN, I. M., MEYER, A. S., LEONI, C., AKED, J., GARY, C., TCHAMITCHIAN, M., CUBEDDU, R., PIFFERI, A., TORRICELLI, P. T. A., EARLY, R., LAMMERTYN, J., VERLINDEN, B. E., NICOLAÏ, B., RAMASWAMY, H. S., CHEN, C. R., CARLIN, F., OREA, J. M., UREÑA, A. G., GARRATT, L. C., POWER, J. B., DAVEY, M. R., LAURILA, E., AHVENAINEN, R., DAY, B. P. F., PARK, H. J., INDRAWATI, LUDIKHUYZE, L., LOEY, A. V., HENDRICKX, M., and SAUREL, R. *Fruit and vegetable processing, improving quality*. Cambridge (England): Woodhead Publishing Ltd and CRC Press, 2002, 408 p.
46. PLAZA, L., CRESPO, I., DE PASCUAL-TERESA, S., DE ANCOS, B., SÁNCHEZ-MORENO, C., MUÑOZ, M., and CANO, M. P. Impact of minimal processing on orange bioactive compounds during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 124 (2), 2011, p. 646-651.
47. ÇINAR, I. Carotenoid pigment loss of freeze-dried plant samples under different storage conditions. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37 (3), 2004, p. 363-367.
48. BUNEA, A., ANDJELKOVIC, M., SOCACIU, C., BOBIS, O., NEACSU, M., VERHÉ, R., and CAMP, J. V. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry*, 108 (2), 2008, p. 649-656.
49. PÉREZ-GREGORIO, M. R., REGUEIRO, J., GONZÁLEZ-BARREIRO, C., RIAL-OTERO, R., and SIMAL-GÁNDARA, J. Changes in antioxidant flavonoids during freeze-drying of red onions and subsequent storage. *Food Control*, 22 (7), 2011, p. 1108-1113.
50. OMS-OLIU, G., ODRIOZOLA-SERRANO, I., SOLIVA-FORTUNY, R., and MARTÍN-BELLOSO, O. Effects of high-intensity pulsed electric field processing conditions on lycopene, vitamin C and antioxidant capacity of watermelon juice. *Food Chemistry*, 115 (4), 2009, p. 1312-1319.
51. PHILLIPS, K. M., TARRAGÓ-TRANI, M. T., GEBHARDT, S. E., EXLER, J., PATTERSON, K. Y., HAYTOWITZ, D. B., PEHRSSON, P. R., and HOLDEN, J. M. Stability of vitamin C in frozen raw fruit and vegetable homogenates. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23 (3), 2010, p. 253-259.
52. MARFIL, P. H. M., SANTOS, E. M., and TELIS, V. R. N. Ascorbic acid degradation kinetics in tomatoes at different drying conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 41 (9), 2008, p. 1642-1647.



## 3. Materiales y Métodos

### 3.1 Muestras

La mora adquirida de un cultivo ubicado en la vereda El Triunfo, municipio de Icononzo departamento del Tolima, Colombia en agosto de 2011 para las pruebas de maduración y en noviembre de 2011 para el análisis de los efectos del procesamiento.

El agraz se recolectó de arbustos silvestres en la vereda Arrayanes del Municipio de Tinjacá, departamento de Boyacá, Colombia en el mes de diciembre de 2011.

Se seleccionaron tres estados de madurez, asociados al indicador subjetivo de color, que se denominaron:

*Verde*: donde el fruto ha desarrollado su tamaño y en su superficie predomina el color verde con pequeñas zonas amarillas y rosadas.

*Intermedio*: donde predomina el color rosado con pequeñas drupas amarillas en la superficie de la mora y en el agraz la superficie roja.

*Cosecha*: éste último corresponde al estado en que el agricultor recoge el producto para comercializarlo, la mora ha desarrollado el color rojo intenso y el agraz morado.

Los análisis se realizaron con un lote de producción que dividido fue procesado por duplicado.

### 3.2 Determinación del Perfil Aromático

La nariz electrónica es un equipo que simula las funciones de la nariz humana y da como resultado un perfil aromático o huella digital de la muestra [12]. Está formada por cuatro

---

elementos: un sistema de flujo de aire encargado de transportar los compuestos volátiles de la muestra, un grupo de sensores sensibles a familias de sustancias químicas e encargados de transformar las interacciones en señales eléctricas, un sistema de control que permite medir y almacenar la señal y un sistema de reconocimiento que permite identificar y clasificar los aromas [13]. Los sensores son una pieza fundamental del equipo, ya que son los que interactúan, química y físicamente con los compuestos volátiles, es importante que tengan una alta sensibilidad, similar a la de la nariz humana, hacia los compuestos químicos, una baja sensibilidad a la humedad y temperatura, que sean capaces de reproducir los resultados, de estabilizarse en las lecturas en un periodo corto [13]. A nivel industrial la aplicación de esta técnica de análisis está tomando fuerza, ya que es un método no destructivo, arroja resultados en tiempo real y, respecto a un panel sensorial humano, es más económico [14].

La aplicación de la nariz electrónica en el campo de los alimentos ha sido variada e importante, se ha estudiado la diferenciación de alimentos [15-17], la definición de huellas aromáticas [18], los procesos de maduración [19-20], los procesos fermentativos, entre otros. Para el análisis de resultados se utilizan herramientas estadísticas multivariadas, que permiten realizar el análisis sobre todos los datos sin discriminación por el número de variables, teniendo así una perspectiva global del comportamiento de la muestra. Para este tipo de análisis los datos son arreglados en una estructura de dos vías (matriz) donde cada fila corresponde a una muestra y cada columna a una variable, cuando estas matrices son analizadas por medio del análisis multivariado, todas las variables son consideradas y consecuentemente la información extraída representa una visión global del sistema.

Se utilizó una nariz electrónica Airsense Analytics GmbH PEN3 (Alemania), con 10 sensores de óxido metálico semiconductor (MOS). En el Tabla 1 se especifica la sensibilidad a grupos de sustancias químicas.

Tabla 3-1. Compuestos químicos a los que responde el arreglo de sensores de la Nariz Electrónica Airsense.

<b>SENSOR</b>	<b>COMPU</b>	<b>ESTOS QUÍMICOS DETECTADOS</b>
W1C	Compuestos	aromáticos
W5S		Amplio rango de compuestos
W3C		Compuestos aromáticos. Amoniaco
W6S	Principalmente	hidrógeno
W5C		Compuestos aromáticos, Alcanos.
W1S		Amplio rango, metano
W1W		Compuestos azufrados. Terpenos
W2S		Detecta alcoholes. Amplio rango
W2W		Compuestos aromáticos. Compuestos orgánicos
W3S	Metano	

### 3.3 Propiedades Antioxidantes

Las metodologías empleadas se describen detallada mente en los procedimientos estándares operativos adjuntos como anexos de éste documento.



## **4. Resultados**

### **4.1 Evaluación de las propiedades antioxidantes y el perfil aromático durante la maduración de mora (*Rubus glaucus Benth*) y agraz (*Vaccinium meridiana Swartz*)**



**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y EL PERFIL  
AROMÁTICO DURANTE LA MADURACIÓN DE MORA (*Rubus glaucus* Benth) Y  
AGRAZ (*Vaccinium meridionale* Swartz)**

**EVALUATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES AND THE AROMATIC PROFILE  
DURING MATURATION OF BLACKBERRY (*Rubus glaucus* Benth) AND BILBERRY  
(*Vaccinium meridionale* Swartz)**

Luisa Juana Bernal Roa<sup>1</sup>, Laura Angélica Melo Toro<sup>2</sup>, Amanda Consuelo Díaz Moreno<sup>3</sup>

---

**RESUMEN**

Los frutos como la mora (*Rubus glaucus* Benth) y el agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) son fuentes naturales de sustancias antioxidantes reconocidas por su papel preventivo en el desarrollo de enfermedades degenerativas. En este estudio se evaluó el perfil aromático por medio de nariz electrónica, las propiedades antioxidantes, el contenido de vitamina C, fenoles y antocianinas totales durante tres estados de maduración de mora y agraz. El diseño estadístico que se siguió fue completamente aleatorio y los resultados muestran que las frutas en el último estado de madurez evaluado se diferencian por su perfil aromático, un contenido mayor de antocianinas (en el agraz 1,59 mg cyn-3-glu g<sup>-1</sup> y en mora 0,26 mg cyn-3-glu g<sup>-1</sup>) y fenoles totales (en agraz 5,57 mg ácido caféico g<sup>-1</sup> y 2,68 mg ácido caféico g<sup>-1</sup> en mora). El comportamiento de las propiedades evaluadas es independiente en cada una de las frutas.

**PALABRAS CLAVES:** actividad antioxidante, nariz electrónica, Folin-Ciocalteu, FRAP, TEAC.

---

<sup>1</sup> Ingeniera Química, Estudiante Maestría Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. ljbernalr@unal.edu.co

<sup>2</sup> Estudiante Ingeniería Química. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos- ICTA, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. lamelot@unal.edu.co

<sup>3</sup> Profesor Asistente, Ph.D. MSc. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos- ICTA. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. amcdiazmo@unal.edu.co

## ABSTRACT

Blackberry (*Rubus glaucus* Benth) and bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) are natural sources of antioxidants, they are known for their preventive role in the degenerative diseases. This study evaluated the aromatic profile through electronic nose, the antioxidant properties, vitamin C, phenolics and anthocyanins during three stages of blackberry and bilberry ripening. The statistical design followed was completely random and the results shows differences in aromatic profile, a higher content of anthocyanins (1,59 mg of cyn-3-glu g<sup>-1</sup> in bilberry and 0.26 mg of cyn-3-glu g<sup>-1</sup> in blackberry) and total phenols (5,57 mg of caffeic acid g<sup>-1</sup> bilberry and 2.68 mg caffeic acid g<sup>-1</sup> blackberry). The behavior of the properties evaluated is independent in each fruit.

**KEY WORDS:** antioxidant activity, electronic nose, Folin-Ciocalteu, FRAP, TEAC.

## INTRODUCCIÓN

La mora (*Rubus glaucus* Benth) es una fruta compuesta por drupas que se caracteriza por su color rojo– azulado y su aroma, es fuente de vitaminas, minerales y fitoquímicos. En Colombia la especie más cultivada es la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), su cosecha es constante durante el año influenciada por la época de lluvias. Para el cultivo se prefieren las alturas comprendidas entre los 1.800 y 2.000 msnm, no está claro el carácter climatérico de este fruto y adicional es un producto de difícil manejo ya que es altamente perecedero y sensible a daños mecánicos (Perkins-Veazie et al., 2000).

El agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz), también conocido como mortiño o *bilderry*, es un arbusto pequeño que presenta dos cosechas en el año, su fruto es carnoso, de sabor ácido con numerosas semillas, se caracteriza por su color morado oscuro que alcanza una vez madura, las zonas en las que se encuentra comprende los 2.200 y 3.400 msnm, en los departamentos de Boyacá y Antioquia se centra la producción nacional (Ligarreto, 2011). Pertenece al mismo

género de los arándanos, frutos climatéricos que deben ser cosechados en el estado de madurez sensorial donde se asegura las características de aroma y sabor deseables para el consumidor (Mitcham et al., 1998).

Estos frutos rojos son fuente natural de antioxidantes, el grupo predominante son los ácidos fenólicos (caféico, cumárico, clorogénico y ferúlico) y los flavonoides: quercitina, elagitaninos y las antocianinas responsables de su color (Pietta et al., 2003; Castrejón et al., 2008) las sustancias cumplen la función de retrasar las reacciones de oxidación, principales reacciones de deterioro, gracias a la deslocalización de los anillos aromáticos que las conforman (Balasundram et al., 2006), además en recientes estudios se ha demostrado la importancia en la prevención de enfermedades degenerativas como el Alzheimer y Parkinson (Wang y Stoner, 2008). Es un hecho que el contenido de compuestos fenólicos en bayas es afectado por diferencias genéticas, condiciones pre y postcosecha, y además el grado de madurez.

### **Nariz electrónica**

En las frutas el control de la maduración es clave a la hora de establecer el punto de cosecha, condiciones de almacenamiento y la evolución de sus características sensoriales. Durante este proceso los cambios bioquímicos que sufre el fruto dan paso a la generación de volátiles, cambios de color, textura y sabor. Un método no destructivo que proporciona resultados en tiempo real es la nariz electrónica, instrumento que emula el proceso olfativo humano, constituido por un sistema sensible a los volátiles y otro encargado de convertirlo en señales eléctricas. Las aplicaciones en el área hortofrutícola han sido diversas: duraznos (Benedetti et al., 2008), peras (Brezmes et al., 2000), manzanas (Pathange et al., 2006) han sido analizados y distinguidos en las diferentes etapas de maduración, operaciones postcosecha (Torri et al., 2010) y fermentaciones (Bhattacharyya et al., 2007). En frutas como las bayas es reducida la información que se

encuentra (Peris y Escuder-Gilabert, 2009) sin embargo fue empleada por Li et al., (2010) en arándanos para la detección de enfermedades.

Para satisfacer la tendencia de consumo de productos naturales que ofrezcan beneficios adicionales a los de la nutrición, es importante establecer, de manera objetiva, el comportamiento y composición de los diferentes alimentos; debido al creciente interés en Colombia en frutas como la mora y el agraz, y con el objetivo de profundizar en el conocimiento de éstas como fuentes alimenticias de carácter funcional, este trabajo evalúa el comportamiento del perfil aromático y las propiedades antioxidantes durante tres estados de maduración.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestras**

La mora fue adquirida en un cultivo ubicado en la vereda El Triunfo, Icononzo- Tolima. El agraz fue recolectado de arbustos silvestres en la vereda Arrayanes, Tinjacá - Boyacá. Se seleccionaron tres estados de madurez asociados al indicador subjetivo de color que se denominaron Verde (V), donde el fruto ha desarrollado su tamaño y en su superficie lidera el color verde con pequeñas zonas amarillas y rosadas; Intermedio (I), donde lidera el color rosado con pequeñas drupas amarillas en la superficie de la mora y en el agraz la superficie roja y Cosecha (C), éste último corresponde al estado en que el agricultor recoge el producto para comercializarlo, la mora ha desarrollado el color rojo intenso y el agraz morado.

Para cada análisis fisicoquímico se tomo una parte representativa de la muestra con la que se procedió a realizar el correspondiente procedimiento.

### **Análisis físico y químico**

Para los análisis de caracterización de frutas se emplearon métodos oficiales:

Humedad: 10g de muestra se secaron a 105°C (Estufa ThermoHeraus Instruments Function Line, Alemania) durante 4 horas. A.O.A.C. Método Oficial 934.06; A.O.A.C. Método Oficial 934.01. Esta medición se realizó por triplicado.

Sólidos Solubles: Se determinó el contenido de °Brix con un refractómetro según Norma Técnica Colombiana NTC 4624. La determinación se realizó por triplicado.

pH y Acidez: titulación potenciométrica (SCHOTT Handy labpH11) según método Norma Técnica Colombiana NTC 440 y A.O.A.C. Método Oficial 942.15.

### **Determinación perfil aromático**

Se utilizó una nariz electrónica Airsense Analytics GmbH PEN3 (Alemania), con 10 sensores de óxido metálico semiconductor-MOS (Tabla 1).

Se pesaron 25g de muestra que se dejaron estabilizar en una cámara hermética a temperatura ambiente (aproximadamente 15°C) durante 5 min, el tiempo de lectura fue de 150s con un flujo de cámara de 70ml min<sup>-1</sup> y un flujo de inyección de 60ml min<sup>-1</sup>.

Las lecturas de las muestras se realizaron aleatoriamente dejando un tiempo de 450s de limpieza de sensores entre análisis para evitar efectos indeseables en las respuestas causadas por arrastre (Zuluaga et al., 2011).

**Tabla 1. Compuestos químicos a los que responde el arreglo de sensores de la Nariz**

**Electrónica Airsense.**

<b>SENSOR</b>	<b>COMPUESTOS QUÍMICOS DETECTADOS</b>
<b>W1C</b>	Compuestos aromáticos
<b>W5S</b>	Amplio rango de compuestos
<b>W3C</b>	Compuestos aromáticos. Amoniaco
<b>W6S</b>	Principalmente hidrógeno
<b>W5C</b>	Compuestos aromáticos, Alcanos.
<b>W1S</b>	Amplio rango, metano
<b>W1W</b>	Compuestos azufrados. Terpenos
<b>W2S</b>	Detecta alcoholes. Amplio rango
<b>W2W</b>	Compuestos aromáticos. Compuestos orgánicos
<b>W3S</b>	Metano

## **Vitamina C**

La extracción se realizó con agua destilada, antes de la inyección se purificó la solución con un cartucho de limpieza C<sub>18</sub>. Para la detección y cuantificación se empleó cromatografía HPLC (Jasco Bomba PU980, Detector UV/VIS975), una columna de intercambio iónico Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H+ 8% a un flujo de 0.5ml/min con fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4mM a temperatura ambiente. La longitud de onda empleada fue 254nm. Los datos se reportan como  $\mu\text{mol}$  de vitamina C g<sup>-1</sup> fruta fresca (Shui y Leong, 2002; Castañeda et al., 2009). Se pesaron 20g de fruta y se homogenizaron (ultraturrax IKA T18 Basic, Alemania), se agregó 20ml de solución de extracción, se agitó en vortex y luego en plancha de agitación magnética. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos (Tecnovetro 4235, Italia), este procedimiento se repitió dos veces con el sólido y los extractos se llevaron a un volumen de 100ml con solución de extracción. Cada muestra se realizó por triplicado y fue almacenada a -18°C hasta el análisis.

## **Contenido total de antocianinas**

El método empleado fue el pH diferencial A.O.A.C. Método Oficial 2005.02 los resultados se reportan como mg de cianidina-3-glucósido (cyn-3-glu) g<sup>-1</sup> fruta fresca.

## **Contenido de fenoles totales**

Para la determinación del contenido de fenoles totales se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu (Panreac, España), método empleado por Vasco et al. (2008) y Oliveira et al. (2011). La longitud de onda a la que se realizó la lectura fue 765nm y la cuantificación se hizo con referencia a una curva de calibración de ácido caféico, Sigma Aldrich, ( $R^2=0,995$ ) los datos se reportan como mg de ácido caféico g<sup>-1</sup> fruta fresca.

## **Capacidad antioxidante**

En TEAC la decoloración del radical fue leída a 734nm luego de 6min de reacción. Cada extracto fue leído por triplicado y los resultados se reportan como  $\mu\text{mol}$  de trolox g<sup>-1</sup> fruta fresca con

respecto a una curva de calibración de Trolox 97%, Sigma Aldrich, ( $R^2=0,989$ ). (Murcia *et al.*, 2009)

Para FRAP 330 $\mu$ l de extracto fueron mezclados con 10ml de una solución elaborada a partir de buffer de acetato pH 3,6 (300nM), TPTZ diluido en HCl (40 mM) y FeCl<sub>3</sub> (20 mM) en relación 10:1:1 respectivamente. La reacción se llevó a cabo por una hora y la lectura se realizó a 593nm. Cada extracto fue leído por duplicado y los resultados se reportan según curva de calibración de trolox ( $R^2=0,996$ ) en mmol trolox g<sup>-1</sup> fruta fresca (Gorinstein *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2010).

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante Análisis de Varianza ANOVA de una vía, en conjunción con una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, empleando un alfa de 0,05. Por otra parte, como técnica multivariada se realizó análisis de componentes principales- PCA para la exploración de los datos obtenidos con la nariz electrónica. Los diferentes análisis estadísticos fueron llevados a cabo en el software MATLAB v. 7.9 (Mathworks, USA).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La mora de castilla es un fruto no climatérico su madurez está determinada por cambios en el color, tamaño, porcentaje de acidez y contenido de sólidos solubles según NTC 4106. Para esta fruta se diferencian siete estados de maduración, las muestras evaluadas según comparación de °Brix con los valores estándar se encuentran en una etapa cero que corresponde al estado verde; tres, estado intermedio y cinco, estado de cosecha. Se puede observar (Tabla 2) que a medida que el fruto madura, aumenta la humedad y disminuye el porcentaje de acidez. Los cambios de pH no se hacen notorios en estos estados.



**Tabla 2. Comportamiento fisicoquímico de la mora durante la maduración**

<b>Mora</b>	<b>%Humedad</b>		<b>pH</b>		<b>% Ácido málico</b>		<b>°Brix</b>	
V	81,96±1,69	a*	2,88±2,83e-2	a	2,53±4,19e-1	ab	5,49±8,13e-2	a
I	87,30±3,40e-1	ab	2,76±9,90e-2	a	3,09±5,53e-2	a	6,60±1,07e-2	b
C	88,34±1,89	b	2,92±1,48e-1	a	1,86±6,04e-2	b	7,36±1,17e-2	c

Media ± DE; DE = Desviación estándar. Promedios con letras diferentes en una misma columna

presentan diferencias significativas. \*Nivel de significancia  $p < 0,05$

En el agraz, además de los cambios evidentes de color, parámetros como el pH y la concentración de sólidos solubles también fueron indicadores de la maduración del fruto (Tabla 3). El estudio del agraz está tomando fuerza dado su carácter silvestre, Rodríguez et al. (2007). reportan para el estado de cosecha un valor de acidez aproximado de 1,44%, el comportamiento de esta fruta es similar al del arándano ya que pertenecen al mismo género (Castrejón et al., 2008).

### **Perfil Aromático**

La liberación de compuestos aromáticos, junto con la pérdida del color verde y del sabor ácido, es uno de los cambios presentes durante la maduración de cualquier fruta.

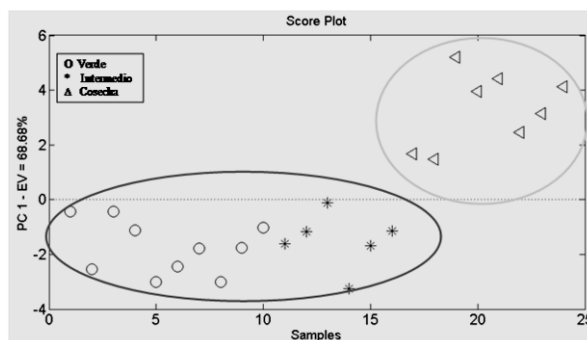
El análisis de componentes principales para la mora (Figura 1 y 2) muestra que el estado de madurez verde e intermedio se distingue del estado de cosecha por la respuesta de un grupo de sensores sensibles a la presencia de grupos funcionales aromáticos de baja polaridad, W1C, W5S, W3C y W5C (Tabla 1). En el estado cinco de maduración se puede considerar la presencia de terpenos, alcoholes, metanol y compuestos aromáticos dado el grupo de sensores que muestran respuesta: W6S, W1S, W2S, W3S, W1W y W2W. Los resultados siguen lo encontrado en un estudio realizado con los volátiles de la mora en estado de consumo donde se reporta la presencia de ácido benzoico, 2-heptanol, terpen-4-ol, etil y metil benzoato (Meret et al., 2011) además en el género *Rubus* sp. durante la maduración se favorece la producción de alcoholes, aldehídos, esterres y cetonas (Perkins-Vezzie et al., 2000). El agraz (Figura 3 y 4) expone el mismo comportamiento de la mora, la fruta en estado de cosecha puede ser diferenciada de los otros dos estados por los sensores que responden a sus volátiles con grupos funcionales aromáticos, alcoholes y terpenos; estudios en el género *Vaccinium* sp. reportan la presencia de 1-hexanol, 2-hexen-1-ol, 2-hexenal, 2-butil-1-octanol, hexadecanol, entre otros (Diban, 2008).

**Tabla 3 Comportamiento fisicoquímico del agraz durante la maduración.**

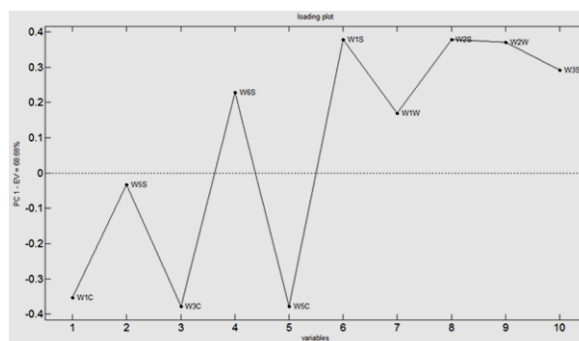
Agraz	%Humedad		pH		% Acidez(ácido cítrico)		°Brix	
V <sup>†</sup>	84,13±3.27e-1	a*	2,99±0,0	a	1,84±2,71e-4	a	7,2±7,07e-2	a
I <sup>§</sup>	83,73±6.35e-1	a	2,96±7,07e-3	b	1,85±1,33e-2	a	9,6±7,07e-2	b
C <sup>¶</sup>	83,34±6.53e-1	a	3,05±7,07e-3	c	1,72±1,10e-1	a	9,9±1,41e-1	b

Media ± DE; DE = Desviación estándar. Promedios con letras diferentes en una misma columna

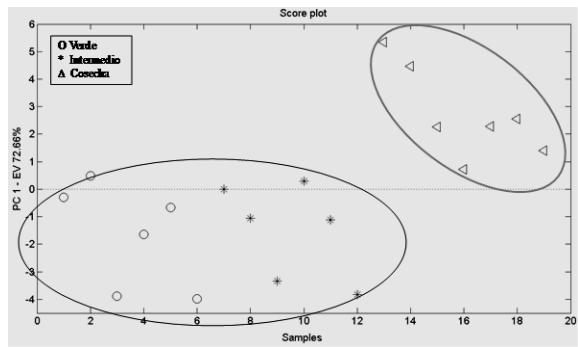
presentan diferencias significativas. <sup>†</sup>V: verde, <sup>§</sup>I: intermedio, <sup>¶</sup>C: cosecha. \*Nivel de significancia  $p < 0,05$



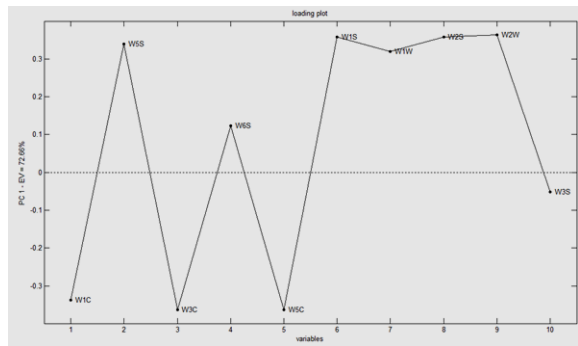
**Figura 1** Gráfico de puntaje (Score Plot) de las muestras de mora, el PCA calculado explica el 68.68% de la varianza.



**Figura 2** Gráfico de pesos (Loading Plot) de las muestras de mora, cada variable es un sensor de la nariz electrónica.



**Figura 3** Gráfico de puntaje (Score Plot) de las muestras de agraz, el PCA calculado explica el 72,66% de la varianza.



**Figura 4** Gráfico de pesos (Loading Plot) de las muestras de agraz, cada variable es un sensor de la nariz electrónica.

En los gráficos de puntaje, que explican en cada caso más del 50% de la varianza de los grupos, junto con los gráficos de pesos se muestra que hay diferencia entre perfiles aromáticos de mora y agraz por el grupo de sensores que responde durante la maduración.

### **Contenido de Vitamina C**

La vitamina C tiene actividad biológica como antioxidante debido al doble enlace y las sustituciones de dos grupos hidroxilo que tiene dentro de su estructura química, se sintetiza en las plantas como respuesta a condiciones de estrés y adicional su concentración está determinada por factores genéticos. (Asard et al., 2004)

Las muestras evaluadas contienen entre 13,46 y 22,48  $\mu\text{g}$  de vitamina C  $\text{g}^{-1}$  de mora y 23,09 y 25,06  $\mu\text{g}$  de vitamina C  $\text{g}^{-1}$  de agraz (Tabla 4); en ninguno de los casos se presentan diferencias significativas, sin embargo el valor p de la mora por estar tan próximo al valor alfa ( $p=0,057$ ) sugiere que en uno de los estados de madurez el contenido es diferente, según las medias el valor corresponde al primer estado de maduración donde se presenta alta variabilidad; contrario a lo esperado, que el contenido de vitamina C aumenta para la muestra de mora evaluada del estado cero al estado tres, esto podría explicarse por el comportamiento no climatérico y la variabilidad en las prácticas agrícolas y condiciones ambientales.

**Tabla 4 Propiedades antioxidante de mora y agraz durante la maduración.**

	<b>Vitamina C</b>	<b>Antocianinas</b>	<b>Fenoles Totales</b>	<b>TEAC <math>\mu</math>mol</b>	<b>FRAP mmol</b>
	<b><math>\mu</math>g g<sup>-1</sup></b>	<b>Totales mg g<sup>-1</sup></b>	<b>mg g<sup>-1</sup></b>	<b>Trolox g<sup>-1</sup></b>	<b>Trolox g<sup>-1</sup></b>
<b>Mora</b>					
V <sup>†</sup>	13,46±2,07a*	1,89e-2±9,03e-3a	3,33±7,30e-2a	33,29±5,56a	42,37±1,42a
I <sup>§</sup>	21,99±7,61e-1a	5,67e-2±2,69e-2a	2,92±2,79e-1b	32,43±7,24a	37,11±5,55b
C <sup>¶</sup>	22,48±3,60a	2,57e-1±4,35e-2b	2,68±2,48e-1b	30,22±9,42a	17,30±0,71c
<b>Agraz</b>					
V <sup>†</sup>	24,97±7,99e-1a	3,49e-2±7,72e-3a	4,69±7,57e-2a	30,71±2,96a	39,70±5,00a
I <sup>§</sup>	25,06±3,20a	3,21e-1±2,27e-2b	4,74±1,01e-1a	34,81±1,24b	39,52±1,28a
C <sup>¶</sup>	23,09±2,53e-1a	1,59±9,34e-2c	5,57±2,67e-1b	44,40±3,33c	54,45±3,56b

Media  $\pm$  DE; DE = Desviación estándar. Promedios con letras diferentes en una misma columna presentan diferencias significativas. V: verde, <sup>§</sup>I: intermedio, <sup>¶</sup>C: cosecha. \*Nivel de significancia

p<0,05

Se ha reportado en el género *Vaccinium sp.* acumulación durante la maduración de vitamina C y compuestos fenólicos (Cocetta et al., 2012), comportamiento que corresponde a lo encontrado en el agraz. Rodríguez et al. (2007). reportan un contenido de vitamina C más alto, alrededor de 80  $\mu\text{g}$  de vitamina C  $\text{g}^{-1}$  fruta fresca, en el agraz en estado de cosecha. En la tabla de composición de la USDA, (2010) se aprecian valores para la mora (*blackberry*) y el arándano (*blueberry*) de 209,72 y 97,24  $\mu\text{g}$  de vitamina C  $\text{g}^{-1}$  fruta fresca respectivamente, mayores en comparación con los encontrados para las frutas en cosecha evaluadas. Es importante considerar las condiciones ecofisiológicas de los frutos que determinan la composición y afectan algunos patrones de comportamiento.

### **Contenido de Antocianinas**

La mora y el agraz son por excelencia fuente de antocianinas, los flavonoides más importantes encargados de atraer insectos en las plantas y protegerlas de diferentes patologías y depredadores (Brown et al., 2006; Chemler et al., 2009) en general su estructura está ligada a un azúcar e incluso pueden estar copolimerizadas esto afecta su disponibilidad y cuantificación (A.O.A.C., 2005). Diferentes fuentes que han identificado las antocianinas presentes en la mora y los arándanos y reportan como antocianina predominante la cyn-3-glu (Dai et al., 2009; Garzón et al., 2010)

Durante la maduración el contenido de antocianinas aumenta y para la síntesis la célula emplea ácido siquímico y ácido malónico (Chemler et al., 2009) en el caso de la mora no se presenta diferencias significativas entre el estado verde e intermedio y se observa un aumento de casi 14 veces en el estado de cosecha, respecto al valor inicial. Chen, Q. et al., (2012) reportan contenidos muy bajos de antocianinas en las primeras etapas de maduración, 0,106 mg cyn-3-glu  $\text{g}^{-1}$ fruta fresca y el valor máximo, 1,46 mg cyn-3-glu  $\text{g}^{-1}$ fruta fresca, lo encuentran en el punto más alto de maduración estudiado. El agraz muestra en los tres estados un contenido

significativamente diferente y respecto al estado verde, el estado de cosecha presenta 45 veces más antocianinas.

Los contenidos de antocianinas encontrados en mora y agraz permiten comparar el estado de cosecha de la mora con el estado intermedio del agraz y concluir que entre las frutas maduras el agraz es una fuente importante de estas sustancias bioactivas.

### **Contenido de Fenoles Totales**

La concentración de compuestos fenólicos incluso de nutrientes, vitaminas, minerales, entre otros, responde a múltiples factores ambientales y genéticos, la composición de un alimento nunca es constante y por esto no es extraño encontrar diferencias entre frutas e incluso en un mismo cultivo, por ejemplo, se ha encontrado que las hojas y frutos que están en contacto directo con la radiación solar presentan un mayor contenido de compuestos fenólicos, vitamina C y carotenoides, que los que se encuentran bajo la sombra (Brown et al., 2006; Vicente et al., 2009). El contenido de fenoles totales en el caso del agraz, en cualquier estado de maduración, es mayor que el de la mora, además, mientras en el agraz aumentan los polifenoles en la mora disminuyen. La diversidad de compuestos presentes en cada fruta sumado a que el método de Folin-Ciocalteu puede responder a sustancias no necesariamente polifenólicas como aminas aromáticas e incluso el ácido ascórbico (Magalhães et al., 2008), también puede influenciar el resultado final.

### **Capacidad Antioxidante**

El poder antioxidante de una fruta puede ser medido por diferentes métodos *in vitro*, que permiten hacerse una idea de la capacidad que tiene la muestra para secuestrar radicales libres (Niki, 2010). Los métodos no competitivos que emplean  $ABTS^{\bullet+}$  y el complejo  $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{+2}$ , introducen un radical en la muestra y cuantifican en qué cantidad fue inhibido por acción de las sustancias allí presentes. Según datos de la Tabla 4 bajo los dos métodos analíticos empleados el agraz presenta el mismo comportamiento, el estado de cosecha tiene una



capacidad antioxidante mayor que el estado verde. La mora no evidencia cambios significativos de la capacidad antioxidante evaluada por TEAC, mientras que por FRAP el estado de cosecha presenta una capacidad menor valor que en el estado verde. En general el agraz en el estado de cosecha tiene mejores propiedades antioxidantes que la mora.

### **CONCLUSIONES**

El contenido de sólidos solubles, el perfil aromático y el contenido de antocianinas permiten diferenciar los estados de madurez de mora y agraz. Las propiedades antioxidantes durante la maduración de cada fruta son independientes, mientras que en la mora se presenta una disminución en el agraz se evidencia un incremento y en general mejores características que hacen de este fruto un alimento atractivo.

### **AGRADECIMIENTOS**

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos- ICTA de la Universidad Nacional de Colombia ya la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria- CORPOICA.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Asard, H., J. M. May y N. Smirnoff. 2004. Vitamin C, function and biochemistry in animals and plants, Londres, Reino Unido. Garland Science/BIOS Scientific Publishers. 374p.

Association of Analytical Communities A.O.A.C. 2005. A.O.A.C. Official method 2005.02 Total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines.

Balasundram, N., K. Sundram y S. Samman. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry 99(1): 191-203.

Benedetti, S., S. Buratti, A. Spinardi, S. Mannino y I. Mignani. 2008. Electronic nose as a non-destructive tool to characterise peach cultivars and to monitor their ripening stage during shelf-life. *Postharvest Biology and Technology* 47(2): 181-188.

Bhattacharyya, N., S. Seth, B. Tudu, P. Tamuly, A. Jana, D. Ghosh, R. Bandyopadhyay, M. Bhuyan y S. Sabhapandit. 2007. Detection of optimum fermentation time for black tea manufacturing using electronic nose. *Sensors and Actuators B: Chemical* 122(2): 627-634.

Brezmes, J., E. Llobet, X. Vilanova, G. Saiz y X. Correig. 2000. Fruit ripeness monitoring using an electronic nose. *Sensors and Actuators B: Chemical* 69(3): 223-229.

Brown, J. E., V. Cheynier, M. Clifford, O. Dangles, K. M. Davies, C. Dufour, G. G. Duthie, D. Ferreira, T. Fossen, K. S. Gould, R. J. Grayer, K. Hostettmann, M. Jay, M. Jordheim, J. A. M. Kyle, C. Lister, J. P. J. Marais, A. Marston, K. E. Schwinn, D. Slade, K. M. Valant-Vetschera, N. C. Veitch, C. A. Williams, H. Wiseman y E. Wollenweber. 2006. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton, E.E.U.U. Taylor & Francis Group, 1212p.

Castañeda-Ovando, A., M. D. L. Pacheco-Hernández, M. E. Páez-Hernández, J. A. Rodríguez y C. A. Galán-Vidal. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113(4): 859-871.

Castrejón, A. D. R., I. Eichholz, S. Rohn, L. W. Kroh y S. Huyskens-Keil. 2008. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry* 109(3): 564-572.

Chemler, J A, K. M. Davies, V. de Freitas , S. Deroles, K. S. Gould, J. H. Hatier, M. A. G. Koffas, E. Leonard, S. Lev-Yadun, M. A. Lila, N. Mateus, T. Nakayama, S. Rasmussen, K. Saito, W. J. Steyn, M. Yamazaki y K. Yonekura-Sakakibara. 2009. Anthocyanins biosynthesis, functions, and applications. New York, E.E.U.U. Winefield. Springer. 345p.

Chen, Q., H. Yu, H. Tang y X. Wang. 2012. Identification and expression analysis of genes involved in anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in the fruit of blackberry. *Scientia Horticulturae* 141(0): 61-68.

Cocetta, G., K. Karppinen, M. Suokas, A. Hohtola, H. Häggman, A. Spinardi, I. Mignani y L. Jaakola. 2012. Ascorbic acid metabolism during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit development. *Journal of Plant Physiology* 169(11): 1059-1065.

Dai, J., A. Gupte, L. Gates y R. J. Mumper. 2009. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* 47(4): 837-847.

Diban G., N. 2008. Separación de aromas en etapas del procesado de zumos de frutas y bebidas. Tesis de doctorado en Ingeniería Química y Química Inorgánica: Facultad de Ingeniería. Universidad de Cantabria. 34p.

Garzón, G. A., C. E. Narváez, K. M. Riedl y S. J. Schwartz. 2010. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. *Food Chemistry* 122(4): 980-986.

Gorinstein, S., Z. Jastrzebski, H. Leontowicz, M. Leontowicz, J. Namiesnik, K. Najman, Y. S. Park, B. G. Heo, J. Y. Cho y J. H. Bae. 2009. Comparative control of the bioactivity of some frequently consumed vegetables subjected to different processing conditions. *Food Control* 20(4): 407-413.

Li, C., G. W. Krewer, P. Ji, H. Scherm y S. J. Kays. 2010. Gas sensor array for blueberry fruit disease detection and classification. *Postharvest Biology and Technology* 55: 144-149.

Ligarreto, G. A. 2011. Agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz), algunas prácticas de cultivo y poscosecha. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 23p.

Magalhães, L. M., M. A. Segundo, S. Reis y J. L. F. Lima. 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* 613(1): 1-19.

Meret, M., P. Brat, C. Mertz, M. Lebrun y Z. Günata, 2011. Contribution to aroma potential of Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth). *Food Research International* 44(1): 54-60.

Mitcham, E., C. Crisosto y A. Kader. 1998. Bushberries: blackberry, blueberry, cranberry, raspberry: recommendations for maintaining postharvest quality. En: University of California, <http://postharvest.ucdavis.edu/PFfruits/Bushberries/>; consulta: mayo 2012.

Müller, L., S. Gnoyke, A. M. Popken y V. Böhm. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology* 43(6): 992-999.

Murcia, A. M., A. M. Jiménez y M. Martínez-Tomé. 2009. Vegetables antioxidant losses during industrial processing and refrigerated storage. *Food Research International*, 42(8): 1046-1052.

Niki, E. 2010. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* 49(4): 503-515.

Oliveira, I., P. Baptista, R. Malheiro, S. Casal, A. Bento y J. A. Pereira. 2011. Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Research International* 44(5): 1401-1407.

Pathange, L. P., P. Mallikarjunan, R. P. Marini, S. O'Keefe y D. Vaughan. 2006. Non-destructive evaluation of apple maturity using an electronic nose system. *Journal of Food Engineering* 77(4): 1018-1023.

Peris, M. y L. Escuder-Gilabert. 2009. A 21st century technique for food control: Electronic noses. *Analytica Chimica Acta* 638(1): 1-15.

Perkins-Veazie, P., J. R. Clark, D. J. Huber y E. A. Baldwin. 2000. Ripening physiology in 'Navaho' Thornless blackberries: color, respiration, ethylene production, softening, and compositional changes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125(3): 357-363.

Pietta, P., M. Minoggio y L. Bramati. 2003. Plant polyphenols: structure, occurrence and bioactivity. pp: 257-312. En: Atta-Ur, R. (ed.). *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. 491p.

Rodríguez, H. G. Á., J. A. C. Riveros, G. Fischer, G. A. L. Moreno y M. C. Q. Cuenca. 2007. Caracterización fisicoquímica y organoléptica del fruto de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) Almacenado 1 a 2°C. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 60(2): 4179-4193.

Shui, G., y L. P. Leong. 2002. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 977(1): 89-96.

Torri, L., N. Sinelli y S. Limbo. 2010. Shelf life evaluation of fresh-cut pineapple by using an electronic nose. *Postharvest Biology and Technology* 56(3): 239-245.

United States Department of Agriculture USDA. 2010. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22 Nutrient Lists [Online]. Available: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=18877> [Accessed 21 septiembre 2010].

Vasco, C., J. Ruales y A. Kamal-Eldin. 2008. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry* 111(4): 816-823.

Vicente, A., G. A. Manganaris, G. Sozzi y C. Cristoso. 2009. Nutritional quality of fruits and vegetables. pp:57-106. En: Florkowski W., Prussia S., Shewfelt R., Brueckner B. y Burlington, M.A. *Postharvest handling: a systems approach*. En: Academic Press (ed.). Segunda edición. E.E.U.U. 640p.

Wang, L.-S. y G. D. Stoner. 2008. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters* 269(2): 281-290.

Zuluaga, C. M., A. C. Diaz y M. C. Quicazán. 2011. Estandarización y validación del método de análisis del perfil aromático por nariz electrónica. *Ingeniería e Investigación* 31(2): 65-73.

## **4.2 Evaluación del efecto del despulpado y la concentración en las propiedades antioxidantes de mora (*Rubus glaucus* Benth) y agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz)**



**EFFECT OF PULPING AND CONCENTRATION ON ANTIOXIDANT PROPERTIES  
OF THE ANDES BERRY (*Rubus glaucus* Benth) AND BILBERRY (*Vaccinium  
meridionale* Swartz)**

**EFFECTO DEL DESPULPADO Y LA CONCENTRACIÓN EN LAS PROPIEDADES  
ANTIOXIDANTES DE MORA (*Rubus glaucus* Benth) Y AGRAZ (*Vaccinium meridionale  
Swartz*)**

Luisa Juana Bernal Roa<sup>1\*</sup>, Amanda Consuelo Díaz Moreno<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Chemical Engineer. Masters Student, Food Science and Technology. Universidad Nacional de Colombia. Calle 59a No. 63-20, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup>PhD. Food Quality, Safety and Technology. Assistant Professor, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Carrera 45 No. 26-85, Bogotá D.C., Colombia.

**ABSTRACT**

**RATIONALE:** Fruit processing is performed with the aim of prolonging product life, this causes chemical and physical changes that depend on the nature of the product and influences the soluble solids, vitamin C, and antioxidants contents, among others. The Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) and bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) are characterized by their source of

---

\*Correspondence: [ljbernalr@unal.edu.co](mailto:ljbernalr@unal.edu.co)

bioactives, especially anthocyanins, antioxidant phenolic compounds; these fruits are used in juices, jams, and smoothies, which generally use pulp or fruit concentrate as raw materials. The importance of bioactive compounds in consumer trends, due to their preventive role in the degenerative diseases, marks a stage in the research and development of food; consumers want to know the effects processing has on these compounds, changing the nutritional characteristics.

**AIM:** This study evaluated the effect of pulping and concentration operations on the antioxidant capacity and vitamin C, phenol and anthocyanins contents in Andean blackberry and bilberry.

**METHODS:** Antioxidant capacity was estimated with *in vitro* and non competitive methods, the TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) method measuring discoloration in the radical cation  $ABTS^{\bullet+}$  and the FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power) method quantified the reduction of  $Fe^{3+}$  to  $Fe^{2+}$  in the complex  $Fe^{3+}[TPTZ]$ . These two methods are To determine the total phenolic content, Folin-Ciocalteu reagent was used, and with the official method of pH differential, total monomeric anthocyanin content was established. Vitamin C was analyzed by high performance liquid chromatography HPLC. **RESULTS:** The results show that vitamin C does not differ significantly in the process. Furthermore, the values for anthocyanins, total phenols, and antioxidant capacity increased with pulping due to the solubility and availability of bioactive compounds but decreased during concentration. **CONCLUSION:** Pulping and concentration operations, common in fruits, affect antioxidant properties and the effect depends on the characteristics of the fruit and the process conditions to which it is subjected.

## RESUMEN

**ANTECEDENTES** La transformación de frutas se realiza con el objetivo de prolongar la vida útil esto ocasiona cambios químicos y físicos que dependen de la naturaleza del producto e influyen en el contenido de sólidos solubles, vitamina C, sustancias antioxidantes, entre otros. La mora (*Rubus glaucus* Benth) y el agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) se caracterizan por ser fuente de bioactivos en especial antocianinas, compuestos fenólicos antioxidantes; estas frutas son utilizadas en jugos, mermeladas y batidos, donde generalmente se emplean pulpas o concentrados de frutas como materias primas. La importancia que tienen los compuestos bioactivos en las tendencias actuales de consumo, debido a su papel preventivo en enfermedades degenerativas, marca una etapa en la investigación y desarrollo de alimentos, el consumidor desea conocer los efectos que tiene el procesamiento en estos compuestos para establecer los cambios en las características nutricionales. **OBJETIVO** este trabajo evalúa el efecto de las operaciones de despulpado y concentración de mora y agraz sobre la capacidad antioxidante, contenido de vitamina C, fenoles y antocianinas totales. **MÉTODOS** se estimó la capacidad antioxidante por dos métodos *in vitro* no competitivos, TEAC (actividad antioxidante en equivalentes trolox) que mide la decoloración del catión radical ABTS<sup>•+</sup> y el método FRAP (poder antioxidante reducción del hierro) que cuantifica la reducción del Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> en el complejo Fe<sup>3+</sup>[TPTZ]. Para la determinación del contenido de fenoles totales se empleó el reactivo Folin-Ciocalteu, y con el método oficial de pH diferencial se estableció el contenido de antocianinas totales monoméricas. La vitamina C fue analizada por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC. **RESULTADOS** los resultados muestran que la vitamina C no presenta diferencias significativas durante el proceso. De otra parte los valores de antocianinas,

fenoles totales, y capacidad antioxidante aumentan en el despulpado por la solubilidad y disponibilidad de los compuestos bioactivos pero disminuyen durante la concentración.

**CONCLUSIÓN** el despulpado y la concentración, operaciones comunes en las frutas, afectan las propiedades antioxidantes y el efecto depende de las características de la fruta y las condiciones del proceso a las que se somete.

**KEYWORDS:** Anthocyanins, Folin-Ciocalteu, FRAP, TEAC, Food Handling

**PALABRAS CLAVES:** Antocianinas; Folin-Ciocalteu; FRAP; TEAC; Manipulación de alimentos

## **INTRODUCTION**

Fruits and vegetables are used for both fresh consumption and processing; during processing, the nutritional composition may be altered, including the antioxidant properties, bioactive content, activity and bioavailability (1). It is difficult to predict the changes that these compounds may present under different process conditions and generalize the behavior, because it depends largely on the matrix, the treatment intensity, oxygen concentration, time and the presence of light, among other factors (2 -3). In this respect, it has been reported that vitamin C and phenolic compounds are susceptible to degradation during different processing operations (4). The Andes berry and bilberry are natural sources of phenolic acids (caffeic acid, coumaric, chlorogenic and ferulic) and flavonoids such as quercetin, ellagitannins and the most recognized, anthocyanins, producing the red and purple colorations (5-6); antioxidant substances that play an

important role against oxidation reactions. These fruits are marketed both as fresh and processed products: juices and jams (7), and are also used in the manufacture of intermediate products such as pulps and concentrates.

This study aimed to evaluate the effect of fruit pulping and concentrate operations on the antioxidant properties and vitamin C, phenol and anthocyanins contents.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Samples**

The Andes berry was acquired from a crop located at El Triunfo, in the municipality of Icononzo, in the Tolima department, Colombia. The bilberry was collected from wild bushes in Arrayanes, in the municipality of Tinjacá, Boyaca department, Colombia. The selected samples showed harvest maturity stages, after harvest, the fruit was selected and divided, one group for physicochemical analysis and the other stored at -18 °C until processing; before and after each operation a sample was taken for various physicochemical determinations.

### **Physicochemical analysis**

- Humidity: 10 g sample was placed in an oven (Heraeus Function Line thermo oven, USA) at 105 °C for 4 hours. AOAC Official Method 934.06; AOAC Official Method 934.01.
- Soluble Solids: 10 g of macerated fruit was used to determine the soluble solids content, °Brix, by refractometer according to Colombian Technical Standard NTC 4624.

– pH and acidity: a potentiometer was used (Schott Handylab PH11, USA) for both pH determination and potentiometric titration according to Colombian Technical Standard NTC 440 and AOAC Official Method 942.15.

### Processing operations

Fruit processing was performed on a laboratory scale. The pulping employed a food processor which homogenized the fruit and then the seeds were removed with the aid of a sieve. The concentration of the pulp was performed on a hot plate (IKA MAG C HS 7, Germany) at 75 °C (temperature control IKA ETS D5, Germany). Figure 1 shows the flow diagram of the unit operations performed on Andes berry and bilberry.

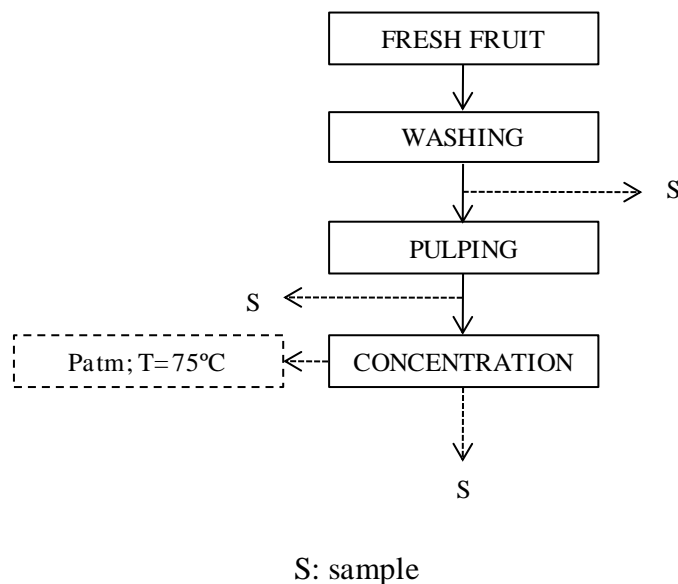


Figure 1. Flowchart of the fruit transformation process

Fruit pulping is carried out as an intermediate stage in the production processes of juices, sauces and jams; removing the inedible material, skins and seeds, and homogenizing and sieving the remaining product.

Fruit pulp concentration removes some of the water by evaporation to extend its useful life, increasing solids and decreasing water activity. Additionally, volume and weight is reduced which reduces transport and storage costs (8). When a fruit is subjected to concentration it is exposed to temperatures above 70 °C for extended periods of time, an operation that generates changes in sensory characteristics: color, aroma and flavor, and different authors have even reported significant losses of vitamin C (1-2, 9-10) and some flavonoids (2, 11).

### **Vitamin C**

Distilled water was used as an extraction solvent for vitamin C, before injection, the solution was purified with a C<sub>18</sub> cleaning cartridge to remove sugars and anthocyanins. Detection and quantitation were performed with a HPLC (Jasco PU980 pump, Detector UV / VIS 975, USA) in an ion exchange column Phenomenex Rezex ROA- OrganicAcid H + 8% at a flow of 0.5 ml min<sup>-1</sup> with mobile phase H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4mM at ambient temperature. The wavelength reading was 254nm (12). Each sample was extracted in duplicate and the data reported as mg of vitamin C g<sup>-1</sup> fresh fruit.

### **Extraction of antioxidants**

The solvent used for the extraction of antioxidant compounds was 96% ethanol (Chemi, Italy), acidified with 1% glacial acetic acid (JT Baker, USA). 20g of whole fruit was homogenized with 20ml of the extraction solution in an Ultraturrax (IKA T18 Basic, Germany), the previously stirred mixture was centrifuged (centrifugal Tecnovetro 4235, Italy); this procedure was repeated twice more with the obtained solid and the extracts were brought to a volume of 100ml with the extraction solution. Three extracts were taken from each sample and stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  until analysis (13).

### **Determination of total anthocyanins**

The methodology is described in the AOAC Official Method 2005.02 procedure of differential pH; each extract was read in duplicate and the results reported as mg of cyn-3-glu  $\text{g}^{-1}$  of dry sample.

### **Determination of total phenols**

The Folin-Ciocalteu reagent (Panreac, Spain) was used at a wavelength of 765nm, quantification was performed with reference to a calibration curve of caffeic acid, Sigma Aldrich, USA, ( $R^2 = 0.995$ ), each extract was read in duplicate and the results are reported as mg of caffeic acid  $\text{g}^{-1}$  dry sample (14-15).



## Determination of antioxidant capacity

### TEAC

Discoloration of the ABTS  $\bullet^+$  radical at 734nm was determined after 6 min of reaction with respect to a Trolox calibration curve (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromo-2-carboxylic acid) 97%, Sigma Aldrich, USA, ( $R^2 = 0.989$ ), each extract was read in triplicate and the results reported as  $\mu\text{mol}$  of trolox  $\text{g}^{-1}$  dry sample (4, 15).

### FRAP

A volume of 330 $\mu\text{l}$  of extract was mixed with 10ml of a solution prepared from acetate buffer pH 3.6 (300nm), TPTZ diluted in HCl (40 mM) and FeCl<sub>3</sub> (20 mM) in a 10:1:1 ratio respectively. The reaction time was one hour and the reading was taken at 593nm. Each extract was read in duplicate. The results are reported according to a Trolox calibration curve ( $R^2 = 0.996$ ) in  $\text{mmolTrolox g}^{-1}$  dry sample (16-18).

## Statistical Analysis

The data were analyzed according to an ANOVA one-way, in conjunction with a Tukey-Kramer multiple comparison test, using an alpha of 0.05. Different statistical analyses were carried out with MATLAB software V. 7.9 (Mathworks, U.S.A.).

## RESULTS

Harvested fruits were pulped and then concentrated at 75 °C and atmospheric pressure until a soluble solids content greater than 50% of the initial fruit ° Brix was reached (19); the physicochemical results and antioxidant properties are summarized in Table 1 for Andes berry and Table 2 for bilberry.

Table 1. Physicochemical and antioxidant characteristics for the transformation process of Andes berry.

<b>Andes Berry</b>	<b>Primary Material</b>		<b>Pulped</b>		<b>Concentrated</b>	
Humidity%	87.60±1.12	a	93.18±0.01	b	89.05±0.09	a
°Brix	7.56±0.01	a	6±0.00	b	10.3±0.00	c
pH	2.88±0.00	a	2.85±0.00	a	2.8±0.01	a
Malic acid %	2.86±0.00	a	2.44±0.09	a	3.64±0.03	a
Vitamin C mg g <sup>-1</sup> dry fruit	0.28±0.04	a	0.79±0.05	b	0.27±0.01	a
Total Anthocyanins mg g <sup>-1</sup> dry fruit	2.75±0.28	a	3.98±0.15	b	3.18±0.21	c
Total Phenols mg caffeic acid g <sup>-1</sup> dry fruit	18.49±0.36	a	20.56±0.32	b	16.01±0.19	c
TEAC μmol Trolox g <sup>-1</sup> dry fruit	155.20±27.33	a	199.45±14.20	b	120.98±5.19	c
FRAP mmol Trolox g <sup>-1</sup> dry fruit	200.06±23.16	a	228.96±8.77	b	163.34±8.14	c

Reported Value Mean ± SD, SD = standard deviation

Means with different letters in the same row differ significantly

The Andes berries and bilberries presented humidity and pH within the expected values, humidity between 85 and 95% and pH between 2.5 and 4.5.

Table 2. Physicochemical and antioxidant characteristics for processing operations of bilberry.

<b>Bilberry</b>	<b>Primary Material</b>		<b>Pulped</b>		<b>Concentrated</b>	
Humidity %	82.65±0.37	a	85.15±0.20	b	78.9±0.29	c
°Brix	11.1±0.14	a	10.5±0.14	b	16.3±0.14	c
pH	2.95±0.01	a	2.94±0.03	a	2.87±0.00	a
Acidity % (citric acid)	2.22±0.018	a	2.13±0.01	a	2.88±0.01	a
Vitamin C mg/g dry fruit	0.13±0.05	a	0.22±0.09	a	0.13±0.00	a
Total Anthocyanins mg g <sup>-1</sup> dry fruit	4.97±0.38	a	4.46±0.04	b	3.64±0.04	c
Total Phenols mg caffeic acid g <sup>-1</sup> dry fruit	23.78±0.94	a	21.47±0.48	b	17.70±1.62	c
TEAC μmol Trolox g <sup>-1</sup> dry fruit	194.55±6.09	a	183.24±8.85	a	157.79±9.00	b
FRAP mmolTrolox g <sup>-1</sup> dry fruit	196.20±1.45	a	182.61±8.18	a	161.18±13.71	b

Reported value mean ± SD, SD = standard deviation

Means with different letters in the same row differ significantly

## DISCUSSION

The composition of a food can be used as an index of quality and can be affected by environmental and genetic factors (20-21). The Andes berries used for the pulping process had a maturity stage of five, according to NTC 4106, where the fruit has completed its development in line with °Brix and color (22).

Studies on maturation in berries differentiate four maturity stages: the first where the surface is green and the fruit has developed its size and shape; a stage where the berry has lost the initial coloring in exchange for a red skin which changes to purple in the next stage of harvesting and a final stage of ripeness. The sample used for comparison processing was in a stage of maturity that could be classified as stage three (5, 23).

Humidity of the Andes berry (93.18%) and bilberry pulp (85.15%), compared to that of their fresh fruit (87.60% and 82.65% respectively), presented higher values because part of the solid matter had been removed as is the objective of the pulping process. Acidity and pH are physicochemical parameters that were maintained without significant differences throughout the process.

The antioxidant capacity data found for fresh fruits (Andes berry 24.80 mg Trolox g<sup>-1</sup> fresh fruit and bilberry 35.70 mg Trolox g<sup>-1</sup> fresh fruit) had significant differences with respect to other tropical fruits like arazá, *Eugenia stipitata* (11.4 micromol Trolox g<sup>-1</sup> fresh fruit), borojó, *Borojoa sorbilis* (3.88 micromol Trolox g<sup>-1</sup> fresh fruit) and banana passion fruit, *Passiflora tarminiana* (114 micromol Trolox g<sup>-1</sup> fresh fruit) (24), these red fruits have better antioxidant characteristics; the bilberry has a higher content of anthocyanins and total phenols compared to the Andes berry and during the processing operations antioxidant capacity, by the TEAC method, in the bilberry presented a 19% loss while the Andes berry decreased 22%, total phenols were considerably affected, in both fruits, in the concentration stage; the loss exceeded 10%. In the Andes berry, the vitamin C content significantly increased in the pulping stage but decreased during concentration, to the extent that there was no significant difference with the initial value. The total anthocyanins, total phenols and in general the antioxidant capacity behavior were favored in the pulping stage and affected by the concentration step. In the bilberry, vitamin C content remained constant during processing; total anthocyanins, total phenol and antioxidant capacity decreased during different processing operations. The chemical nature of the bioactive is a key factor, but not exclusive, to determine stability during processing; pulping and concentration incorporate air, disrupt cellular structures that can release enzymes

(25), increase temperature and in general induce change in the metabolism of the fruits, which can change their antioxidant composition (26).

The stability of vitamin C is dependent on oxygen concentration, temperature and pH (10); the results differ from the majority of reports made where processes such as breaking, cooking or pasteurizing decrease the content in vegetables such as the tomato, cabbage and broccoli (10, 27). Variations of vitamin C found in Andes berry and bilberry are minimized by the thermal process, eg 1.31 mg g<sup>-1</sup> dry fruit in bilberry pulp and 1.29 mg g<sup>-1</sup> dry fruit in bilberry concentrate; this behavior corresponds to that found in other fruits such as plums, cherries and peaches (28), where pH values are comparable.

The operations of peeling, cutting, grinding and pulping favor the release of the polyphenol oxidase enzyme which catalyzes the polymerization reactions using flavonols and hydroxycinnamic acids as substrates; this can, according to overall composition, affect the antioxidant capacity (26). The results obtained, under conditions of the previously described process, in Andes berry show that this phenomenon does not significantly affect the antioxidant capacity, while in the bilberry, total phenol content decreased without significant alterations in the TEAC and FRAP values. In the prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica* Mill), similar behavior was reported to that of bilberry, while the total phenol content decreased after six days of storage, the antioxidant capacity was not altered in the evaluated period (29). Different studies show that phenolic substances such as ellagitannins present in these berries decrease after heating (7) which is consistent with that found for the antioxidant capacity in fruits evaluated during concentration of the pulp. Thermal treatments such as pasteurization, which maintains a temperature between 72 and 75 °C for a short time 15-20s, lead to the moderate

destruction of phenolic compounds and vitamin C, although losses can be minimized by controlling the oxygen concentration (2); under the conditions under which they were handled, the samples favored degradation by exposure to high temperatures for prolonged periods of time. The stability of anthocyanins generally depends on the pH value of the medium and the presence of ions and proteins (30). The difference between the behavior of anthocyanins in Andes berry and bilberry can be explained by the slightly basic pH in bilberry, anthocyanins are more stable at acidic values when the quinonoidal or flavylium cation structure predominates, when there is an increase in the temperature, sugar is lost which binds to the molecule and forms a colorless structure (13, 31). In a particular case of berry pulp subjected to 93 °C for 10 minutes and then pasteurized, a loss of 43% of anthocyanins was reported (30), which is consistent with the loss of 26% in the concentrated bilberry product.

## **CONCLUSIONS**

The results suggest that the processing of fruit has an effect on the antioxidant properties of Andes berry and bilberry that depends on the stability of the bioactive substances of the vegetable origin matrix, its pH, the presence of the polyphenol oxidase enzyme and the process conditions; concentration has a greater detrimental effect on the antioxidant capacity of the fruit than pulping. In Andes berry, pulping improves vitamin C content and antioxidant properties by availability of compounds, while concentration decreases the antioxidant capacity. In bilberry, pulping and concentration reduced the antioxidant properties of the product.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the work team at the Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos- ICTA at the Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Institute of Food Science and Technology) and the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria -CORPOICA (Colombian Agricultural Research Corporation).

## REFERENCES

1. Nicoli MC, Anese M, Parpinel M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci Tech*. 1999 Mar;10(3): 94-100.
2. Johnson I, Williamson G, editors. *Phytochemical Functional Foods*. Cambridge, England. Woodhead Publishing.; 2003. 398 p.
3. Wen TN, Prasad KN, Yang B, Ismail A. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of raw and blanched vegetables. *Innov Food Sci Emerg*. 2010 Feb;11(3): 464-469.
4. Murcia AM, Jiménez AM, Martínez-Tomé M. Vegetables antioxidant losses during industrial processing and refrigerated storage. *Food Res Int*. 2009 Apr; 42(8): 1046-1052.
5. Castrejón AD, Eichholz I, Rohn S, Kroh LW, Huyskens-Keil S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chem*. 2008 Jan;109(3): p. 564-572.
6. Pietta P, Minoggio M, Bramati L. Plant polyphenols: structure, occurrence and bioactivity en *Studies in Natural Products Chemistry*. Amsterdam, The Netherlands: Atta-ur R, editor. Elsevier; 2003. Vol 9, 257-312 p.

7. Gancel AL, Feneuil A, Acosta O, Pérez AM, Vaillant F. Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Res Int.* 2011 Jun;44(7): 2243-2251.
8. Fellows P. *Food Processing Technology, Principles and Practice*. 2nd ed. Boca Raton, FL. Woodhead Publishing; 2000. 610 p.
9. Chuah AM, Ya-Chi L, Tomoko Y, Hitoshi T, Li-Jun Y, Teruyoshi M. Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chem.* 2008 Mar;111(1): 20-28.
10. Jongen W, Southon S, Faulks R, et al. *Fruit and Vegetable Processing, Improving Quality*. Cambridge, UK:Jongen W, editor;. Woodhead Publishing; 2002. 408 p.
11. Alvarez-Parrilla E, Andres-Lacueva C, Bolaños-Villar AV, et al. *Fruit and Vegetable Phytochemicals, Chemistry, Nutritional Value and Stability*. Singapore, India: de la Rosa L, Alvarez-Parrilla E, González-Aguilar G, editors. Wiley Blackwell; 2010. 384 p.
12. Shui G, Leong LP. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 2002 Aug;977(1): 89-96.
13. Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández ML, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* 2009 Sep;113(4): 859-871.
14. Oliveira I, Baptista P, Malheiro R, Casal S, Bento A, Pereira JA. Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Res Int.* 2011 Feb;44(5): 1401-1407.
15. Vasco C, Ruales J, Kamal-Eldin A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem.* 2008 Apr;111(4): 816-823.



16. Gorinstein S, Jastrzebski Z, Leontowicz H, Leontowicz M, Namiesnik J, Najman K, Park Y, Heo B, Cho J, Bae J. Comparative control of the bioactivity of some frequently consumed vegetables subjected to different processing conditions. *Food Control*. 2009 Jul;20(4): 407-413.
17. Muller L, Gnoyke S, Popken AM, Bohm V. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Sci Technol*. 2010 Feb;43(6): 992-999.
18. Koca I, Karadeniz B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Sci Hortic-Amsterdam*. 2009 Mar;121(4): 447-450
19. Resolución Número 7992 de 1991, por la cual se reglamenta parcialmente el Titulo V de la Ley 09 de 1979 en lo relacionado con la elaboración, conservación y comercialización de jugos, concentrados, néctares, pulpas, pulpas azucaradas y refrescos de Frutas. Bogotá, Colombia. Ministerio de Salud. 1991. 21 p.
20. Dai J, Gupte A, Gates L, Mumper RJ. comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food Chem Toxicol*. 2009 Jan;47(4): p. 837-847.
21. Vicente A, Manganaris GA, Sozzi G, Cristoso C. Nutritional Quality of Fruits and Vegetables in Postharvest Handling: A Systems Approach. 2nd ed. Burlington, MA. Florkowski WJ, Prussia SE, Shewfelt RL, Brueckner B, editors. 2009. Chap 5, 50 p.
22. Frutas Frescas, Mora de Castilla, Especificaciones. Instituto Colombiano de Normas Técnicas-ICONTEC. 1997: Bogotá, Colombia. 15 p.
23. Cocetta G, Karppinen K, Suokas M, Hohtola A, Haggman H, Spinardi A, Mignani I, Jaakola L. Ascorbic acid metabolism during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit development. *J Plant Physiol*. 2012 Mar;169(11): 1069-1065.

24. Contreras-Calderón J, Calderón-Jaimes L, Guerra-Hernández E, García-Villanova B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Res Int.* 2011 Nov;44(7): 2047-2053.
25. Knockaert G, Lemmens L, Van Buggenhout S, Hendrickx M, Van Loey A. Changes in  $\beta$ -carotene bioaccessibility and concentration during processing of carrot puree. *Food Chem.* 2012 Jan;133(1): 60-67.
26. Tomás-Barberán FA, Ferrer F, Gil MI. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing in *Studies in Natural Products Chemistry*. Amsterdam, The Netherlands: Atta-ur R, editor. Elsevier; 2000. Vol 23, 739-795p.
27. Sikora E, Cieslik E, Leszczynska T, Filipiak-Florkiewicz A, Pisulewski PM. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chem.* 2008 Jul;107(1): 55-59.
28. Leong SY, Oey I. Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. *Food Chem.* 2012 Feb;133(4): 1577-1587.
29. Piga A, Caro D, Pinna I, Agabbio M. Changes in ascorbic acid, polyphenol content and antioxidant activity in minimally processed cactus pear fruits. *LWT- Food Sci Technol.* 2003 Nov;36(2): 257-262.
30. Patras N, Brunton P, O'Donnell C, Tiwari BK. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci Tech.* 2010 Jan;21(1): 3-11.
31. Garzón GA. [Anthocyanins as natural dyes and bioactive compounds: review]. *Acta Biol Colomb.* 2008 Aug;13(3): 27-36. Spanish

## **5. Otros Resultados**

### **5.1 Evaluación de la capacidad antioxidante durante el proceso de obtención de pulpas vegetales**

Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo- ENID 2011

# EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DURANTE EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE PULPA DE VEGETALES

Luisa Juana Bernal<sup>1\*</sup>, Amanda Consuelo Díaz Moreno<sup>1</sup>

Universidad Nacional de Colombia

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - ICTA - Sede Bogotá



## RESUMEN

Con el objetivo de establecer cómo afecta el proceso de obtención de pulpa las propiedades antioxidantes en lulo, mango, feijoa, maracuyá, espinaca y remolacha, se analizó el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante por los métodos *in vitro* TEAC y DPPH en diferentes etapas del proceso. Los datos encontrados tanto de fenoles totales como de actividad antioxidante por DPPH destacan a la feijoa en el grupo de frutas frescas evaluadas; el contenido de fenoles totales para las hortalizas, respecto a las frutas, es menor. En general, el proceso estándar bajo el que se analizó las muestras favorece el aumento de la capacidad antioxidante de los productos y establece diferencias entre métodos de análisis y en algunos casos entre etapas de transformación.

## INTRODUCCIÓN

Una de las alternativas para la comercialización de frutas y la disminución de pérdidas poscosecha ha sido el procesamiento de las mismas, la elaboración de pulpas ha tomado un papel importante en la industria ya que es un producto intermedio que facilita la obtención de productos como jugos, concentrados, conservas, entre otros. Debido a que recientes estudios han demostrado que los compuestos antioxidantes juegan un papel en la prevención de enfermedades neuronales y cardiovasculares, cáncer, diabetes y Alzheimer [1]-[2] es importante evaluar en diferentes matrices vegetales, fuertes por excelencia de antioxidantes, los cambios que se presentan en estas propiedades durante el proceso de transformación. Las frutas analizadas fueron mango (*Mangifera indica* L.), maracuyá (*Passiflora edulis*), lulo (*Solanum quitoense*) y feijoa (*Acca sellowiana*) y las hortalizas espinaca (*Spinacia oleracea*) y remolacha (*Beta vulgaris*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención de pulpa:** en las figuras No. 1 y 2 se muestra el proceso industrial empleado.

**Extractos:** Se utilizaron muestras comerciales sometidas a un proceso industrial /piloto para la obtención de pulpa; la muestra fue homogenizada y mezclada (20g) con etanol (volumen final 100ml), obteniéndose el extracto mediante centrifugación y filtrado.

**Fenoles totales y TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity):** El contenido de fenoles totales se determinó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu y como estándar ácido caféico ( $R^2=0,997$ ), la capacidad antioxidante medida por TEAC se cuantificó con respecto a Trolox ( $R^2=0,999$ ) y se reporta como mmol de trolox/g muestra. La metodología seguida, con algunas modificaciones, fue propuesta por Dai, et al. 2009. [3].

**DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl):** Se preparó la solución de trabajo a partir de la mezcla del radical DPPH y metanol, se ajustó la absorbancia (313nm) entre 0,70-0,75. Los resultados son expresados como IC<sub>50</sub>: cantidad de muestra necesaria para disminuir en un 50% el contenido de DPPH inicial (mg muestra/ml de DPPH).

**Análisis estadístico:** Los datos fueron analizados estadísticamente con un nivel de confianza del 95%, por medio de Análisis de Varianza ANOVA y luego con de la prueba de Tukey.

## RESULTADOS

### FRUTAS

**Fenoles totales:** en la figura No. 3 se comparan los contenidos de fenoles durante el proceso de obtención de pulpa

Figura No. 1 Diagrama de flujo de proceso: Obtención de la pulpa de fruta

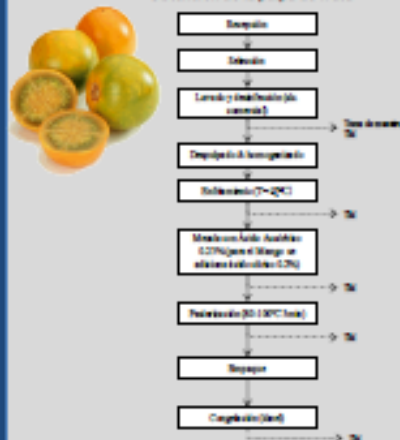


Figura No. 2 Diagrama de flujo de proceso: Obtención de pulpa de hortaliza

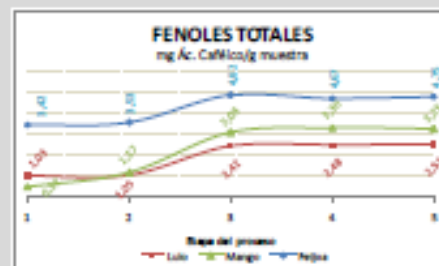
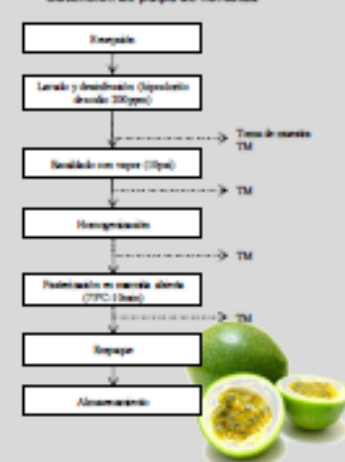


Figura 3 Diagrama de barras del contenido de fenoles totales en las frutas  
1. Fruta fresca 2. Despepado 3. Mezcla 4. Pasterizado 5. Congelación

**Maracuyá:** la fruta fresca presenta un contenido de fenoles significativamente mayor respecto al de las demás etapas del proceso, la operación de despepado favorece la homogenización de la fruta y elimina las semillas que pueden ser aporte de compuestos fenólicos antioxidantes. No se presentan cambios significativos entre las etapas de despepado, pasterización y congelación.

**TEAC y DPPH:**

**Mango:** las etapas de mezcla, pasterizado y congelación no presentan diferencias significativas entre los valores encontrados; respecto a la fruta fresca, en la etapa de mezcla hay un aumento de la capacidad antioxidante que también se observa en el contenido de fenoles totales.

**Feijoa y lulo:** las magnitudes de capacidad antioxidante del fruto fresco y despepado son muy parecidas y se diferencian significativamente de los valores encontrados en las etapas de mezcla, pasterizado y congelación.

**Maracuyá:** las condiciones bajo las que se procesa no favorecen las propiedades antioxidantes de la fruta, entre las operaciones se presenta una disminución respecto al valor inicial encontrado en la fruta fresca.

### HORTALIZAS

En las tablas 1 y 2 se observa el comportamiento durante el proceso de las propiedades antioxidantes de las hortalizas.

Tabla 1 Propiedades antioxidantes proceso de transformación espinaca

	Fresca	Escaldado	Homogenizado	Pasterizado
FOUN	0,435 a	0,471 a	0,471 a	0,840 b
TEAC	2,21e-3 a	2,17e-3 a	1,543e-3 b	2,55e-3 a

Tabla 2 Propiedades antioxidantes proceso de transformación remolacha

	Fresca	Escaldado	Homogenizado	Pasterizado
FOUN	0,407 a	0,509 b	0,624 c	1,281 d
TEAC	4,70e-3 a	6,94e-3 b	5,21e-3 a	9,81e-3 c

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas

## CONCLUSIONES

Las propiedades antioxidantes se comportan según el proceso y matriz evaluadas. La pasterización no afecta las propiedades antioxidantes de las frutas y en las hortalizas las favorece debido a la concentración de solutos. La etapa de mezcla es crítica dentro del proceso ya que afecta los valores tanto del contenido de fenoles como de propiedades antioxidantes.

## REFERENCIAS

- Castañeda-Ovando, A., et al, Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chemistry, 2006. 113(4): p. 859-871.
- Andersen, B.M. and K.R. Markham, Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. 2006, Boca Raton, FL: CRC Press. It is an Imprint of Taylor & Francis Group.
- Dai, J., et al, A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. Food and Chemical Toxicology. 2009. 47(4): p. 837-847.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo de COLCIENCIAS programa Jóvenes Investigadores e Innovadores 2009, Alimentos SAS S.A. y el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos-ICTA, laboratorio de análisis físico-químico, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá

\* Luisa Juana Bernal, lbernal@una.edu.co, Dirección de correspondencia: Carrera 30 No. 45-03, Edificio 300 C, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá

## **5.2 Análisis de la capacidad antioxidante en frutos rojos durante el proceso de obtención de pulpa**

II Conferencia Internacional en Manejo Poscosecha y Calidad de Productos Hortícolas de Interés en el Trópico. 2011

**ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN FRUTOS ROJOS**  
**DURANTE EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE PULPA**  
**ANTIOXIDANT CAPACITY ANALYSIS OF RED FRUITS DURING PULP**  
**PROCESS**

Luisa Bernal Roa<sup>1</sup>, Consuelo Díaz-Moreno<sup>2</sup>

**RESUMEN**

Las pulpas de fruta, por ser un producto intermedio, ocupan un lugar destacado entre de los derivados hortofrutícolas. Para su obtención, la fruta es sometida a diferentes operaciones de transformación que pueden comprometer sus características bioactivas; por esta razón es importante evaluar el comportamiento de la capacidad antioxidante durante el proceso. Se hicieron pruebas con pulpa de agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*), fresa (*Fragaria ananassa*), mora (*Rubus glaucus*) y uva Isabella (*Vitis vinífera*). Durante el proceso de despulpado se determinó el contenido de fenoles totales y las propiedades antioxidantes por medio de los radicales libres DPPH y ABTS, en el producto fresco, escaldado, despulpado y pasteurizado. Las frutas frescas reportan un contenido de fenoles, en mg de ácido caféico/g, entre 0,48 - 5,14 y los productos terminados entre 0,46 - 6,76, la mayor capacidad antioxidante la tiene el agraz. El proceso al que se somete la uva no afecta el contenido final de fenoles, en la fresa se observa una disminución contrario al caso del

---

<sup>1</sup> Ingeniera Química. Estudiante Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos- Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá y Sede Medellín. [ljbernalr@unal.edu.co](mailto:ljbernalr@unal.edu.co)

<sup>2</sup> Ingeniera de Alimentos. PhD. Calidad, Seguridad y Tecnología de Alimentos, Profesora Asistente. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA. Universidad Nacional de Colombia [amcdiazmo@unal.edu.co](mailto:amcdiazmo@unal.edu.co)

\* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia: [ljbernalr@unal.edu.co](mailto:ljbernalr@unal.edu.co)

agraz y la mora. La capacidad antioxidante es dependiente del método de evaluación, la mora y agraz, según DPPH, no presentan cambios entre las diferentes etapas, en la fresa y la uva se presenta una disminución luego del despulpado y utilizando el método del TEAC se observa que los tratamientos térmicos afectan las matrices evaluadas.

## **ABSTRACT**

Fruit pulps, despite of being an intermediate product, have an outstanding place among horticultural derivatives. In order to obtain this pulp, the fruit is submitted to several transformation operations that could affect their bioactive characteristics, for this reason is important to evaluate the antioxidant properties during the process. Tests were performed by using pulps of these fruits: blueberry (*Vaccinium meridionale Swartz*), strawberry (*Fragaria ananassa*), andean blackberry (*Rubus glaucus*) and Isabella grape (*Vitis vinífera*). Throughout the pulping process there were analyzed the total polyphenol content and antioxidant properties with DPPH and ABTS free radical, in fresh, blanched, pulped and pasteurized product. The fresh fruits had between 0,48 - 5,14 mg cafeic acid/g of total polyphenols and the finished products between 0,46 - 6,76 mg cafeic acid/g, the highest value of antioxidant capacity was from blueberry. The amount of polyphenols in Isabelle grape was not affected by the process, however in strawberry this property decreased meanwhile in blueberry and blackberry increased. The antioxidant power depends on the method of analysis; blueberry and blackberry did not show changes between the stages, strawberry and grape decreased their antioxidant power after the pulp stage, under DPPH

analysis. On the other hand, the ABTS free radical method showed thermal treatments had an effect on the different evaluated fruits.

## **PALABRAS CLAVE**

*Procesamiento, mora, agraz, fresa y uva Isabella*

## **INTRODUCCIÓN**

Las frutas como mora, agraz, fresa y uva son fuentes reconocidas de vitaminas y polifenoles además sus características sensoriales, aroma y color, las hacen muy atractivas al consumo [1]; aunque su composición depende del estado de madurez y de las diferentes condiciones ambientales bajo las que fueron cultivadas, también el manejo poscosecha y los procesos de transformación pueden alterar el contenido de bioactivos [2-5].

La vitamina C, las antocianinas, la quercetina y la catequina, entre muchos otros compuestos antioxidantes presentes en éste tipo de frutas [2, 6-7], son sustancias responsables de proteger a las

células de los radicales libres, autores de algunos daños estructurales. Debido a éste comportamiento se ha estudiado el efecto que tienen en la salud humana y se ha encontrado que su consumo puede prevenir la aparición de enfermedades cancerígenas y degenerativas [8-11] por lo que resulta de gran importancia determinar el efecto de los procesos de transformación sobre las propiedades antioxidantes. El trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de un proceso industrial de obtención de pulpa sobre las propiedades antioxidantes de agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*), fresa (*Fragaria ananassa*), mora (*Rubus glaucus*) y uva Isabella (*Vitis vinífera*).



## MATERIALES Y MÉTODOS

### MUESTRAS

Las frutas analizadas fueron muestras comerciales de agraz (Ag), fresa (Fr), mora (Mo) y uva Isabella (U) sometidas a un proceso de obtención de pulpa.

### CARACTERÍSTICAS

#### ANTIOXIDANTES

#### EXTRACCIÓN COMPUESTOS

#### ANTIOXIDANTES

Para la extracción de los compuestos antioxidantes se utilizó etanol al 96% (Chemi) acidificado 1% con ácido acético [12].

Se pesó 20g de producto homogenizado, al que se le agregó 20ml de solución de extracción y se agitó durante en vortex y luego durante un tiempo prolongado en plancha de agitación magnética. La mezcla se centrifugó a 4500 rpm durante 10min (centrífuga Tecnovetro 4235), este procedimiento se repitió dos veces más con el sólido obtenido y los extractos se

llevaron a un volumen de 100ml con solución de extracción.

### FENOLES TOTALES

Para la determinación del contenido de fenoles totales se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu (Panreac), método empleado por [13-14]. La longitud de onda empleada fue a 765nm y la cuantificación se realizó utilizando una curva de calibración de ácido caféico, Sigma Aldrich, ( $R^2=0,997$ ).

### CAPACIDAD ANTIOXIDANTE-TEAC

El método para la determinación de la capacidad antioxidante es el propuesto por [14-15]. La decoloración del radical se determinó a 734nm luego de 6min de reacción. La cuantificación se realizó con respecto a Trolox, (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) 97%, Sigma Aldrich, ( $R^2=0,999$ ), se reporta como mmol de trolox/g muestra.

## CAPACIDAD ANTIOXIDANTE- DPPH

Método propuesto por [16], la decoloración del radical se determinó a 515nm luego de 5min de reacción a 40°C. Los resultados se reportan como IC<sub>50</sub>: cantidad de muestra necesaria para disminuir el 50% del contenido de DPPH inicial (mg muestra/ml de DPPH) a mayor valor, la capacidad antioxidante es menor.

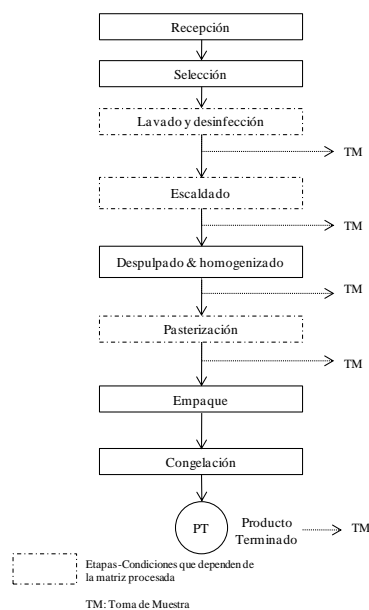
## PROCESO DESPULPADO

En un proceso de obtención de pulpa las etapas dependen de la matriz y de las características físicoquímicas, microbiológicas y sensoriales deseadas en el producto final. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se puede observar el diagrama de flujo del proceso, en el agraz se incluyó una etapa de escaldado para ablandar los tejidos de la pared celular del fruto. La pasterización de la mora y del agraz se realizó en

marmita abierta contrario al caso de la uva y la fresa.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron por medio del ANOVA de una vía y la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ )



**Figura 1 Diagrama de Flujo Proceso  
Despulpado**

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las antocianinas son las sustancias responsables del color rojo-morado que caracteriza a las frutas evaluadas; su contenido se relaciona con los resultados

encontrados en los análisis de fenoles totales y capacidad antioxidante [17-18]; el agraz y la mora son las frutas que reportan los valores más altos (ver **¡Error!**

**No se encuentra el origen de la referencia.)** aún después del proceso de transformación, mientras que la uva se encuentra en la última posición.

**Tabla No. 1 Resultados Propiedades Antioxidantes**

	Fenoles Totales mg ácido caféico/g muestra				TEAC mmol Trolox/g muestra				DPPH mg muestra/ ml de DPPH			
	F	±	PT	±	F	±	PT	±	F	±	PT	±
<b>U</b>	0,482a	6,13E-02	0,464a	1,05E-02	6,641E-03a	6,06E-04	3,440E-03b	3,31E-04	10,158 a	1,15	12,923b	1,27
<b>Fr</b>	1,517b	5,28E-02	1,425c	2,85E-02	1,051E-02c	7,56E-04	1,255E-02d	3,30E-04	2,471c	4,91E-02	2,885d	0,13
<b>Mo</b>	2,383d	5,68E-02	3,088e	4,49E-02	2,481E-02e	2,15E-03	2,846E-02f	2,18E-03	0,970f	6,29E-02	1,024f	2,21E-02
<b>Ag</b>	5,138f	9,06E-02	6,755g	3,55E-01	3,882E-02g	1,73E-03	4,491E-02h	5,80E-03	1,250e	5,46E-02	1,282e	8,01E-02

F: Fruta Fresca, PT: Producto Terminado

El contenido de fenoles totales en la uva no se ve afectado por el proceso, mientras que en el caso de las propiedades antioxidantes se presenta una disminución significativa en la etapa de pasterización, según el método del TEAC el fruto fresco reporta 6,641e-3 y la pulpa pasterizada 3,656e-3 mmol Trolox/g muestra; mientras que DPPH disminuye de 10,158 en la fruta fresca a 13,475 mg muestra/ml DPPH en la pulpa pasterizada, éste último valor no presenta diferencias significativas con el valor reportado para

el producto terminado. El cambio de las propiedades antioxidantes puede presentarse por la degradación de vitaminas, tal como la vitamina C, que afectan el comportamiento antioxidante general.

La fresa presenta una diferencia significativa entre el contenido de fenoles del producto fresco y el terminado, la disminución es significativa desde la etapa de pasterización (1,405mg ácido caféico/g muestra), en las siguientes

operaciones este valor no presenta variación estadística, esto se confirma con los resultados para DPPH, el valor de la fruta fresca disminuye en el despulpado a un valor de 2,876mg muestra/ml DPPH. La capacidad antioxidante según TEAC presenta cambios significativos desde la etapa de despulpado, el valor aumenta a 1,246e-2mmol Trolox/g muestra y permanece estadísticamente estable por las siguientes etapas del proceso.

La mora y el agraz presentan un comportamiento similar en cada una de las metodologías de análisis empleadas; la etapa de pasterización favorece el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante por el método TEAC; según el radical DPPH no hay cambios significativos dentro del proceso. Estas frutas cuentan con las mejores características en fresco dentro del grupo evaluado y conservan sus propiedades antioxidantes luego de la pasterización en

marmita abierta, donde se presenta un contacto con oxígeno del aire y una evaporación de agua.

## **CONCLUSIONES**

Las propiedades antioxidantes se ven afectadas por las operaciones de transformación a las que se someten las frutas, el comportamiento depende tanto de la naturaleza de la muestra como del proceso. El tratamiento térmico de pasterización modifica las características antioxidantes, y en el caso del agraz el escaldado no afecta sus propiedades. Del grupo de frutas evaluado se destacan las características antioxidantes del agraz y la mora que se ven favorecidas durante el proceso de despulpado, mientras que la fresa y la uva presentan valores comparativamente menores y el proceso disminuye sus propiedades antioxidantes.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue realizado con el apoyo de COLCIENCIAS-Jóvenes Investigadores e Innovadores 2009, Alimentos SAS S.A. y el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos- ICTA de la Universidad Nacional de Colombia (sedes Bogotá-Medellín).

## REFERENCIAS

1. Talcott, S.T., *Chapter 2: Chemical components of berry fruits*, in *Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion*, Y. Zhao, Editor. 2007, CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL.
2. Castrejón, A.D.R., et al., *Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (Vaccinium corymbosum L.) during fruit maturation and ripening*. Food Chemistry, 2008. **109**(3): p. 564-572.
3. Gancel, A.-L., et al., *Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (Rubus adenotrichus)*. Food Research International. **In Press, Corrected Proof**.
4. Garzón, G.A., et al., *Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (Vaccinium meridionale Swartz) from Colombia*. Food Chemistry, 2010. **122**(4): p. 980-986.
5. Wang, W.-D. and S.-Y. Xu, *Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate*. Journal of Food Engineering, 2007. **82**(3): p. 271-275.
6. Bordignon-Luiz, M.T., et al., *Colour stability of anthocyanins*

- from Isabel grapes (Vitis labrusca L.) in model systems.* LWT - Food Science and Technology, 2007. **40**(4): p. 594-599.
7. Dimitrios, B., *Sources of natural phenolic antioxidants.* Trends in Food Science & Technology, 2006. **17**(9): p. 505-512.
  8. Martínez-Navarrete, N., M. del Mar Camacho Vidal, and J. José Martínez Lahuerta, *Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud.* Actividad Dietética, 2008. **12**(2): p. 64-68.
  9. Petti, S. and C. Scully, *Polyphenols, oral health and disease: A review.* Journal of Dentistry, 2009. **37**(6): p. 413-423.
  10. Ross, J.A. and C.M. Kasum, *Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety.* Annual Reviews Nutrition, 2002. **22**: p. 19-34.
  11. Stintzing, F.C. and R. Carle, *Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition.* Trends in Food Science & Technology, 2004. **15**(1): p. 19-38.
  12. Castañeda-Ovando, A., et al., *Chemical studies of anthocyanins: A review.* Food Chemistry, 2009. **113**(4): p. 859-871.
  13. Oliveira, I., et al., *Influence of strawberry tree (Arbutus unedo L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity.* Food Research International, 2011. **44**(5): p. 1401-1407.
  14. Vasco, C., J. Ruales, and A. Kamal-Eldin, *Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from*

- Ecuador*. Food Chemistry, 2008. **111**(4): p. 816-823.
15. Antonia Murcia, M., A.M. Jiménez, and M. Martínez-Tomé, *Vegetables antioxidant losses during industrial processing and refrigerated storage*. Food Research International, 2009. **42**(8): p. 1046-1052.
16. Buratti, S., S. Benedetti, and M.S. Cosio, *Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis*. Talanta, 2007. **71**(3): p. 1387-1392.
17. WKoca, I. and B. Karadeniz, *Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey*. Scientia Horticulturae, 2009. **121**(4): p. 447-450.
18. Pantelidis, G.E., et al., *Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries*. Food Chemistry, 2007. **102**(3): p. 777-783.

### **5.3 Evaluación del perfil aromático y propiedades antioxidantes durante la maduración de mora (*Rubus glaucus* Benth)**

II Conferencia Internacional en Manejo Poscosecha y Calidad de Productos Hortícolas de Interés en el Trópico. 2011



## **Evaluación del perfil aromático y propiedades antioxidantes durante la maduración mora**

**(*Rubus glaucus* Benth)**

### **Aromatic profile and antioxidant properties during blackberry (*Rubus glaucus* Benth)**

#### **ripening**

Luisa Juana Bernal<sup>1\*</sup>, Laura Angélica Melo<sup>2</sup>, Consuelo Díaz-Moreno<sup>3</sup>

#### **RESUMEN**

El seguimiento del proceso de maduración en un fruto es un aspecto de gran interés ya que facilita el manejo postcosecha y determina el potencial de transformación agroindustrial. Durante la maduración, las frutas experimentan reacciones bioquímicas complejas que se evidencian en el desarrollo de las propiedades organolépticas características y en el cambio de composición. Con el objetivo de establecer el comportamiento del perfil aromático y de las propiedades antioxidantes de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) durante su maduración se evaluó en tres estados: verde, intermedio y cosecha el perfil aromático utilizando nariz electrónica, la capacidad antioxidante, y el contenido de antocianinas y fenoles totales. Los resultados muestran que el estado de cosecha se puede distinguir con la evaluación del perfil aromático y el contenido de antocianinas; en la mora verde el contenido de fenoles totales es apreciable respecto a los otros dos estados, y la capacidad antioxidante no presenta diferencias significativas entre las muestras evaluadas.

---

<sup>1</sup> Ingeniera Química. Estudiante Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos- Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá y Sede Medellín. [ljbernalr@unal.edu.co](mailto:ljbernalr@unal.edu.co)

<sup>2</sup> Ingeniera Química. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. [lamelot@unal.edu.co](mailto:lamelot@unal.edu.co)

<sup>3</sup> Ingeniera de Alimentos. PhD. Calidad, Seguridad y Tecnología de Alimentos, Profesora Asistente. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA. Universidad Nacional de Colombia [amcdiazmo@unal.edu.co](mailto:amcdiazmo@unal.edu.co)

\* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia: [ljbernalr@unal.edu.co](mailto:ljbernalr@unal.edu.co)

## ABSTRAC

Monitoring of the ripening process in fruit is an aspect of great interest as it facilitates the postharvest handling and determines the potential of agro-industrial processing. During maturation, fruits undergo complex biochemical reactions that are evident in the development of the characteristic sensory properties and the change in composition. In order to establish the behavior of the aromatic profile and antioxidant properties of castilla blackberry (*Rubus glaucus* Benth) during maturation, the fruit was evaluated in three states: green, intermediate and harvest, the aromatic profile using electronic nose, the antioxidant capacity and anthocyanin and total phenols content. The results show that the state of harvest can be distinguished by evaluation of aroma profile and content of anthocyanins, in the green blackberry the total phenol content is appreciable compared to the other two states, and the antioxidant capacity does not differ significantly between the evaluated samples.

**Palabras clave:** antocianinas totales, fenoles totales, TEAC, nariz electrónica, PCA.

## INTRODUCCIÓN

La mora es una fruta compuesta por drupas que se caracterizan por su color rojo y su aroma, es una buena fuente de vitaminas, minerales y fitonutrientes. En Colombia la especie más cultivada es la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) aunque no está claro su carácter climatérico [1] es cosechada cuando ha desarrollado su color rojo-morado

característico, es un producto de difícil manejo ya que es muy sensible a daños mecánicos. Además de las sustancias nutritivas que la componen esta fruta se encuentran metabolitos secundarios que le confieren características de aroma, color y sabor [2-3]. Algunos de los compuestos que hacen parte de este grupo de bioactivos son los flavonoides al cual pertenecen las

antocianinas, compuestos antioxidantes que tiene la capacidad de reducir a una sustancia pro-oxidante, aún estando en baja concentración y promover la formación de productos con baja toxicidad [4]. Los beneficios que se les atribuyen abarcan desde la protección del sistema circulatorio hasta la prevención de enfermedades neurodegenerativas y cáncer [2, 5].

Tradicionalmente los métodos empleados para establecer el grado de madurez en las frutas sacrifican la integridad del fruto, en ocasiones consumen gran cantidad de tiempo [6-7] y pueden resultar ambiguos respecto a los resultados del análisis sensorial, entre estos procedimientos se encuentran las pruebas de textura, concentración de sólidos solubles, determinación de pH y acidez, y técnicas más avanzadas de cromatografía para la identificación y cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos. Una técnica no destructiva con la que se pueden diferenciar los cambios en el perfil aromático durante la

maduración es la nariz electrónica, un dispositivo que a bajo costo por análisis describe el comportamiento del conjunto de sustancias químicas volátiles presentes en el fruto. En el país el uso de este equipo ha sido escaso, por lo que su aplicación representa una innovación en el análisis de frutas y vegetales.

El objetivo del trabajo consiste en establecer el comportamiento de la mora en tres estados de maduración desde la evaluación del perfil aromático, el contenido de antocianinas monoméricas, el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **MUESTRAS**

La mora de castilla fue recolectada en la vereda El Triunfo en el Municipio de Icononzo, Departamento de Tolima, Colombia. Se seleccionaron tres estados de

madurez, asociados al color, que se denominaron:

*Verde:* el fruto ha desarrollado todas sus drupas, en su superficie lidera el color verde con algunas drupas amarillas y rosadas.

*Intermedio:* el fruto ha desarrollado todas sus drupas, en su superficie lidera el color rosado con algunas drupas amarillas.

*Cosecha:* éste último corresponde al estado en que el agricultor recoge el producto para comercializarlo, la fruta ha desarrollado el color rojo intenso en toda la superficie.

## ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

- Humedad: método descrito en A.O.A.C. Official Method 977.21
- Sólidos Solubles: método descrito en A.O.A.C. Official Method 932.12
- pH y Acidez: método descrito en Norma Técnica Colombiana NTC 440 y A.O.A.C. Official Method 942.15.

## PERFIL AROMÁTICO

Se utilizó la nariz electrónica Airsense Analytics GmbH PEN3 – Schwein, Alemania, que cuenta con 10 sensores de óxido metálico semiconductor (MOS) que se muestran en la **Tabla 1**. Se pesaron 25g de muestra que se dejaron estabilizar en una cámara hermética a temperatura ambiente durante 5 min antes de la lectura que se realizó durante 150s con un flujo de cámara de 70ml/min y un flujo de inyección de 60ml/min.

## CARACTERÍSTICAS ANTIOXIDANTES

### EXTRACCIÓN COMPUESTOS

#### ANTIOXIDANTES

Para la extracción de los compuestos antioxidantes se utilizó etanol al 96% (Chemi) acidificado 1% con ácido acético [8]. A 20g de producto homogenizado se le agregaron 20ml de solución de extracción, se agitó durante un minuto en vortex y luego durante un tiempo prolongado en plancha de agitación magnética.

**Tabla 1.** Compuestos químicos a los que responde el arreglo de sensores de la Nariz

Electrónica Airsense

SENSOR	COMPUESTOS QUÍMICOS DETECTADOS
W1C	Compuestos aromáticos
W5S	Amplio rango de compuestos
W3C	Compuestos aromáticos. Amoniacos
W6S	Principalmente hidrógeno
W5C	Alcanos, compuestos aromáticos, compuestos Menos polares
W1S	Amplio rango, metano
W1W	Compuestos azufrados. Terpenos
W2S	Detecta alcoholes. Amplio rango
W2W	Compuestos aromáticos. Compuestos orgánicos

La mezcla se centrifugó durante 10 minutos (Centrífuga Tecnovetro 4235), este procedimiento se repitió dos veces más con el sólido obtenido y los extractos se llevaron a un volumen de 100ml con solución de extracción.

#### ANTOCIANINAS TOTALES

El análisis del contenido total de antocianinas monoméricas se realizó siguiendo el método propuesto en A.O.A.C. Official Method 2005.02 pH diferencial, los

resultados se reportan como mg de cy-3-glu/100g muestra fresca.

#### FENOLES TOTALES

Para la determinación del contenido de fenoles totales se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu (Panreac), método empleado por [9-10]. La longitud de onda de la lectura fue a 765nm y la cuantificación se realizó utilizando una curva de calibración de ácido caféico, Sigma Aldrich, ( $R^2=0,997$ ).

#### CAPACIDAD ANTIOXIDANTE-TEAC

El método empleado para la determinación de la capacidad antioxidante es el propuesto por [10-11]. La decoloración del radical se determinó a 734nm luego de 6min de reacción. La cuantificación se realizó con respecto a Trolox, (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) 97%, Sigma Aldrich, ( $R^2=0,999$ ), y se reporta como  $\mu\text{mol}$  de trolox/100g muestra fresca.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron por medio del ANOVA de una vía y la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ )

### Tabla 2

**Tabla 2** Propiedades fisicoquímicas de las muestras de mora evaluadas

	%Humedad $\pm$ SD	pH $\pm$ SD	% Ác málico $\pm$ SD	°Brix
<b>Verde</b>	81,9566 $\pm$ 1,6851	2,88 $\pm$ 0,03	2,53 $\pm$ 0,42	5
<b>Intermedio</b>	87,2981 $\pm$ 0,3400	2,76 $\pm$ 0,10	3,09 $\pm$ 0,06	6
<b>Cosecha</b>	88,3393 $\pm$ 1,8923	2,92 $\pm$ 0,15	1,86 $\pm$ 0,06	7

El comportamiento del conjunto de las muestras es el característico de cualquier fruta, la humedad, el pH y los °Brix aumentan con el tiempo de maduración y el porcentaje de acidez disminuye.

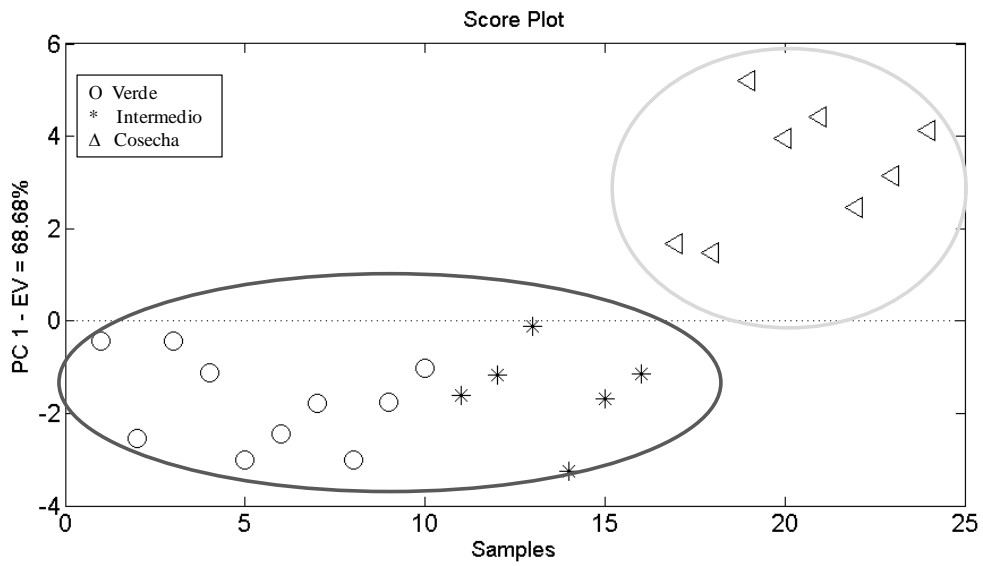
## PERFIL AROMÁTICO

El estado verde e intermedio de maduración se diferencian del estado de cosecha (ver **Figura 1**) por el grupo de volátiles que liberan, las respuestas de los sensores W1C, W5S, W3C y W5C que los describen (ver

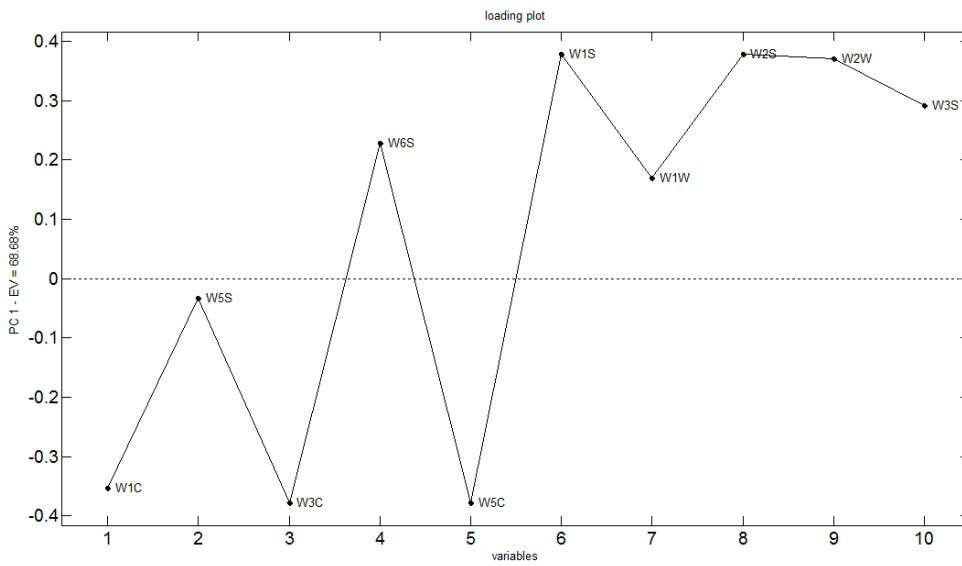
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las condiciones de humedad, acidez y contenido de sólidos solubles se presentan en la

**Figura 2**) se deben a compuestos aromáticos de baja polaridad que se pueden asociar a cadenas largas, mientras que los demás sensores responden a sustancias orgánicas de cadena corta (Ver **Tabla 1**); durante la maduración el metabolismo de las frutas simplifica las cadenas largas de almidones y de algunos ácidos orgánicos que dan origen a volátiles característicos, estudios del comportamiento en el género *Rubus sp.* han mostrado que se favorece la producción de alcoholes, aldehídos, ésteres y cetonas [1]



**Figura 1** Score Plot de los tres estados de maduración de mora



**Figura 2** Loading Plot de las variables de la nariz electrónica

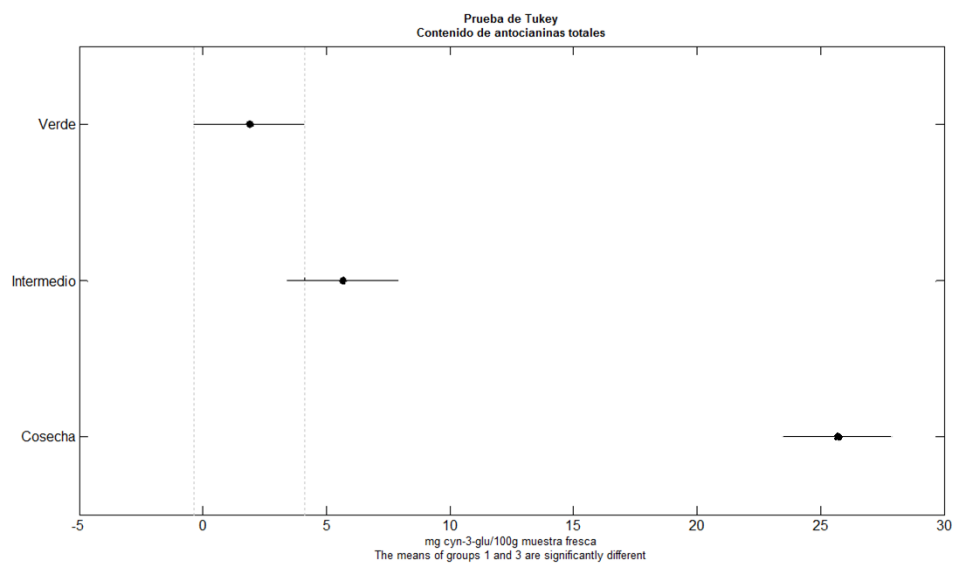
CONTENIDO DE  
ANTOCIANINAS TOTALES

Dentro de las características sensoriales de la  
mora el color juega un papel muy

importante, las responsables son las antocianinas, compuestos antioxidantes que se producen en las vacuolas de las células [8, 12] y se sintetizan durante la maduración [13]. En la **Figura 3** se puede ver que el contenido varía de 1,9 mg de cyn-3-glu a 25,7 mg de cyn-3-glu, un aumento significativo de casi 14 veces en el estado de cosecha.

En el género *Rubus sp.* se ha reportado la presencia de antocianinas como: cianidina-3-

glucosido, cianidina-3-arabinosa, cianidina-3-xylosa, peonidina-3-glucosido, cianidina-3-rutinosido, entre otros, sin embargo los datos muestran que el contenido de cyn-3-glu es superior [14-16]. Esta antocianina tiene sustituciones de grupos hidroxilo (OH) que hacen que dé totalidades rojas-púrpuras y absorba aproximadamente a una longitud de onda de 520nm [17].



**Figura 3** Prueba de Tukey para el contenido de antocianinas

durante la maduración de mora

#### CONTENIDO DE FENOLES TOTALES

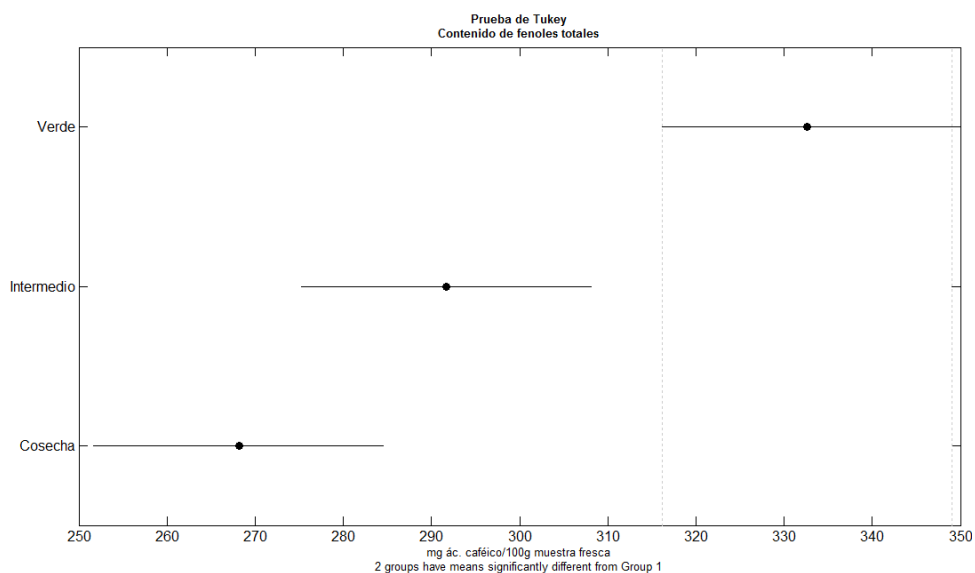
La síntesis de antocianinas consume algunos de los ácidos polifenólicos presentes



inicialmente en el fruto[13, 18] por lo que es de esperarse que el contenido de fenoles totales disminuya durante la maduración (ver **Figura 4**), este comportamiento es acorde al presentado por la mayoría de bayas como el arándano, la cereza y el agraz, que presentan un alto contenido de ácidos hidroxicinámicos y que durante la

maduración presentan cambios de composición [19-20].

Entre los estados de maduración intermedia y de cosecha no se presentan diferencias estadísticamente significativas, Acosta Montoya et al [21] reporta el mismo comportamiento en *Rubus adenotrichus* Schltdl.



**Figura 4.** Prueba de Tukey para el contenido de fenoles totales

durante la maduración de mora

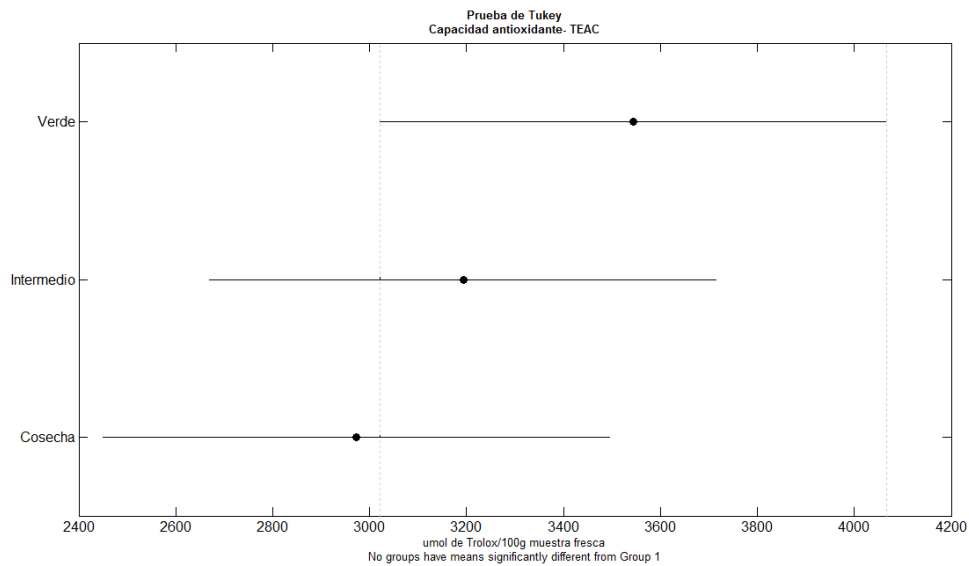
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE- TEAC

La **Figura 5** muestra que no se presentan cambios estadísticamente significativos del

poder antioxidante durante la maduración, aunque se sabe que los ácidos fenólicos y algunas vitaminas, como la vitamina C,

disminuyen durante este proceso [22-23] la formación de otras sustancias, en este caso antocianinas, compensan los cambios en la

capacidad antioxidante, sin embargo este comportamiento depende en gran medida de factores genéticos y ambientales [24].



**Figura 5.** Prueba de Tukey para la capacidad antioxidante medida por TEAC

durante la maduración de mora

## CONCLUSIONES

El comportamiento general de la Mora de Castilla concuerda con el de bayas como el arándano, fresa y agraz, donde la concentración de antocianinas, la humedad y la concentración de sólidos solubles incrementa durante el proceso de maduración del fruto y el contenido de compuestos fenólicos totales disminuye.

La nariz electrónica permite monitorear el proceso de maduración en un fruto, en la mora el perfil aromático en las etapas tempranas de maduración muestra predominancia de compuestos volátiles de carácter aromático poco polar, y en estados avanzados, presencia significativa de compuestos orgánicos aromáticos, así como de hidrógeno y gases de respiración.

## AGRADECIMIENTOS

Al equipo de trabajo de Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - ICTA, al Departamento de Ingeniería Química de la de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá y a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – CORPOICA.

## REFERENCIAS

1. PERKINS-VEAZIE, P., CLARK, J. R., HUBER, D. J., and BALDWIN, E. A. Ripening Physiology in ‘Navaho’ Thornless Blackberries: Color, Respiration, Ethylene Production, Softening, and Compositional Changes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125 (3), 2000, p. 357-363.
2. BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., and SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99 (1), 2006, p. 191-203.
3. SEERAM, N. P. (2006) Berries, In *Nutritional Oncology (Second Edition)* (David, H., George, L. B., Vay Liang, W. G., and John, M., Eds.), pp 615-628, Academic Press, Burlington.
4. MAGALHÃES, L. M., SEGUNDO, M. A., REIS, S., and LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613 (1), 2008, p. 1-19.
5. WANG, L.-S., and STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269 (2), 2008, p. 281-290.

6. BREZMES, J. (2001) Diseño de una Nariz Electrónica para la Determinación No Destructiva del Grado de Maduración de la Fruta., p 206, Universitat Politècnica de Catalunya, Catalunya, España.
7. QUICAZÁN, M., DÍAZ, A. C., and ZULUAGA, C. M. (2011) La nariz electrónica, una novedosa herramienta para el control de procesos y calidad en la industria agroalimentaria, pp 209-217, VITAE. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia.
8. CASTAÑEDA-OVANDO, A., PACHECO-HERNÁNDEZ, M. D. L., PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E., RODRÍGUEZ, J. A., and GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chemistry, 113 (4), 2009, p. 859-871.
9. OLIVEIRA, I., BAPTISTA, P., MALHEIRO, R., CASAL, S., BENTO, A., and PEREIRA, J. A. Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. Food Research International, 44 (5), 2011, p. 1401-1407.
10. VASCO, C., RUALES, J., and KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. Food Chemistry, 111 (4), 2008, p. 816-823.
11. ANTONIA MURCIA, M., JIMÉNEZ, A. M., and MARTÍNEZ-TOMÉ, M. Vegetables antioxidant losses during industrial processing and refrigerated storage. Food Research International, 42 (8), 2009, p. 1046-1052.
12. GOULD, K., DAVIES, K., and WINEFIELD, C. Anthocyanins

- Biosynthesis, Functions, and Applications, New York: Springer New York, 2009, p.
13. MARTÍNEZ FLÓREZ, S., GONZÁLEZ GALLEGO, J., CULEBRAS, J. M., and TUÑÓN, M. J. Los Flavonoides: Propiedades y Acciones Antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, XVII (6), 2002, p. 271-278.
  14. WKOCA, I., and KARADENIZ, B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 121 (4), 2009, p. 447-450.
  15. DAI, J., GUPTA, A., GATES, L., and MUMPER, R. J. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (4), 2009, p. 837-847.
  16. GANCEL, A.-L., FENEUIL, A., ACOSTA, O., PÉREZ, A. M., and VAILLANT, F. Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Research International*, In Press, Corrected Proof.
  17. NOBEL, P. S. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*, Fourth edition ed., Los Angeles, CA: University of California, 2009, p.
  18. PIETTA, P., MINOGGIO, M., and BRAMATI, L. (2003) Plant polyphenols: Structure, occurrence and bioactivity, In *Studies in Natural Products Chemistry* (Atta-ur, R., Ed.), pp 257-312, Elsevier.
  19. CASTREJÓN, A. D. R., EICHHOLZ, I., ROHN, S., KROH, L. W., and HUYSKENS-KEIL, S.

- Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, 109 (3), 2008, p. 564-572.
20. GONÇALVES, B., SILVA, A. P., MOUTINHO-PEREIRA, J., BACELAR, E., ROSA, E., and MEYER, A. S. Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, 103 (3), 2007, p. 976-984.
21. ACOSTA-MONTOYA, Ó., VAILLANT, F., COZZANO, S., MERTZ, C., PÉREZ, A. M., and CASTRO, M. V. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltld.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*, 119 (4), 2010, p. 1497-1501.
22. TLILI, I., HDIDER, C., LENUCCI, M. S., ILAHY, R., JEBARI, H., and DALESSANDRO, G. Bioactive compounds and antioxidant activities during fruit ripening of watermelon cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (7), 2011, p. 923-928.
23. WOODS, F. M., DOZIER JR, W. A., EBEL, R. C., THOMAS, R. H., NESBITT, M., WILKINS, B. S., and HIMELRICK, D. G. Fruit Quality and Antioxidant Properties in Alabama-Grown Blackberries During Fruit Maturation. *International Journal of Fruit Science*, 6 (3), 2006, p. 67-85.
24. VICENTE, A., MANGANARIS, G. A., SOZZI, G., and CRISTOSO, C. (2009) Nutritional Quality of Fruits and Vegetables, In *Postharvest*

*Handling: A Systems Approach* (Inc.,  
E., Ed.), pp 61, 77.

## **5.4 Influencia de los tratamientos térmicos sobre la capacidad antioxidante de espinaca (*Spinacea oleracea*)**

II Conferencia Internacional en Manejo Poscosecha y Calidad de Productos Hortícolas de Interés en el Trópico. 2011



INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS SOBRE LA CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE ESPINACA (*Spinacea oleracea*)

INFLUENCE OF HEATING PROCESSES IN ANTIOXIDANT CAPACITY OF SPINACH  
(*Spinacia oleracea*)

Juan F. ROMERO R.<sup>1\*</sup>, Luisa J. BERNAL R.<sup>2</sup>, Consuelo Díaz–Moreno<sup>3</sup>

**RESUMEN**

La espinaca (*Spinacea oleracea*) es una hortaliza que se destaca por el contenido de sustancias antioxidantes, se ha encontrado que estas contribuyen en la protección contra la mutagénesis, la carcinogénesis y el envejecimiento. Sin embargo por conservación, inocuidad y aspectos sensoriales la hortaliza es usualmente sometida a procesos térmicos que pueden afectar el contenido de estas sustancias. Para evaluar los posibles efectos del procesamiento en el contenido de compuestos antioxidantes se sometió una muestra comercial a operaciones térmicas comunes: escaldado y pasteurizado, en cada etapa se analizó el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante total por los métodos TEAC y FRAP. El estudio señala diferencias entre las operaciones térmicas evaluadas, el escaldado no altera significativamente las propiedades antioxidantes y la pasteurización aumenta los valores tanto de capacidad antioxidante como el contenido de fenoles totales.

**Palabras clave:** hortaliza, escaldado, pasteurización, TEAC, FRAP, Folin-Ciocalteu

---

<sup>1</sup> Ingeniero Químico. Universidad Nacional de Colombia. [jfromeror@unal.edu.co](mailto:jfromeror@unal.edu.co)

<sup>2</sup> Ingeniera Química. Estudiante Maestría Ciencia y Tecnología de Alimentos - Sede Medellín. Universidad Nacional de Colombia. [ljbernalr@unal.edu.co](mailto:ljbernalr@unal.edu.co)

<sup>3</sup> Ingeniera de Alimentos. PhD. Calidad, Seguridad y Tecnología de Alimentos, Profesora Asistente. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA. Universidad Nacional de Colombia [amcdiazmo@unal.edu.co](mailto:amcdiazmo@unal.edu.co)

\* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia: [jfromeror@unal.edu.co](mailto:jfromeror@unal.edu.co)

## ABSTRACT

Spinach (*Spinacea oleracea*) is noted by the substantial content of antioxidants; it has been found that these substances contribute to the protection against mutagenesis, carcinogenesis and aging. However, due to conservation, safety and sensory aspects, spinach is usually submitted to thermal processes that can affect its composition. In order to evaluate the possible effects of processing, a commercial sample of spinach was submitted to common thermal operations: blanching and pasteurization. Total phenols content and total antioxidant capacity were analyzed at each stage by TEAC and FRAP methods. It was found differences among the evaluated thermal operations, blanching did not significantly alter the antioxidant properties and pasteurization increased the values of both antioxidant capacity and total phenols content.

**Keywords:** blanching, pasteurization, TEAC, FRAP, Folin-Ciocalteu

## INTRODUCCIÓN

La espinaca (*Spinacea oleracea*) es una hortaliza destacada por su contenido de antioxidantes [1], la principal función de éstos es contribuir en la protección del organismo de daños como la mutagénesis, carcinogénesis y el envejecimiento; causados por las especies reactivas de oxígeno[2] [3]. Es usual que la espinaca sea sometida a procesos térmicos a fin de

conservarla y asegurar su inocuidad. Estas operaciones se destacan por estar entre las que afectan en mayor proporción el contenido de compuestos antioxidantes, generar cambios en la composición química del vegetal y en la disponibilidad bioquímica [4]. Mazzeo et al [3] y Hunter y Fletcher [5] reportan que los tratamientos con vapor ocasionan un aumento y significativo de la capacidad antioxidante total. El cambio observado en el estudio de Mazzeo et al [3]

fue justificado por la alteración en los carotenoides y polifenoles. Por otro lado, el proceso con vapor determinó un aumento del valor de la actividad antioxidante total de la espinaca, acorde a los resultados obtenidos por Turkmen et al [4].

Considerando la importancia y la escasez de información disponible sobre los efectos de los tratamientos térmicos en este vegetal, el propósito del trabajo es evaluar la influencia de dos operaciones térmicas comunes: escaldado y pasteurización, sobre la capacidad antioxidante total y el contenido de fenoles totales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestra y Procesamiento**

La muestra fresca se adquirió en un mercado local, fue despojada de la raíz, lavada con agua del grifo y desinfectada con solución de hipoclorito de sodio (200 ppm). Posteriormente se escaldó con vapor durante

3min y luego se realizó un choque térmico. Parte de la muestra escaldada fue pasteurizada a 75°C durante 13min en un recipiente de acero inoxidable cerrado, el vegetal fue empacado en caliente y luego se sumergió en agua fría.

### **Materia seca**

Se aplicó la metodología descrita en A.O.A.C. Official Method 977.21

### **Obtención y preparación de extractos**

La extracción se realizó en tres etapas con 20 ml de etanol al 96%, se centrifugó y en cada oportunidad el sobrenadante fue filtrado y recolectado para llevar finalmente a un volumen de 100ml.

### **Capacidad antioxidante total**

Las propiedades antioxidantes fueron evaluadas en el producto fresco, escaldado y pasteurizado. El método para la determinación de la capacidad antioxidante es el propuesto por [6-7]. La decoloración

del radical se determinó a 734nm luego de 6min de reacción. La cuantificación se realizó con respecto a Trolox, (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) 97%, Sigma Aldrich, ( $R^2=0,999$ ).

Para la determinación de la capacidad antioxidante por FRAP se empleó el método propuesto por [8-10] en el que 330µl de extracto se mezclaron con 10ml de una solución elaborada a partir de buffer acetato pH 3,6 (300nM), TPTZ diluido en HCl (40 mM) y FeCl<sub>3</sub> (20 mM) en relación 10:1:1 respectivamente. La reacción se llevó a cabo por 1 hora y la lectura se realizó a 593nm. Los resultados se reportan según curva de calibración de trolox ( $R^2=0,996$ ).

### Fenoles Totales

El contenido fenólico total fue determinado de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu [11]. Los resultados se reportaron en mg de

ácido caféico por 100 gramos de materia seca.

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante la ejecución de ANOVA y la prueba de Tukey con 95% de confianza ( $p \leq 0,05$ ) para determinar diferencias significativas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Capacidad antioxidante

El efecto de los procesos térmicos sobre la capacidad antioxidante total de la espinaca según TEAC y FRAP se reporta en la tabla 1.

**Tabla 1. Valores de TEAC en espinaca fresca y procesada**

Tratamiento	(µmol Trolox/ g materia Seca) ± SE*	
	TEAC	FRAP
Fresca	14,348±0,144a	19,873±0,306a
Escaldado	14,464±0,132a	20,169±0,174b
Pasteurización	23,926±0,710b	28,899±0,385b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ ,  $SE^* =$

Error estándar

Los resultados indican que los procesos térmicos benefician la capacidad antioxidante total con un aumento significativo en la pasteurización. Este incremento, según explica Nicoli [12] y Mazocco [13], se presenta debido a la formación de productos de alta actividad antioxidante por las reacciones de Maillard (MRP) donde pequeñas cantidades producto de las reacciones implican cambios significativos en las características antioxidantes [14]; sin embargo la literatura no es contundente en relación al efecto de dichas sustancias en el organismo, incluso autores reportan propiedades mutágenicas de los MRP [12].

### Fenoles totales

La influencia del escaldado y la pasteurización sobre el contenido fenólico se presenta en la tabla 2.

**Tabla 2. Contenido fenólico en espinaca fresca y procesada**

Tratamiento	(mg A. Cafeico/100 g materia Seca) $\pm SE^*$
Fresca	555,221 $\pm$ 7,076a
Escaldado	576,379 $\pm$ 7,290a
Pasteurización	755,235 $\pm$ 11,510b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ ,  $SE^* =$

Error estándar

Los valores obtenidos señalan un incremento en el contenido de fenoles en concordancia con lo obtenido en FRAP y TEAC.

El aumento de los compuestos fenólicos durante los tratamientos térmicos es atribuible al debilitamiento o ruptura de las paredes celulares vegetales que favorecen la disponibilidad de los compuestos [15] al igual que la inactivación de la enzima polifenol oxidasa [16].

## CONCLUSIONES

Los tratamientos térmicos evaluados incrementan las propiedades antioxidantes en esta matriz vegetal, siendo favorables para potencializar su capacidad antioxidante.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - ICTA y al Programa de Semilleros de creación e investigación de la Dirección de Investigación - DIB de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

## REFERENCIAS

1. ISMAIL, A., MARJAN, Z. M., and FOONG, C. W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87 (4), 2004, p. 581-586.
2. BERGMAN, M. The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. *Phytochemistry*, (58), 2001, p. 143 - 152.
3. MAZZEO, T. Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables. *Food Chemistry*, 128 2011, p. 627-634.
4. TURKMEN, SARI, and VELIOGLU. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, 2005, p. 5.
5. HUNTER, K. J., and FLETCHER, J. M. The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred and canned vegetables. *Innovation Food Science and Emerging Technologies*, 3 2002, p. 8.
6. VASCO, C., RUALES, J., and KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from

- Ecuador. *Food Chemistry*, 111 (4), 2008, p. 816-823.
7. ANTONIA MURCIA, M., JIMÉNEZ, A. M., and MARTÍNEZ-TOMÉ, M. Vegetables antioxidant losses during industrial processing and refrigerated storage. *Food Research International*, 42 (8), 2009, p. 1046-1052.
  8. GORINSTEIN, S., JASTRZEBSKI, Z., LEONTOWICZ, H., LEONTOWICZ, M., NAMIESNIK, J., NAJMAN, K., PARK, Y.-S., HEO, B.-G., CHO, J.-Y., and BAE, J.-H. Comparative control of the bioactivity of some frequently consumed vegetables subjected to different processing conditions. *Food Control*, 20 (4), 2009, p. 407-413.
  9. MÜLLER, L., GNOYKE, S., POPKEN, A. M., and BÖHM, V. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 43 (6), 2010, p. 992-999.
  10. WKOCA, I., and KARADENIZ, B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 121 (4), 2009, p. 447-450.
  11. KÄHKÖNEN, M. P., HOPIA, A. I., VUORELA, H. J., RAUHA, J.-P., PIHLAJA, K., KUJALA, T. S., and HEINONEN, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (10), 1999, p. 3954-3962.
  12. NICOLI, M. C., ANESE, M., and PARPINEL, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 10 (3), 1999, p. 94-100.
  13. MANZOCCO, L., ANESE, M., and NICOLI, M. C. Antioxidant

- Properties of Tea Extracts as Affected by Processing. *LWT - Food Science and Technology*, 31 (7-8), 1998, p. 694-698.
- Journal of Food Science, 44 (1), 1979, p. 82-83.
14. ROCA, B. (2009) Propiedades Antioxidantes de los Productos de la Reacción de Maillard y su Influencia en la Absorción de Hierro y Cobre. Relación con la Capacidad Quelante de Metales, In *Departamento de Fisiología*, p 421, Universidad de Granada, Granada.
  15. SULTANA, B., ANWAR, F., and IQBAL, S. Effect of different cooking methods on the antioxidant activity of some vegetables from Pakistan. *International Journal of Food Science and Technology*, (43), 2008, p. 560-567.
  16. LEE, C. Y., and SMITH, N. L. BLANCHING EFFECT ON POLYPHENOL OXIDASE ACTIVITY IN TABLE BEETS.



## **5.5 Evaluación de las condiciones de proceso y capacidad antioxidante en la elaboración de productos hortofrutícolas**

Jóvenes Investigadores e Innovadores, Virginia Vallejo 2009. COLCIENCIAS

## RESUMEN

---

*Palabras claves: Capacidad Antioxidante, Procesamiento Hortalizas y Frutas, Fenoles Totales, TEAC, DPPH.*

Los cambios que un alimento sufre en su contenido de sustancias bioactivas debido a las operaciones de transformación a las se somete para lograr las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales deseadas, son difícilmente predecibles y generalizables, dependen de la naturaleza de la matriz, la intensidad del tratamiento, la concentración de oxígeno, el tiempo, la presencia de luz, entre otras. En este escenario, y teniendo en cuenta que el consumo de compuestos antioxidantes se asocia la prevención de ciertas enfermedades cancerígenas y degenerativas, se planteó como objetivo del trabajo evaluar si un proceso estándar de obtención de pulpa alteraba el contenido de compuestos antioxidantes en diferentes productos hortofrutícolas.

El análisis se realizó en muestras comerciales de agraz, feijoa, fresa, lulo, mango, maracuyá, mora, uva, espinaca, remolacha y zanahoria; se evaluó el contenido de fenoles totales (FT) por el método de Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante de las frutas por los métodos analíticos de transferencia de electrones TEAC y DPPH (radicales libres no biológicos). Dado que el proceso de obtención de pulpa es dependiente de la matriz, en el mango, lulo y feijoa se evaluaron 5 etapas: fruta fresca, despulpada, mezcla con aditivos, pasterización y congelación; en el maracuyá, la fresa y uva, no hay etapa de mezcla, por lo tanto solo fueron 4 las etapas muestreadas. Por último en el agraz, la mora y las 3 hortalizas se analizaron 4 puntos del proceso: producto fresco, escaldado (exceptuando esta etapa que no se realiza en la mora), homogenizado y pasterizado. Las tres frutas frescas que presentaron un contenido mayor de FT fueron agraz (5.14mg ác. Caféico/g muestra), feijoa (3.66 mg ác. Caféico/g muestra) y mora (2.38 mg ác. Caféico/g muestra); así mismo sus valores de capacidad antioxidante fueron los más altos. El menor contenido de FT del producto fresco se encontró en mango (0.38 mg ác. Caféico/g muestra), uva (0.48 mg ác. Caféico/g muestra) y maracuyá (0.72 mg ác. Caféico/g muestra), en éste caso la capacidad antioxidante medida por DPPH muestra la misma tendencia de los FT y se observa una diferencia del TEAC donde los valores menores fueron los presentados por el mango, maracuyá y lulo. En las hortalizas el contenido compuestos FT es comparable con los valores menores reportados en las frutas, la espinaca es la hortaliza con un mayor contenido de FT seguida de la remolacha y la zanahoria. Según los resultados se puede concluir que el proceso afecta el comportamiento de la capacidad antioxidante y que éste depende de la matriz.

Una vez caracterizado cada producto a lo largo del proceso y partiendo del bajo contenido de antioxidantes encontrado en las hortalizas se plantearon diferentes proporciones de mezcla hortaliza-fruta: espinaca-lulo-feijoa (verde), zanahoria-maracuyá-mango (amarillo) y remolacha-uva-mora (rojo) cada grupo se mezcló en diferentes proporciones: partes iguales hortaliza-fruta (1); 10%-60%-30% (2) y 20%-50%-30% (3); el grupo de mezclas con mayor capacidad antioxidante fue el verde, dentro de éste se presentan diferencias significativas entre 2 y 3 con 1(menor capacidad antioxidante), siendo la proporción 3 sensorialmente la más aceptada.



## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

Se evaluó el contenido de vitamina C, el contenido de antocianinas y fenoles totales y la capacidad antioxidante durante el proceso de maduración de mora (*Rubus glaucus* Benth) encontrando que el contenido de vitamina C presenta un aumento no significativo del estado verde al estado intermedio de maduración para luego permanecer constante. El incremento del contenido de antocianinas se hace evidente en el estado de cosecha. El contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante medida por el método FRAP disminuyen durante la maduración y la capacidad antioxidante por el método TEAC permanece constante. Todos estos comportamientos están asociados a la naturaleza de la fruta, a los cambios bioquímicos que sufre y las condiciones ambientales en las que se desarrolla el fruto.

Se evaluó el contenido de vitamina C, de antocianinas y fenoles totales y la capacidad antioxidante durante el proceso de maduración de un fruto silvestre de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) y se encontró que el contenido de vitamina C permanece constante durante la maduración mientras que el contenido de antocianinas totales y fenoles totales junto con la capacidad antioxidante aumentan del estado verde al estado de cosecha, haciendo de este fruto una buena fuente de antioxidantes.

Durante la maduración de mora y agraz se evaluó el perfil aromático por medio de una nariz electrónica que permitió encontrar diferencias entre el estado de cosecha de cada una de las frutas.

El estado de maduración de cosecha de mora y agraz puede diferenciarse a partir del contenido de antocianinas, la capacidad antioxidante y el perfil aromático.

Las propiedades antioxidantes se ven afectadas por las operaciones de transformación a las que se somete la mora y el agraz, el comportamiento depende de la naturaleza de la muestra.

Las operaciones de despulpado y concentrado tienen efectos sobre las propiedades bioactivas de la mora, el despulpado favorece la disponibilidad de sustancias que luego en la concentración van a sufrir una degradación.

Las operaciones de despulpado y concentrado del agraz tienen efectos desfavorables sobre las propiedades bioactivas, sin embargo no deja de ser un fruto y una materia prima atractiva por sus altos contenidos de antioxidantes.


La liofilización de las frutas no arrojó resultados concluyentes, se recomienda realizar un control más riguroso del proceso que permita establecer los efectos de éste sobre las propiedades bioactivas.

## 6.2 Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios sobre cultivos no silvestres de agraz que permitan establecer el comportamiento bajo condiciones controladas de producción.

Se recomienda realizar la evaluación de las propiedades bioactivas en frutas de origen diferente al evaluado.

**A. Anexo: Procedimiento para la extracción de compuestos antioxidantes hidrosolubles con Ultraturrax**

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES HIDROSOLUBLES CON ULTRATURRAX</b>	Página 1 de 6

## 1. OBJETIVO

Describir el procedimiento para extracción etanólica de polifenoles y antocianinas en frutos y hortalizas utilizando el equipo de homogenización UltraTurrax.

## 2. ALCANCE

El documento está dirigido únicamente al personal capacitado en el manejo del Ultraturrax e interesado en el proceso de extracción de compuestos fenólicos y antocianinas en productos de origen vegetal, tales como frutos y hortalizas, el resultado será un extracto que permitirá un posterior análisis cuantitativo.

## 3. DEFINICIONES


**Capacidad antioxidante:** Los antioxidantes son compuestos que retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de las reacciones oxidantes en cadenas. Los antioxidantes naturales constituyen una amplia gama de sustancias que incluyen los compuestos fenólicos, nitrogenados y carotenoides, además el ácido ascórbico contribuye de forma significativa a ésta propiedad. La principal función de los antioxidantes es ayudar a la protección del organismo de los daños causados por las especies reactivas del oxígeno (Bergman, 2001). Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que dan inicio a reacciones que afectan las células. Los antioxidantes inhiben estas reacciones retirando intermedios del radical libre u oxidándose. Variadas funciones biológicas, como la protección contra la mutagénesis, la carcinogénesis y el envejecimiento, entre otros, son debido a los efectos antioxidantes [1]

**Polifenoles:** Los compuestos fenólicos o polifenólicos constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, consideradas fitoquímicos, que cumplen funciones fisiológicas. Su estructura más frecuente es la de polímeros o ligninas insolubles. La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuesto que se trate, situándose en el interior de las células (vacuolas) o en la pared celular. Sus principales funciones consisten en actuar como metabolitos esenciales en el crecimiento y la reproducción de las plantas, además son reconocidos como agentes protectores frente a la acción de patógenos y se sintetizan como parte del mecanismo de defensa [2]. Los compuestos polifenólicos son los principales compuestos hidrosolubles contribuyentes a la capacidad antioxidante de las frutas. La actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos ha sido asociada a sus características químicas estructurales como la habilidad de donar protones del radical hidroxilo fenólico, la capacidad de deslocalizar y estabilizar electrones desapareados por resonancia en el anillo aromático, el bajo potencial de oxidación, la alta capacidad de quelación y la interacción con otras moléculas fácilmente oxidables [3]

**Antocianinas:** Las antocianinas son pigmentos que dan el color rojo, violeta y azul a la mayoría de frutas, con excepción de productos como el tomate y la pimienta roja donde el color es debido a los carotenoides. En los frutos rojos y en especial en numerosas bayas de pequeño tamaño, el contenido de antocianinas es determinante durante el proceso de maduración. La acumulación de estos compuestos en la pulpa y en la cáscara del fruto permite la sustitución del color verde inicial por el rojo o violeta [4]. El color es un atributo de calidad importante en la mayoría de las frutas y vegetales, así como de sus productos derivados. Los colores de muchas plantas se deben a la presencia de antocianinas. Un análisis detallado tanto en el fruto como en el producto final (jugos, mermeladas, conservas, etc) permitiría determinar si existe algún tipo de adulteración e incluso la posibilidad de usarlas como colorantes naturales en la industria alimenticia [5]

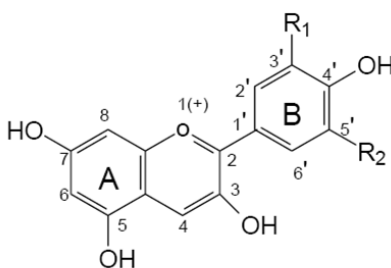
### Estructura

Las antocianinas son glucósidos hidrosolubles de antocianidinas, hacen parte del grupo de compuestos fenólicos conocidos como flavonoides que se caracterizan por tener un anillo-A benzoiil y un anillo-B hidroxicinamoil [6]. La estructura básica de la antocianina es el 2-fenilbenzopirilio de la sal de flavilio. Cuando el residuo de azúcar es hidrolizado el resultado es la

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:	
			Versión: 1.0
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES HIDROSOLUBLES CON ULTRATURRAX</b>		Página 2 de 6

aglicona, conocida como antocianidina. Las más comunes formas de antocianidinas son: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, malvidina y petunidina (ver Figura 1). Las clases comunes de glucósidos son: 3-monósido, 3-biósido y 3-triósido, así como también 3,5-diglicósido y más raramente el 3,7-diglicósido con glucosa, galactosa, arabinosa (uno de los más frecuentes) y xilosa. Las antocianinas poseen uniones con el azúcar en el anillo-B 3' y 5'-hidroxilos. Los dos tipos más importantes de glucósidos son: el 3-monósidos y el 3-4 diglicósido. Como regla el 3-hidroxil siempre tiene un azúcar, exceptuando 3 desoxipelargonidina, 3-desoxicianidina y 3-desoxidelfina [7-8]

Además de la glucosilación, la introducción de moléculas aciladas es un efecto que ocurre ampliamente. Los compuestos acilados más comunes son los ácidos aromáticos hidroxicinámicos como el p-coumárico, cafeico, ferúlico e hidroxibenzoico (Vaccari et al. 1982). El color particular de cada antocianina depende del número y orientación de los grupos hidroxilos y metoxilos. Un incremento en la hidroxilación produce un color azul, mientras un incremento en la metoxilación produce un color rojo.




Aglicona	Substitución		$\lambda_{max}$ (nm)
	R1	R2	Espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	510 (azul-rojo)

Figura 1. Estructura y sustituyentes de las antocianinas [7]

### Efecto del pH

Las antocianinas son más estables en medios ácidos que en medios neutros o alcalinos. En medio ácido la forma predominante es la del ión flavilio donde da un color rojo. Cuando ésta es sometida a pH básico o alcalino, el ión flavilio es susceptible al ataque nucleofílico por parte del agua, produciéndose la pseudobase carbinol, esto es a pH 4.5 y seguido se forma la chalcona, como se puede observar en la Figura 2. Las dos formas son incoloras [9]. Por lo tanto, puede decirse que las antocianinas tienen su máxima expresión de color a pH ácidos (pH 1.0), característica que es de gran utilidad cuando son empleadas en la industria alimenticia.



 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES HIDROSOLUBLES CON ULTRATURRAX</b>	Página 3 de 6

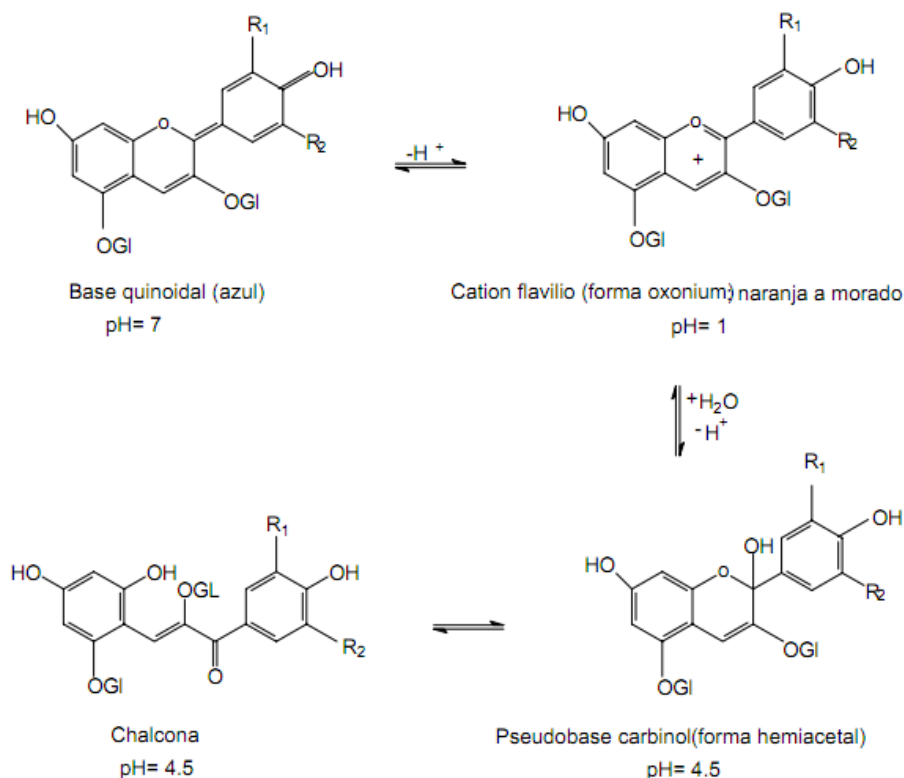



Figura 2. Estructura de la antocianina a diferentes pH.  
[9]

#### 4. NOTAS DE SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES GENERALES

- Es necesario el uso de implementos de seguridad como bata, gafas de protección y guantes en todas las actividades mencionadas en el procedimiento.
- Antes de encender el equipo de homogeneización se debe asegurar que el nivel de líquido supere la muesca del brazo para garantizar su adecuada lubricación. El equipo jamás debe operarse en seco.
- Realice una inspección de la limpieza de los dientes del equipo para evitar contaminación de las muestras.
- El Ultraturrax siempre debe inicializarse en la menor velocidad e ir aumentando progresivamente hasta el punto deseado.
- La limpieza del equipo se debe hacer con agua destilada, seleccionando bajas velocidades de operación.
- La manipulación y adecuación deben hacerse cuando el equipo se encuentre apagado.
- Se deben acatar las normas de seguridad propuestas por el laboratorio.
- Se debe mantener cerrados los recipientes dispuestos para el almacenamiento de los solventes.
- La manipulación adecuada de los equipos garantiza seguridad para quienes los operen.

#### 5. PRINCIPIO DE LA TECNICA

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES HIDROSOLUBLES CON ULTRATURRAX</b>	Versión: 1.0
		Página 4 de 6

La extracción se fundamenta en la alta solubilidad de los polifenoles en etanol concentrado. Este solvente es apropiado para hortalizas y frutas donde no predomina el contenido de antocianinas como principal antioxidante. En el caso de los frutos rojos las antocianinas a pH mayor de 7 pasan a su forma quinoidal degradándose rápidamente por oxidación con el aire [5], este problema se soluciona con la acidificación del etanol empleado para la extracción, de esta forma las antocianinas se mantienen en su forma estable en el extracto obtenido.

## 6. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

El procedimiento es ideal para frutas y hortalizas blandas. Si la muestra es de gran tamaño debe ser troceada o parcialmente triturada antes de realizar la homogeneización en el Ultraturrax. Si la fruta presenta semillas muy duras y grandes éstas se deben retirar.

## 7. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

### Equipos

- Homogeneizador Ultraturrax
- Equipo de Ultrasonido
- Centrifuga
- Vortex
- Balanza Analítica

### Materiales


- Vasos de precipitados de 100 ml o frascos pequeños tipo mayonesa.
- Balones aforados de 100 ml
- Embudos
- Papel filtro
- Tubos Falcon
- Pipetas Pasteur

### Reactivos

- Etanol 96% (para extracción de polifenoles en hortalizas)
- Etanol acidificado con ácido acético 1% (para extracción de antocianinas en frutos)

## 8. PROCEDIMIENTO

- Pesar 20 g de muestra en un vaso de 100 ml o en frasco pequeño tipo mayonesa.
- Agregar 20 ml de solución de extracción.
- Homogeneizar en Ultraturrax a velocidad 4.
- Sonicar por 10 min.
- Centrifugar durante 10 min a 4500 rpm.
- Filtrar el sobrenadante en un balón aforado de 100 ml. Añadir al sólido 20 ml de solución de extracción y agitar durante 1 min en el vortex.
- Repetir los pasos 4 y 5.
- Filtrar el sobrenadante sobre el mismo balón aforado indicado en el punto 6. Añadir nuevamente 20 mL de solución de extracción y agitar durante 1 min en el vortex.
- Repetir los pasos 4 y 5.
- Filtrar el sobrenadante en el balón aforado indicado en el punto 6.
- Lavar el sólido con una pequeña cantidad de solución de extracción y filtrar en el balón aforado de 100 ml.
- Lavar el papel filtro con solución de extracción.
- Llevar a volumen con la solución de extracción.

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES HIDROSOLUBLES CON ULTRATURRAX</b>	Página 5 de 6

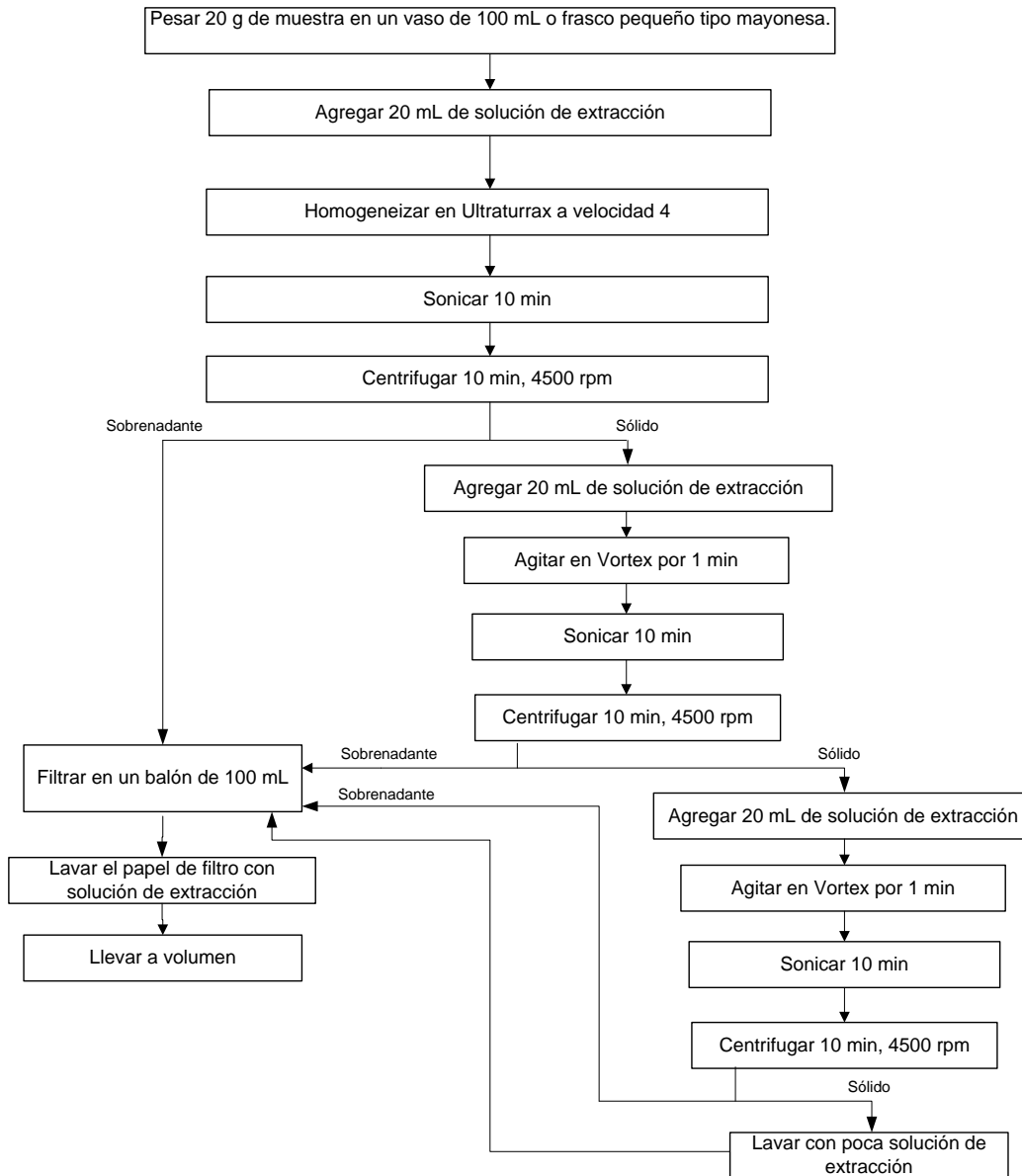
## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Mazzeo, T., et al., *Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables*. Food Chemistry, 2011. **128**(3): p. 627-633.
2. Çelik, H., et al., *Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit*. Scientia Horticulturae, 2008. **117**(4): p. 345-348.
3. Rice-Evans, C., N. Miller, and G. Paganga, *Antioxidant properties of phenolic compounds*. Trends in Plant Science, 1997. **2**(4): p. 152-159.
4. de la Rosa, L., E. Alvarez Parrilla, and G.A. González Aguilar, *Fruit and Vegetable Phytochemicals, Chemistry, Nutritional Value and Stability*. 2010, Singapore, India: Wiley Blackwell.
5. Garzón, G.A., *Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión*. Acta Biológica Colombia, 2008. **13**(3): p. 27-36.
6. Kong, J.-M., et al., *Analysis and biological activities of anthocyanins*. Phytochemistry, 2003. **64**(5): p. 923-933.
7. Castañeda-Ovando, A., et al., *Chemical studies of anthocyanins: A review*. Food Chemistry, 2009. **113**(4): p. 859-871.
8. Gould, K., K. Davies, and C. Winefield, *Anthocyanins Biosynthesis, Functions, and Applications*. 2009, New York: Springer New York.
9. Garzón, G.A., et al., *Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (Vaccinium meridionale Swartz) from Colombia*. Food Chemistry, 2010. **122**(4): p. 980-986.




**NEXO**

**PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN  
TRES ETAPAS**





**B. Anexo: Determinación de capacidad antioxidante total en frutas y hortalizas con el método FRAP**

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO FRAP EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Página 1 de 8

## 1. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la cuantificación de la actividad antioxidante total con el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

## 2. ALCANCE

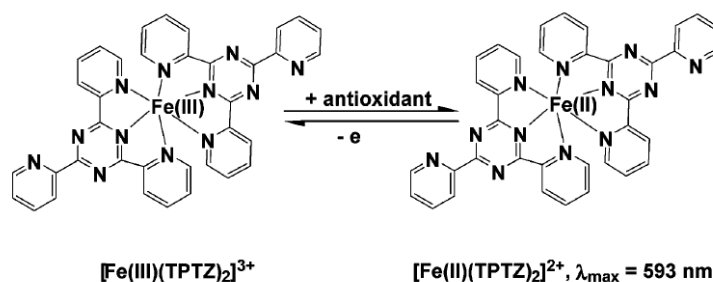
El método aplica para la determinación de la capacidad antioxidante de extractos polares (etanólicos) de frutas y hortalizas.

## 3. DEFINICIONES


**Capacidad antioxidante:** Los antioxidantes son compuestos que retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición las reacciones de oxidación en cadena. Los antioxidantes naturales constituyen una amplia gama de sustancias que incluyen los compuestos fenólicos, nitrogenados y carotenoides, además el ácido ascórbico contribuye de forma significativa a ésta propiedad. La principal función de los antioxidantes es ayudar a la protección del organismo de los daños causados por las especies reactivas del oxígeno [1]. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que dan inicio a reacciones que afectan las células, los antioxidantes inhiben estas reacciones retirando intermedios del radical libre. Variadas funciones biológicas, como la protección contra la mutagénesis, la carcinogénesis y el envejecimiento, entre otros, son debido a los efectos antioxidantes [2].

## 4. PRINCIPIO DE LA TÉCNICA

A bajos pH, cuando el complejo ferrico – trpidiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) es reducido a la forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) se desarrolla un intenso color azul con absorción máxima a 593 nm (ver Figura No. 1). El método FRAP determina la capacidad de un compuesto antioxidante de transferir un electrón al  $\text{Fe}^{3+}$  y reducirlo a la especie  $\text{Fe}^{2+}$ , ocasionando la aparición del compuesto coloreado [3] [4]. Debido a que el complejo  $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$  tiene un potencial de reducción muy bajo el método tiene baja especificidad y es de esperarse valores altos de actividades antioxidantes, por esta razón es el mejor procedimiento para cuantificar la actividad antioxidante de especies que sean pobres en concentración antioxidantes [5].



**Figura 1.** Reacción de reducción del complejo  $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$  y aparición del cromóforo  $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$  [6]

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO FRAP EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Versión: 1.0
		Página 2 de 8

## CONSIDERACIONES GENERALES

- Es necesario el uso de implementos de seguridad como bata, gafas de protección y guantes.
- Debe tenerse especial cuidado con el manejo de las celdas de cuarzo a fin de evitar su ruptura.
- El manejo de acético glacial y el clorhídrico debe realizarse en la cabina de extracción de gases.
- Se deben acatar las normas de seguridad del laboratorio.
- Se debe mantener cerrados los recipientes dispuestos para el almacenamiento de los solventes.
- La manipulación adecuada de los equipos garantiza seguridad para quienes los operen.

## 4. CONTENIDO

### 4.1 Descripción de la muestra

Extracto etanólico (o mezclas de etanol-agua-ácido) de frutas o vegetales, debe estar a temperatura ambiente y no presentar sólidos suspendidos.

### 4.2 Materiales necesarios

#### 4.2.1 Equipos

- Espectrofotómetro
- Potenciómetro


#### 4.2.2 Materiales

- Vasos de precipitado de 10 ml
- Vasos de precipitado 100ml
- Vaso de precipitado 250ml
- Balones aforados de 10 ml
- Balones aforados de 50 ml
- Balones aforados de 500 ml
- Celdas de cuarzo para el espectrofotómetro

#### 4.2.3 Reactivos

- 2,4,6 – tripiridil-S-triazina (TPTZ)
- Acido clorhídrico HCl 37%
- Acido 6- hidroxí- 2,5,7,8 – tetrametil-cromato-2 carboxílico (Trolox)
- Cloruro de Hierro hexa hidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- Acetato de sodio trihidratado ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )
- Acido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) glacial
- Hidróxido de Sodio
- Etanol 96%



 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO FRAP EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Versión: 1.0
		Página 3 de 8

### 4.3 Procedimiento

#### 4.3.1 Preparación de Soluciones

**Buffer de acetato de sodio 300 nM, pH 3,6:** Esta solución es estable y puede ser útil por varios días.

Para 500 ml de solución:

1. Pesar 1,6 g de acetato de sodio en un vaso de 250 ml
2. Agregar aproximadamente 150ml de agua destilada y agitar hasta disolución completa
3. Agregar 8 ml de ácido acético glacial
4. El pH de la solución debe tener un valor de 3,6 de lo contrario ajustar con ácido acético o con hidróxido de sodio
5. Transferir a balón aforado de 500 ml
6. Completar volumen con agua destilada.

**Solución de ácido clorhídrico 40 mM:** Esta solución es estable y puede ser útil varios días.

Para 500 ml de solución:

1. Agregar 200 ml de agua a un balón aforado de 500 ml
2. Agregar 1,64 ml de ácido clorhídrico al 37%
3. Completar a volumen con agua destilada

**Solución de cloruro férrico 20mM:** Esta solución debe prepararse semanalmente y almacenarse en condiciones de oscuridad y bajo temperaturas de refrigeración.

Para 50 ml de solución:

1. Pesar 0,27 g de cloruro férrico hexahidratado en un vaso de 100 ml
2. Adicionar agua destilada, menos de 50ml, y agitar hasta disolución completa
3. Transferir cuantitativamente a un balón de 50 ml
4. Completar a volumen con agua destilada.


**Solución de TPTZ 10 mM:** Esta solución debe prepararse diariamente y debe mantenerse en condiciones de oscuridad

Para 50 ml de solución:

1. Pesar 0,156 g de TPTZ en un vaso de 100 ml
2. Disolver con aproximadamente 20ml de la solución de ácido clorhídrico 40mM
3. Transferir cuantitativamente a balón de 50 ml
4. Completar a volumen con la solución de ácido clorhídrico

#### Solución de trabajo

Mezclar las soluciones de buffer de acetato de sodio, cloruro ferrico y TPTZ en la proporción 10:1:1 respectivamente y mantener en condiciones de oscuridad.

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO FRAP EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Página 4 de 8

#### 4.3.2 Curva de calibración

1. Pesar 10 mg de Trolox en un vaso de 10 ml
2. Disolver en 5 ml de etanol 96%
3. Transferir cuantitativamente a balón aforado de 10 ml
4. Completar a volumen con etanol
5. Para preparar los puntos de la curva tomar alícuotas de 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 y 1,75 ml en balones de 10ml cada una
6. Completar a volumen cada balón con etanol
7. Determinar la capacidad antioxidante por el método FRAP , cada punto debe leerse por triplicado para construir la curva de calibración.

#### 4.3.3 Determinación de la Capacidad Antioxidante por medio del radical FRAP

1. En un balón de 10 ml adicionar 330µl del extracto
2. Agregar solución de trabajo hasta completar volumen y agitar
3. Dejar reacciona durante una (1) hora en un lugar oscuro
4. Ajustar el blanco del espectrofotómetro con el blanco elaborado a partir de 330 µl de agua a 593 nm
5. Leer la absorbancia de cada muestra
6. Realizar la cuantificación a partir de la curva de cuantificación

#### REFERENCIAS

1. Bergman, M., et al., *The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions*. Phytochemistry, 2001. **58**: p. 143 - 152.
2. Mazzeo, T., *Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables*. Food Chemistry, 2011. **128**: p. 627-634.
3. Benzie, I.F.F. and Y.T. Szeto, *Total Antioxidant Capacity of Teas by the Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(2): p. 633-636.
4. Huang, D., B. Ou, and R.L. Prior, *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(6): p. 1841-1856.
5. Espinal, M., *Capacidad antioxidante y ablandamiento de la guayaba palmira ica 1 (Psidium guajava)*, in *Departamento de Química*. 2010, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá, D.C. p. 141.
6. Iris F. F. Benzie and J.J. Strain, *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay*. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1996. **239**(0292): p. 70-76.



**ANEXO**

DIAGRAMAS DE FLUJO PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

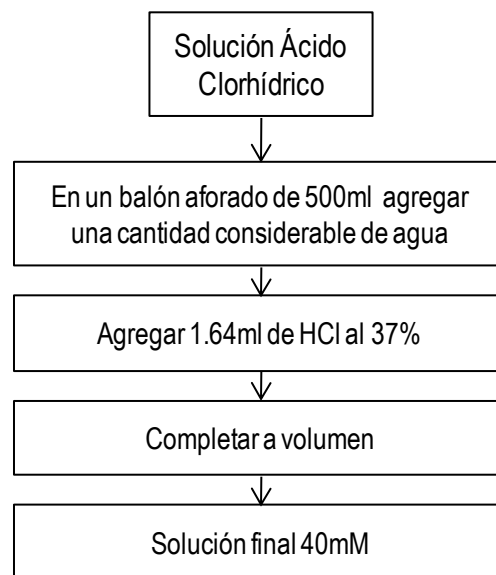
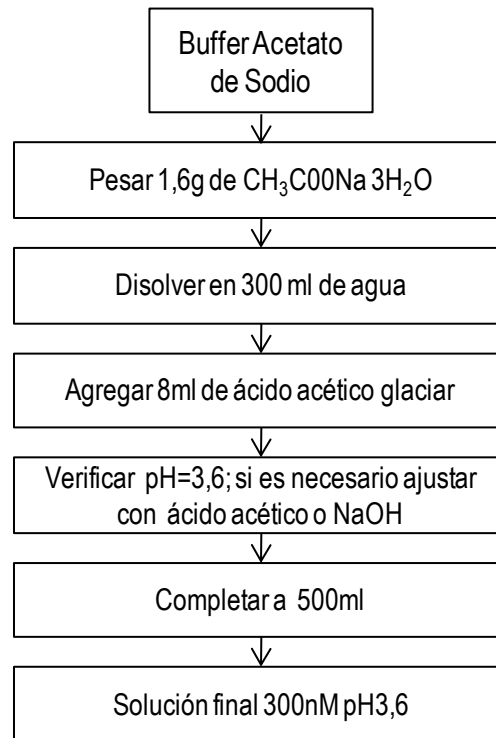
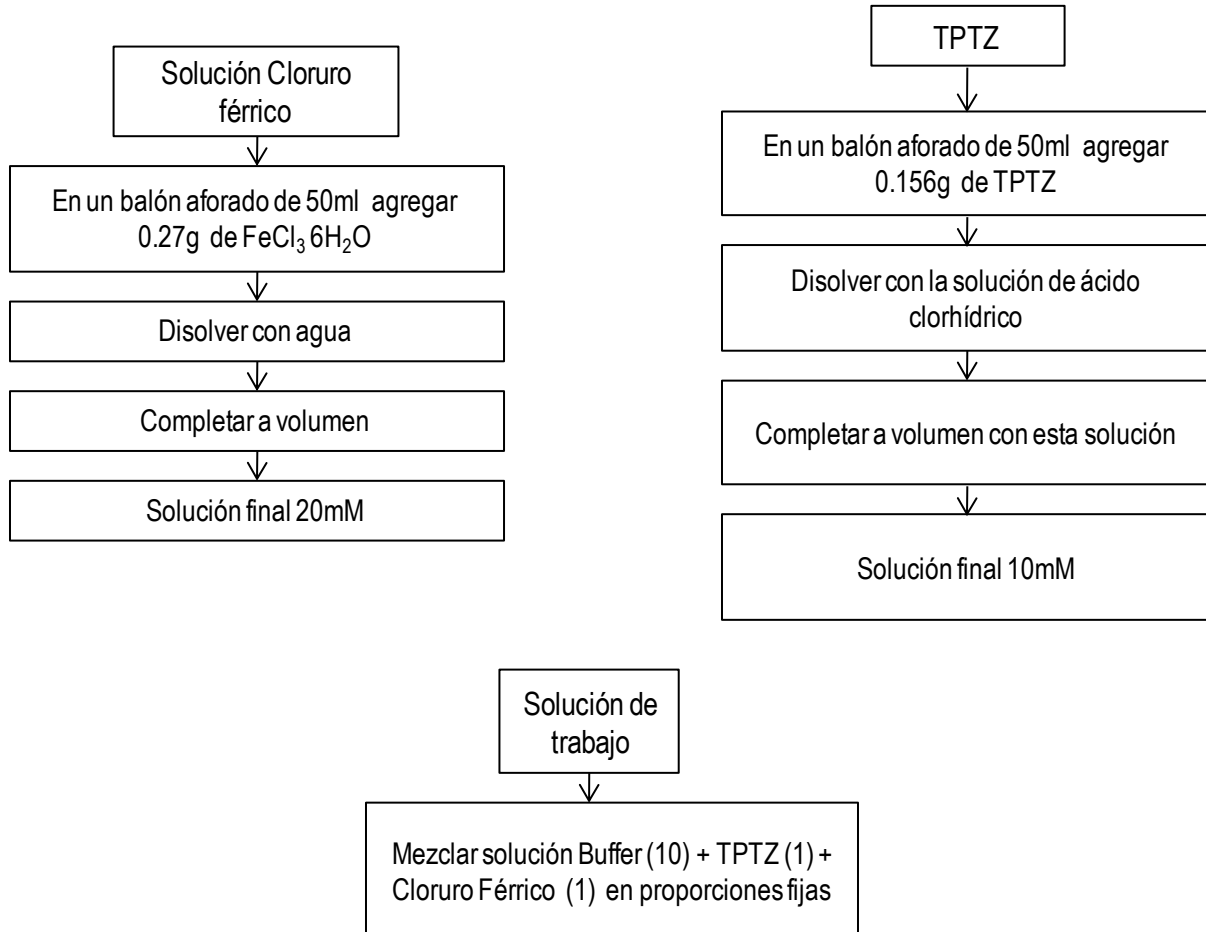




DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES




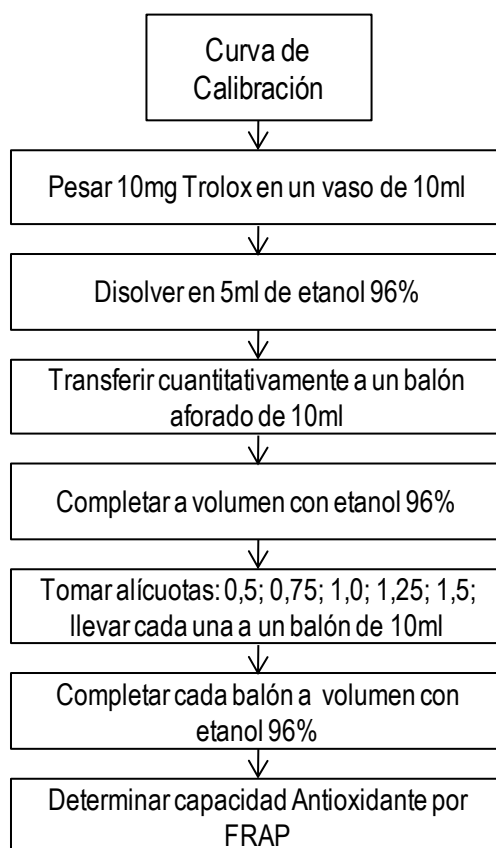
 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO FRAP EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Página 7 de 8

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN




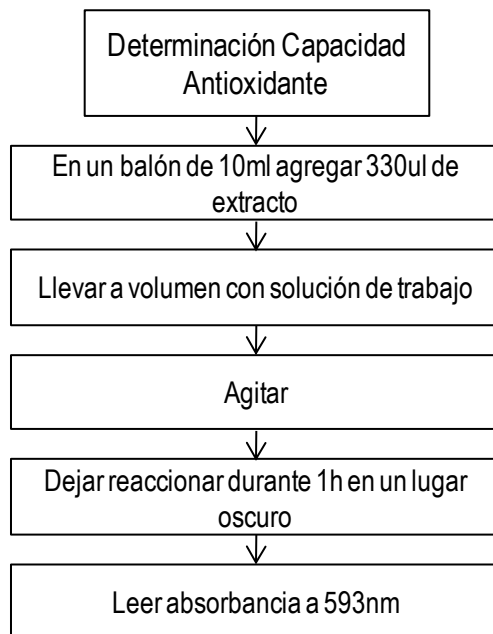

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:	
			Versión: 1.0
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO FRAP EN EXTRACTOS VEGETALES</b>		Página 8 de 8

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR MEDIO DEL RADICAL FRAP



**C. Procedimiento para la  
determinación de la capacidad  
antioxidante por medio del método  
TEAC (decoloración del catión  
radical ABTS) en extractos vegetales**

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR MEDIO DEL MÉTODO TEAC (DECOLORACIÓN DEL CATION RADICAL ABTS) EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Versión: 1.0
		Página 1 de 9

## 1. OBJETIVO

Determinar la actividad antioxidante de extractos etanólicos y etanólicos acidificados de frutas y hortalizas mediante el método de decoloración del catión radical ABTS<sup>+</sup>

## 2. ALCANCE

Este método es aplicable a extractos de frutas y hortalizas realizados en medios de extracción polares, como etanol, etanol acidificado, entre otros.

## 3. ABREVIATURAS

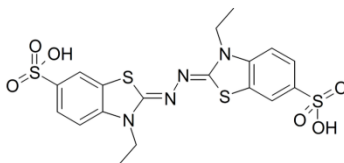
ABTS = 2,2'-azinobis-(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> = Persulfato de potasio

Trolox = 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

## 4. DEFINICIONES

ABTS: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonic acid) peso molecular 514.62 g/mol (Ver **FIGURA 1** Estructura química del radical catión ABTS); dona electrones cuando está frente a especies reactivas oxo, reacciona con compuestos antioxidantes como polifenoles, vitamina C y tioles. Una vez el radical se estabiliza se presenta un cambio, proporcional al contenido de antioxidantes, de color que puede ser cuantificado a través de espectrofotometría a 734nm [1]




**FIGURA 1** Estructura química del radical catión ABTS

Compuestos antioxidantes: son sustancias que retrasan o previenen las reacciones de oxidación por que están en la capacidad de estabilizar radicales libres. En éste grupo de sustancias se encuentran los polifenoles (flavonoides, antocianinas, flavonoles, las flavonas e isoflavononas), la vitamina C, la vitamina E, entre otros compuestos [2].

Compuestos fenólicos: sustancias que poseen varias funciones fenol unidas a anillos o cadenas alifáticas. Estas sustancias se encuentran naturalmente en las plantas, son compuesto fitoquímicos que contribuyen a su pigmentación, actúan como antioxidantes y les proporcionan sabor[3]. Se obtienen a partir de las rutas metabólicas del siquimato, fenilpropanoide o fosfato pentosa. Juegan un papel importante en el crecimiento, reproducción y protección de las plantas [4].



 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR MEDIO DEL MÉTODO TEAC (DECOLORACIÓN DEL CATION RADICAL ABTS) EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Versión: 1.0
		Página 2 de 9

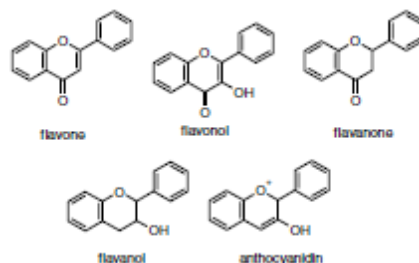


Figura 2 Estructuras genéricas de algunos compuestos polifenólicos  
Fuente [4]

Trolox: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Ver Figura 3 Estructura química del Trolox); peso molecular de 250.29 g/mol. Derivado hidrosoluble de la vitamina E, con aplicaciones bioquímicas y biológicas iguales a las de ésta vitamina. Se utiliza como referente para la determinación de la capacidad antioxidante [1].

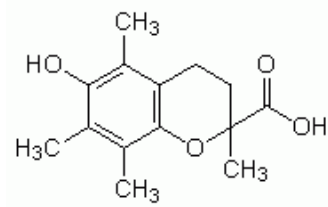


Figura 3 Estructura química del Trolox  
Fuente [1]

## 5. NOTAS DE SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES GENERALES

### Seguridad


Es indispensable el uso del material de protección como bata, gafas de seguridad y guantes.

### Generalidades

El espectrofotómetro requiere de un tiempo de estabilización aproximado de 30min antes de la primera lectura que se realiza a 734nm.

Debe evitarse el contacto con la luz de la solución de trabajo.

Las celdas que utilicen para la lectura de absorbancia no deben tener impresiones dactilares, ni imperfecciones en la superficie.

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR MEDIO DEL MÉTODO TEAC (DECOLORACIÓN DEL CATION RADICAL ABTS) EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Versión: 1.0
		Página 3 de 9

## 6. PRINCIPIO DE LA TÉCNICA

Es una técnica espectrofotométrica, que puede realizarse en un rango amplio de pH, donde se evalúa la capacidad reductora frente al radical catión ABTS de diferentes compuestos por medio del seguimiento del cambio de la coloración. El tiempo de reacción oscila entre uno y 30 minutos y la lectura se puede realizar a 414, 645, 734 u 815 nm. Existen diversas rutas de obtención del radical ABTS●, dado que es soluble tanto en agua como en solventes orgánicos, es uno de los radicales más estables empleado para la determinación de la capacidad antioxidante. Los resultados se reportan como capacidad antioxidante en equivalentes trolox (TEAC) o en equivalentes de ácido ascórbico. [5].

## 7. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras a analizar serán extractos polares (etanólicos o etanólicos acidificados) de frutas y hortalizas que en general conservan el color de la matriz de la que provienen. Los extractos deben estar conservados a temperaturas de refrigeración o congelación y no deben presentar sólidos de tamaño considerable, además deben estar en envases que eviten el contacto con la luz. Para el momento del análisis es importante que la muestra sea homogénea y este a temperatura ambiente.

## 8. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

### Equipos:

Espectrofotómetro (734 nm)

Balanza analítica

Plancha de agitación magnética

### Materiales y reactivos:

#### Para la solución stock y solución de trabajo

Balón aforado de 25ml

Punta de micropipeta 10-100 µl

Espátula

Etanol 96%

Vaso de precipitado de 25ml

Sal de diamonio ABTS

Vaso precipitado 250ml

K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

Barra de agitación magnética

Agua destilada

Micropipeta 10-100 µl


#### Para la solución control de vitamina C

Balón de 25ml

Espátula

Vaso de 25ml

Ácido ascórbico 99%

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR MEDIO DEL MÉTODO TEAC (DECOLORACIÓN DEL CATION RADICAL ABTS) EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Versión: 1.0
		Página 4 de 9

Agua destilada

Para la curva de calibración

Vaso de 25ml	Micropipeta 0.5-5 ml
Balones aforados de 10ml	Punta 0.5-5 ml
Microespátula	Pipeta Pasteur
Micropipeta 100-1000 µl	Trolox
Punta de 100-1000 µl	Etanol al 96%

Para la determinación de la actividad antioxidante

Micropipeta 0.5-5ml

Punta 0.5-5ml

Micropipeta 10-100 µl

Punta 10-100 µl (en una cantidad igual al número de muestras que se desea medir)

Celdas desechables (en una cantidad igual al número de muestras que se desea medir)


## 9. PROCEDIMIENTO

### Solución stock (ver ANEXOS)

- a. En un vaso de 25 ml pesar 96mg de ABTS y 16.7 mg de  $K_2S_2O_8$  y disolver con un poco de agua destilada (menos de 25 ml)
- b. Transferir cuantitativamente a un balón de 25ml
- c. Completar a volumen con agua destilada
- d. Almacenar en un frasco en el que no esté en contacto con la luz , dejar reposar mínimo por 16 horas bajo refrigeración (la vida útil de esta solución está alrededor de los 6 meses)

### Solución de trabajo (ver ANEXOS)

Según la cantidad de muestras que van a analizarse, y teniendo en cuenta que por cada muestra se requiere 1ml de solución de trabajo, se mezcla aproximadamente 50 µl de la solución stock (este volumen de solución puede variar según las condiciones iniciales de ésta) por cada 100 ml de solución de trabajo que se desee preparar, la absorbancia final de la solución debe estar en un rango entre 0,7 y 0.9 a 734nm.

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR MEDIO DEL MÉTODO TEAC (DECOLORACIÓN DEL CATION RADICAL ABTS) EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Versión: 1.0
		Página 5 de 9

### Solución de control Vitamina C (ver ANEXOS)

- Pesar 4.4 mg de vitamina C en un vaso precipitado de 25 ml, disolver con agua destilada
- Llevar cuantitativamente a un balón de 25 ml y completar a volumen con agua destilada
- Determinar la capacidad antioxidante según procedimiento descrito; el valor de capacidad antioxidante debe ser cercano a 1mM de trolox (1.00±0.15 mM). De lo contrario la tanto la curva como la solución de vitamina C deben repetirse.

### Curva de calibrado de Trolox (ver ANEXOS)

- Pesar 25 mg de Trolox en un vaso de precipitado de 25 ml disolver en menos de 10ml de etanol al 96%
- Transferir cuantitativamente a un balón aforado de 10ml y llevar a volumen con etanol al 96%
- De la solución anterior tomar alícuotas de 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 cada una en un balón aforado de 10ml, completar a volumen con etanol al 96%.
- Determinar la capacidad antioxidante por el procedimiento descrito para la determinación de las muestras
- Elaborar la curva de concentración de concentración de Trolox vs la diferencia de absorbancia (absorbancia inicial - absorbancia final)
- Escriba la ecuación lineal y su valor R<sup>2</sup> (coeficiente de correlación), que deberá ser de 0.99 o mayor.

### Determinación de la capacidad antioxidante (ver ANEXOS)


- Realice el blanco del equipo con etanol al 96% en la celda plástica de muestra y de referencia
- En una celda plástica de muestra adicione 1ml de la solución de trabajo y mida la absorbancia inicial, registre el valor.
- Agregue 10 µl de extracto de muestra, agite y deje reaccionar durante 6min en la oscuridad.
- Lea la absorbancia final de la muestra.

## 10. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Calcule la diferencia de la absorbancia inicial y absorbancia final (luego de adicionar los 10 µl y dejar reaccionar por 6min). Interpole la diferencia en la ecuación obtenida de la recta de calibración de trolox, y obtenga la concentración de la actividad antioxidante como mM de trolox; realice el cálculo para expresar el resultado como mmol de trolox/g de muestra ó 100 de muestra según su caso, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{mg Trolox/g muestra} = \text{mM Trolox} * \frac{1\text{l}}{1000\text{ ml}} * \frac{\text{Volumen de extracción (ml)}}{\text{peso de la muestra (g)}} * \text{FD}$$

Donde, mM Trolox, es la concentración interpolada de la curva de calibración


 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR MEDIO DEL MÉTODO TEAC (DECOLORACIÓN DEL CATION RADICAL ABTS) EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Versión: 1.0
		Página 6 de 9

Peso muestra: Peso en gramos de muestra tomada para la extracción.

FD: Factor de dilución, dilución que se le realizó al extracto para obtener una absorbancia dentro del rango de la curva de calibración.

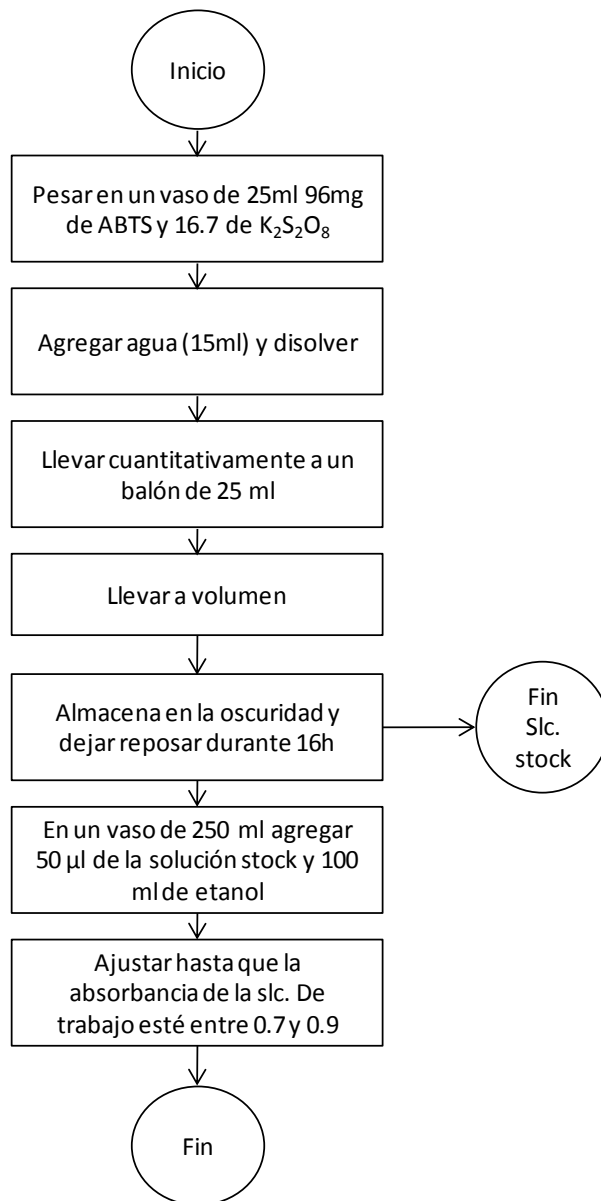
## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **26**(9-10): p. 1231-1237.
2. J Pokorný, I.o.C.T., N.Y. Czech Republic, Institute of Organic Chemistry,, and U.o.R. M Gordon, *Antioxidants in Food*, ed. I.o.C.T. J Pokorný, N.Y. Czech Republic, Institute of Organic Chemistry,, and U.o.R. M Gordon. 2001, Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
3. Andersen, Ø.M. and K.R. Markham., *Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications*. 2006, Boca Raton, FL: CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group.
4. Balasundram, N., K. Sundram, and S. Samman, *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*. Food Chemistry, 2006. **99**(1): p. 191-203.
5. Magalhães, L.M., et al., *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties*. Analytica Chimica Acta, 2008. **613**(1): p. 1-19.

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
		Versión: 1.0
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR MEDIO DEL MÉTODO TEAC (DECOLORACIÓN DEL CATION RADICAL ABTS) EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Página 7 de 9

### ANEXOS

#### DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK Y SOLUCIÓN DE TRABAJO




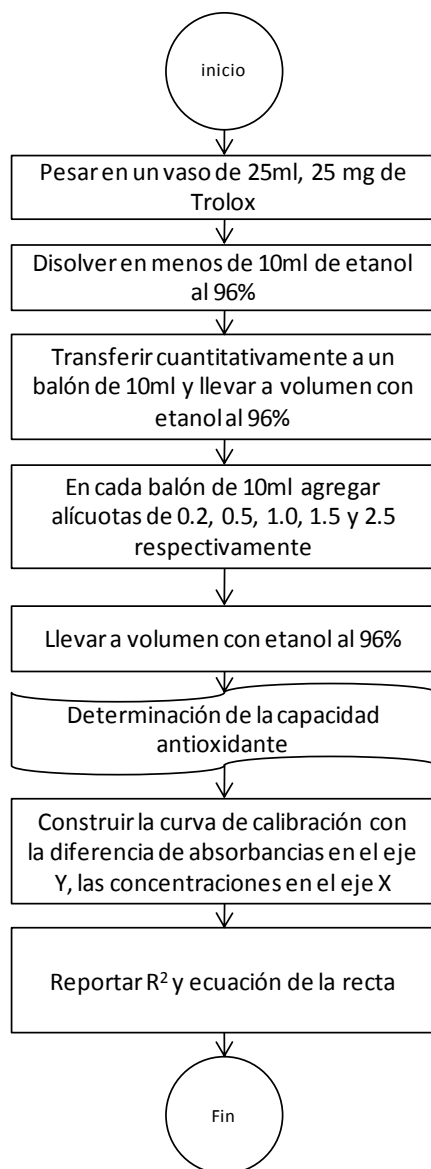
 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR MEDIO DEL MÉTODO TEAC (DECOLORACIÓN DEL CATION RADICAL ABTS) EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Versión: 1.0

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN




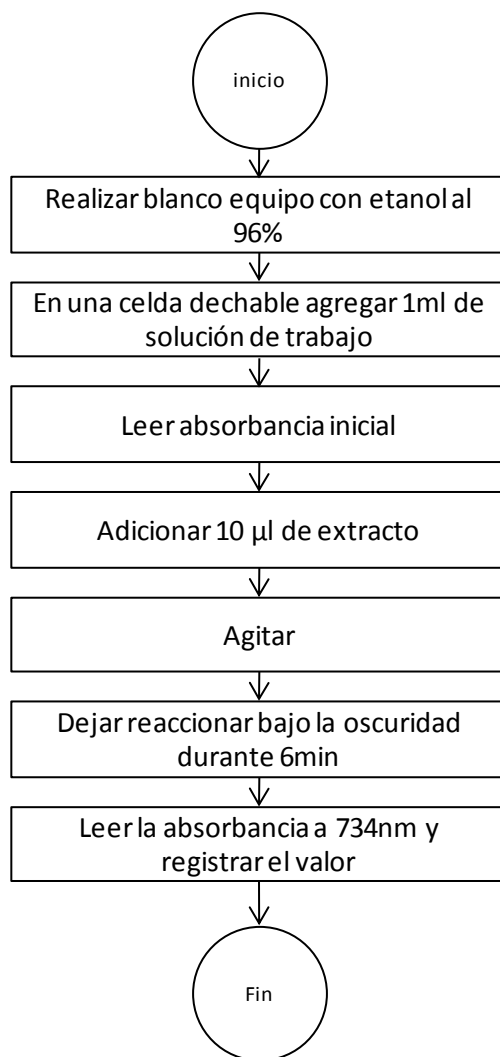

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:	
			Versión: 1.0
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR MEDIO DEL MÉTODO TEAC (DECOLORACIÓN DEL CATION RADICAL ABTS) EN EXTRACTOS VEGETALES</b>		Página 9 de 9

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE





**D. Procedimiento para la  
determinación de fenoles totales por  
el método de Folin-Ciocalteu en  
extractos vegetales**

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEU EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Versión: 1.0
		Página 1 de 8

## 1. OBJETIVO

Determinar el contenido de fenoles totales en extractos polares de fruta y vegetales mediante el método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu.

## 2. ALCANCE

El procedimiento aplica para extractos polares (etanólicos, etanólicos acidificados, entre otros) de frutas y hortalizas a los que se les desee determinar el contenido de fenoles totales expresados como equivalentes de ácido caféico. El método no es aplicable a matrices o medios lipofílicos.

## 3. ABREVIATURAS

DPPH: radical 2,2-difenil-1-picridracil

TEAC: Capacidad antioxidante en equivalentes trolox

## 4. DEFINICIONES

**Ácido caféico:** ácido 3-(3,4-Dihidroxifenil)-2-propenoico, peso molecular 180.16 g/mol (ver figura No.1) es un sólido amarillo que se encuentra de manera natural en las plantas por que facilita la biosíntesis de lignina. Se utiliza como referente en los análisis de capacidad antioxidante debido a que su estructura incluye un anillo fenólico con sustituyentes hidroxilos característico de los antioxidantes.

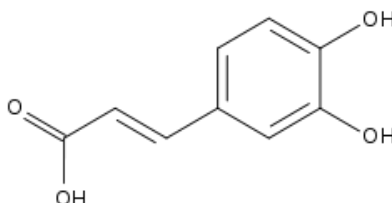


Figura No. 1 Estructura química de la molécula de ácido caféico

**Ácido gálico:** ácido 3,4,5-trihidroxi benzoico, peso molecular 170.12 g/mol (ver figura No.2). Se encuentra de manera natural en las plantas y se utiliza como estándar para la determinación de fenoles totales por medio de Folin-Ciocalteu.

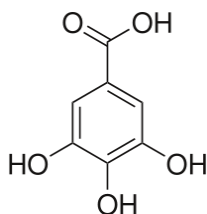



Figura No. 2 Estructura química del ácido gálico

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEU EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Página 2 de 8

**Compuestos fenólicos:** sustancias que poseen varias funciones fenol unidas a anillos aromáticos o cadenas alifáticas. Estas sustancias se encuentran naturalmente en las plantas, son compuesto fitoquímicos que contribuyen a su pigmentación, actúan como antioxidantes y les proporcionan sabor a algunos frutos [1]. Se obtienen a partir de las rutas metabólicas del siquimato, fenilpropanoide y fosfato pentosa. Juegan un papel importante en el crecimiento, reproducción y protección de las plantas [2].

**Trolox:** ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (ver figura No.3); peso molecular de 250.29 g/mol. Derivado hidrosoluble de la vitamina E, con aplicaciones bioquímicas y biológicas iguales a las de ésta vitamina. Se utiliza como referente para la determinación de la capacidad antioxidante, ya que en general estos métodos no son específicos para cada sustancia [3].

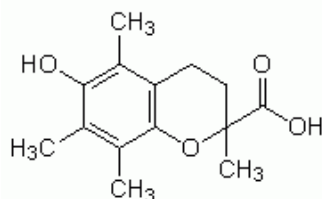


Figura No.3 Estructura química del Trolox  
Fuente [3]

## 5. NOTAS DE SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES GENERALES

### Seguridad

Es indispensable el uso del material de protección como bata, gafas de seguridad y guantes.

### Generalidades

El espectrofotómetro requiere de un tiempo de estabilización aproximado de 30min antes de la primera lectura que se realiza a 765nm.


Las celdas que utilice para la lectura de absorbancia no deben tener impresiones dactilares

Debe evitarse el contacto con la luz de las soluciones estándar (para la curva de calibración) y el reactivo Folin-Ciocalteu.

La curva de calibración del reactivo Folin-Ciocalteu debe realizarse mínimo cada vez que se destape una nueva botella.

## 6. PRINCIPIO DE LA TÉCNICA

Para la determinación del contenido de polifenoles se utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu, para el que aún no se conoce con certeza su estructura química. El método consiste en transferir electrones, en un medio alcalino, desde los compuestos de interés (polifenoles) hacia el complejo Folin-Ciocalteu, el seguimiento de la reacción se realiza espectrofotométricamente en un rango de 750 a 765nm y se utiliza el ácido caféico o el ácido gálico como reactivo de referencia [4].

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEU EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	
		Página 3 de 8

Aunque es un método que se ha aplicado ampliamente en la determinación de compuestos fenólicos, el reactivo Folin-Ciocalteu no es un compuesto que reaccione selectivamente con éste grupo de sustancias, también lo hace con compuestos como aminas aromáticas, ácido ascórbico entre otros, pero ha mostrado correlaciones significativas frente a ensayos de capacidad antioxidante como el DPPH o TEAC [4].

## 7. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras a analizar serán extractos etanólicos de frutas y hortalizas que en general conservan el color de la matriz de la cual provienen. Los extractos deben estar conservados a temperaturas de refrigeración o congelación y no deben presentar sólidos de tamaño considerable, además deben estar en envases que eviten el contacto con la luz. Para el momento del análisis es importante que la muestra sea homogénea y este a temperatura ambiente.

## 8. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

### Equipos:

Espectrofotómetro Jasco V-530 (765 nm)

Plancha de agitación

Balanza analítica

### Materiales y reactivos:

Para la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10%p/v)

Punta micropipeta de 0.5-5 ml (aproximadamente 2)

Vaso de precipitado 250ml

Balón aforado de 25ml

Balón aforado de 1000ml

Balones aforados de 10 ml (una cantidad igual al número de diluciones que se vayan a realizar, 6 según el procedimiento)

Agitador magnético

Espátula-cuchara

Balones aforados de 50 ml (una cantidad igual al número de puntos de la curva que se vayan a medir, 6 según el procedimiento)

Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

Agua destilada

Pipeta pasteur

Frasco de capacidad de 1 litro

Estándar de ácido caféico.


Para la curva de calibración

Etanol al 96%

Vaso de precipitado de 25 ml

Espátula

Micropipeta de 0.5-5 ml

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN CIICALTEU EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Versión: 1.0
		Página 4 de 8

Para la determinación de fenoles totales

Vaso precipitado 100ml (2)

Micropipeta de 0.5-5 ml

Punta micropipeta de 0.5-5 ml Micropipeta de 100-1000  $\mu$ l

Micropipeta 100-1000  $\mu$ l

Puntas micropipeta 100-1000  $\mu$ l (una cantidad igual al número de muestras que se deseen analizar más una)

Balones aforados de 50 ml (una cantidad igual al número de muestras que se deseen analizar)

Celdas de vidrio

Solución acuosa de carbonato de sodio

Agua desionizada

Reactivo de Folin


## 9. PROCEDIMIENTO

### Solución de carbonato de sodio

- En un vaso de 250 ml pesar 100g de carbonato de sodio
- Agregar 200ml de agua y disolver con ayuda de agitación magnética
- Llevar la solución al balón de 1000ml y completar a volumen
- Almacenar en un frasco cerrado.

### Curva de calibración ácido caféico

- Pese, con la mayor exactitud posible, 50 mg de ácido caféico estándar en un vaso de precipitado de 25 ml
- Agregué 20 ml aproximadamente de etanol al 96% y disuelva
- Transfiera cuantitativamente a un balón de 25 ml y lleve a volumen con etanol al 96%, ésta es la solución madre de ácido caféico y debe prepararse el mismo día que se realiza la curva de calibración.
- De la solución de ácido caféico preparada transfiera alícuotas de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 ml a balones aforados de 10 ml y lleve a volumen con agua destilada. Las nuevas soluciones tendrán concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/ml aproximadamente.
- Mida la cantidad de fenoles totales de las soluciones preparadas empleando el procedimiento descrito a continuación
- Elabore una curva de concentración de ácido caféico vs la absorbancia medida y halle la ecuación lineal.
- Escriba la ecuación lineal y su valor  $r^2$  (coeficiente de correlación), que deberá ser de 0.995 ó superior, junto con su nombre y la fecha, en el frasco del reactivo de Folin que empleó.

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEU EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Página 5 de 8

### Determinación de fenoles totales

- a. En un vaso de 100ml agregue reactivo Folin (500 µL por cada muestra a analizar)
- b. En un vaso de 100 agregue solución de carbonato de sodio (2ml por cada muestra a analizar)
- c. En un balón de 50ml agregar 2ml de agua, 500 µL de extracto de la muestra y 500 µL del reactivo de Folin, agitar (sin voltear el balón).
- d. Esperar 2min y adicionar 2ml de la solución de carbonato de sodio y llevar a volumen con agua destilada.
- e. Dejar durante 2horas en la oscuridad
- f. Leer la absorbancia a 765nm frente a un blanco realizado con agua destilada en las celdas de vidrio.

### 10. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Interpole las absorbancias obtenidas en la ecuación obtenida de la recta de calibrado del reactivo de Folin que debe encontrarse escrita en un papel pegado al frasco y obtendrá el valor de la concentración de fenoles totales como mg de ácido caféico/ ml, usted debe hacer el cálculo para expresar su resultado como mg ácido caféico/g de muestra ó 100 de muestra según su caso, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{mg Ác Caféico./g muestra} = \frac{\text{mg Ác. Caféico}}{\text{ml}} * \frac{\text{Volúmen de extracción (ml)}}{\text{peso de muestra (g)}} * \text{FD}$$


Donde: Volumen extracto: 100 mr.

FD: Factor de dilución (si lo hay).

Peso propóleo: Peso en gramos del propóleo tomado para la extracción.

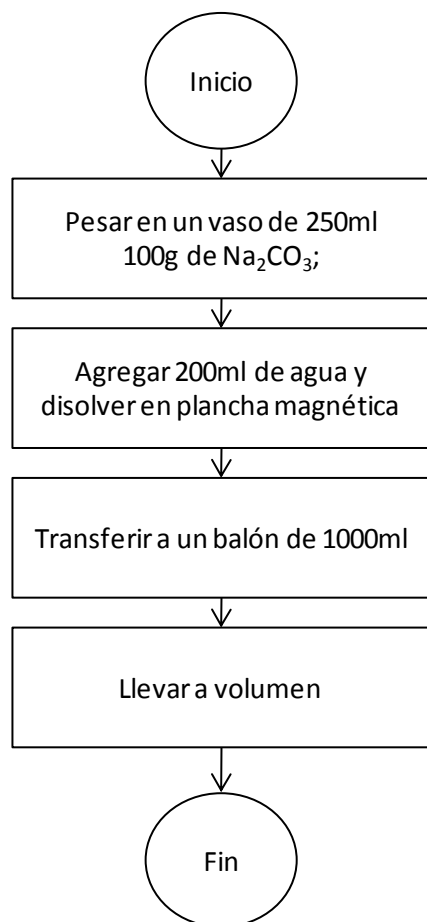
### 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Andersen, Ø.M. and K.R. Markham., *Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications*. 2006, Boca Raton, FL: CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group.
2. Balasundram, N., K. Sundram, and S. Samman, *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*. Food Chemistry, 2006. **99**(1): p. 191-203.
3. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **26**(9-10): p. 1231-1237.
4. Magalhães, L.M., et al., *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties*. Analytica Chimica Acta, 2008. **613**(1): p. 1-19.

 <p>UNIVERSIDAD <b>NACIONAL</b> DE COLOMBIA</p>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEU EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Versión: 1.0
		Página 6 de 8

## ANEXOS

### DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA ELABORACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE CARBONATO DE SODIO




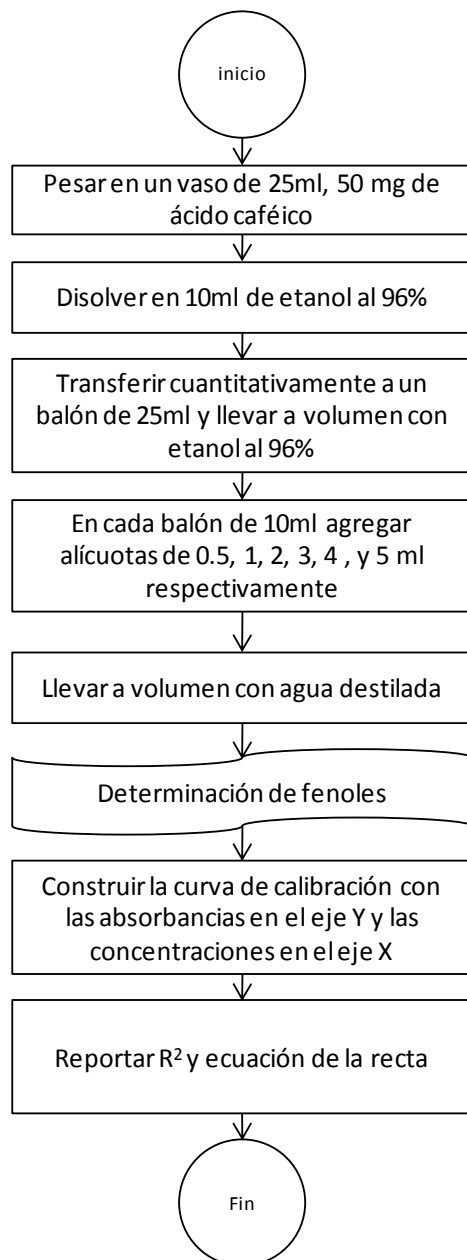
 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:	
			Versión: 1.0
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEU EN EXTRACTOS VEGETALES</b>		Página 7 de 8

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN






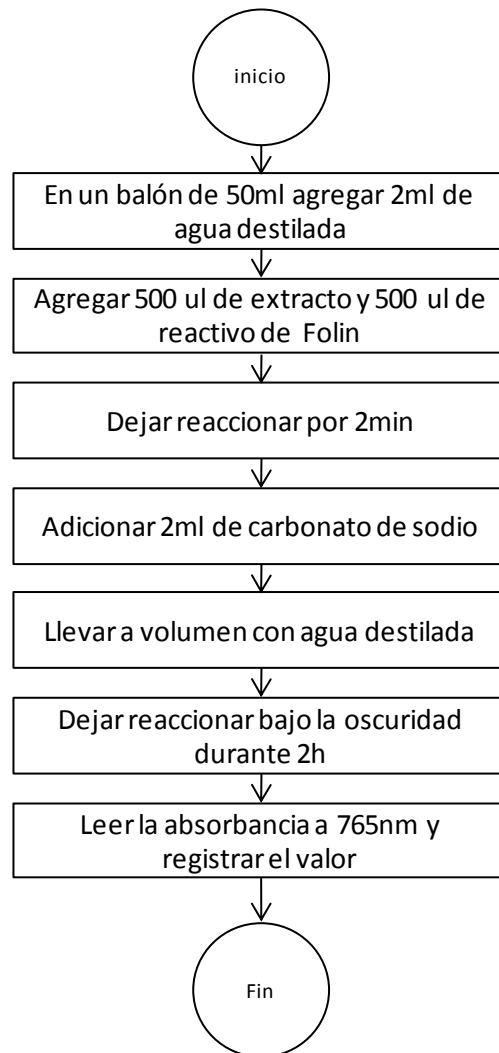

 <p>UNIVERSIDAD <b>NACIONAL</b> DE COLOMBIA</p>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEU EN EXTRACTOS VEGETALES</b>	Versión: 1.0
		Página 8 de 8

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES



## **E. Procedimiento para la determinación de antocianinas por el método del pH diferencial**

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS POR EL MÉTODO DEL pH DIFERENCIAL</b>	Versión: 1.0

### 1. OBJETIVOS

Determinar el contenido de antocianinas totales en diferentes extractos de fruta y vegetales mediante el método espectrofotométrico del pH diferencial.

### 2. ALCANCE

El procedimiento aplica para extractos etanólicos y etanólicos acidificados de frutas y hortalizas a los que se les desee determinar el contenido de antocianinas monoméricas.

### 3. DEFINICIONES

**Antocianinas:** son glicósidos de las antocianidinas, sustancias fitoquímicas encargadas de dar coloraciones rojas-azules a las plantas, atraer insectos y proteger de diferentes patologías y depredadores [1]; son compuestos fenólicos que se encuentran dentro del grupo de los flavonoides [2]. Las fuentes más reconocidas de antocianinas son, en general, los frutos rojos como la mora, arándanos, ciruelas, uvas etc. La estructura base de una antocianina tiene tres anillos, en medio ácido presenta una carga positiva y son solubles en agua, el color que estas sustancias muestren está ligado con el pH del medio [3-4]; tienen un azúcar que se une al anillo heterocíclico por C3 o 4, la diferencia en cada uno de los compuestos que pertenecen al grupo son las sustituciones de éste anillo (ver figura 1); las estructuras más comunes son las de cianindina, delfidina, pelarogodina, malvidina, petunidina y peonidina [4]

**Compuestos fenólicos:** sustancias que poseen varias funciones fenol unidas a anillos aromáticos o cadenas alifáticas. Estas sustancias se encuentran naturalmente en las plantas, son compuesto fitoquímicos que contribuyen a su pigmentación, actúan como antioxidantes y les proporcionan sabor[1]. Se obtienen a partir de las rutas metabólicas del siquimato, fenilpropanoide y fosfato pentosa. Juegan un papel importante en el crecimiento, reproducción y protección de las plantas [4].

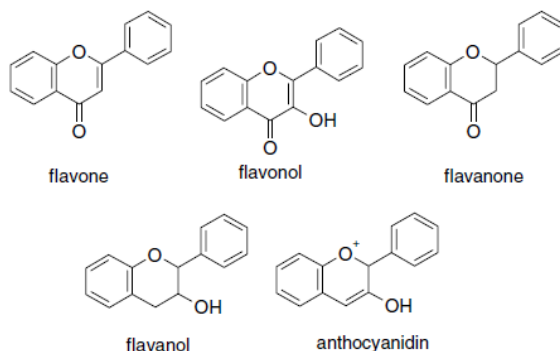



Figura No. 1 Estructuras genéricas de algunos compuestos polifenólicos  
Fuente [4]

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS POR EL MÉTODO DEL pH DIFERENCIAL</b>	Versión: 1.0

#### 4. NOTAS DE SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES GENERALES

##### Seguridad

Es indispensable el uso del material de protección como bata, gafas de seguridad y guantes.

##### Generalidades

El espectrofotómetro requiere de un tiempo de estabilización aproximado de 30min antes de la primera lectura.

Las celdas que utilice para la lectura de absorbancia no deben tener impresiones dactilares

#### 5. PRINCIPIO DE LA TÉCNICA

Las antocianinas monoméricas muestran una diferencia de color según el pH del medio en el que se encuentren, cuando el medio es ácido pH 1.0 prevalece la forma oxonio o catión flavilo que se evidencia en el color rojo intenso de la solución; cuando el pH del medio está alrededor de 4.5 la forma predominante de la molécula es de hemiacetal o chalcona, debido a que entrega un protón se estabiliza y se transforma en un molécula incolora. La diferencias de absorbancias de los pigmentos a una longitud de onda de 520nm y 700nm es proporcional a la concentración del pigmento. Los resultados son expresados como cianidina-3-glucosido. La forma polimérica de estas moléculas son resistentes a los cambios de pH y no modifican su coloración, por esto no entran dentro del cálculo. [5-6]

Las condiciones de lectura del espectrofotómetro están dadas para muestras donde el mayor contenido de antocianinas está representado por cianidina-3-glucosido; de realizar mediciones con referencia a otra de las antocianinas debe revisarse tanto las longitudes de onda como los cálculos.

#### 6. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras a analizar serán extractos etanólicos de frutas y hortalizas que en general conservan el color de la matriz de la cual provienen. Los extractos deben estar conservados a temperaturas de refrigeración o congelación y no deben presentar sólidos de tamaño considerable, además deben estar en envases que eviten el contacto con la luz. Para el momento del análisis es importante que la muestra sea homogénea y este a temperatura ambiente.

Si la muestra presenta una turbidez considerable debe ser filtrada antes de realizar el ensayo, se recomienda utilizar un filtro que no absorba las antocianinas (p.e. Millipore™ membrane filter, 1.2 µm pore size, Millipore Corp., Bedford, MA)

#### 7. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

##### Equipo:

Espectrofotómetro Jasco V-530 (734 nm)

pHmetro

plancha de agitación


##### Materiales y reactivos:

Solución Cloruro de potasio 0.025 M

Vaso de precipitado de 500ml

Balón aforado de 1L

Barra magnética de agitación

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS POR EL MÉTODO DEL pH DIFERENCIAL</b>	Página 3 de 6

Cloruro de potasio

Ácido clorhídrico

Agua destilada

Para el análisis de muestras

Ácido clorhídrico

Balón de 25mL (tantos como el doble de muestras que vaya a analizar)

Solución de acetato de sodio 0.4M

Micropipeta 100-1000  $\mu$ L

Vaso de precipitado de 500ml

Puntas para micropipeta 100-1000  $\mu$ L (tantas como muestras vaya a medir)

Balón aforado de 1L

Barra magnética de agitación

Buffer de acetato de sodio pH 4.5

Acetato de sodio  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Buffer de cloruro de potasio pH 1.0

Agua destilada

## 8. PROCEDIMIENTO

### Elaboración buffer de cloruro de potasio pH 1.0

- En el vaso de precipitado de 500mL pese 1,86g de cloruro de potasio
- Agregue 300mL de agua y agite hasta dilución completa en la plancha de agitación
- Mida el pH de la solución y ajústelo con ácido clorhídrico (aproximadamente 6,3mL) a un valor de  $1.0 \pm 0.05$
- Transfiera el contenido del vaso al balón aforado de 1L y lleve a volumen con agua destilada

### Elaboración buffer de acetato de sodio pH 4.5

- En el vaso de precipitado de 500mL pese 54,43g de acetato de sodio trihidratado  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- Agregue 300mL de agua y agite hasta dilución completa en la plancha de agitación
- Mida el pH de la solución y ajústelo con ácido clorhídrico (aproximadamente 20mL) a un valor de  $4.5 \pm 0.05$
- Transfiera el contenido del vaso al balón aforado de 1L y lleve a volumen con agua destilada


## Determinación de antocianinas monoméricas

### Determinación de la dilución

En un balón de 25 mL agregar una cantidad de extracto tal que no supere los 5 mL (para no exceder la capacidad del buffer) y llevar a volumen con el buffer de pH 1.0; leer la absorbancia de esta mezcla (ajustar el blanco del equipo con agua destilada), el valor debe estar dentro del límite lineal del equipo (entre 0.2 y 1), una vez se obtenga la dilución correcta, este volumen será el mismo a emplear en el siguiente punto.

### Determinación contenido de antocianinas totales

- Ajustar el blanco del equipo con agua destilada

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS POR EL MÉTODO DEL pH DIFERENCIAL</b>	Versión: 1.0
		Página 4 de 6

- b. Para una misma muestra tome dos balones de 25mL, agregue, en cada uno, el volumen determinado previamente de extracto.
- c. Uno de los balones llévelo a volumen con el buffer de pH 1.0 y el otro con el buffer de pH 4.5
- d. Lea las absorbancias para cada balón a 520 nm y a 700 nm luego de 20 min de reacción, registre el valor de absorbancia.

## 9. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Para expresar el contenido de antocianinas como cianidina-3-glucosido:

Determine el valor de A con el siguiente cálculo

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH1} - (A_{520} - A_{700})_{pH4.5}$$

Para el cálculo de concentración

$$ACY \text{ [mg/l]} = (A * MW * DF * 1000) / (\epsilon * 1)$$

Dónde

MW: peso molecular de la antocianina de referencia=449.2 g/mol

DF: factor de dilución (si aplica)


1 corresponde al ancho de la celda

$\epsilon$  Coeficiente molar de extinción: 26900

1000 es el factor de conversión de g a mg

## 10. BIBLIOGRAFÍA

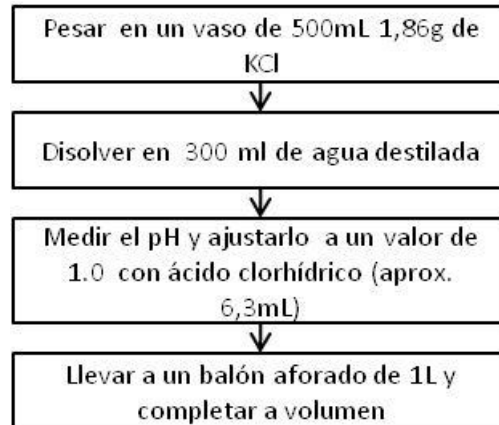
1. Andersen, Ø.M. and K.R. Markham., *Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications*. 2006, Boca Raton, FL: CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group.
2. Wang, L.-S. and G.D. Stoner, *Anthocyanins and their role in cancer prevention*. Cancer Letters, 2008. 269(2): p. 281-290.
3. Gould, K., K. Davies, and C. Winefield, *Anthocyanins Biosynthesis, Functions, and Applications*. 2009, New York: Springer New York.
4. Balasundram, N., K. Sundram, and S. Samman, *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*. Food Chemistry, 2006. 99(1): p. 191-203.
5. A.O.A.C., *AOAC Official Method 2005.02 Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines*. 2005.
6. Garzón, G.A., *Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión*. Acta Biológica Colombia, 2008. 13(3): p. 27-36.

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS POR EL MÉTODO DEL pH DIFERENCIAL</b>	Página 5 de 6

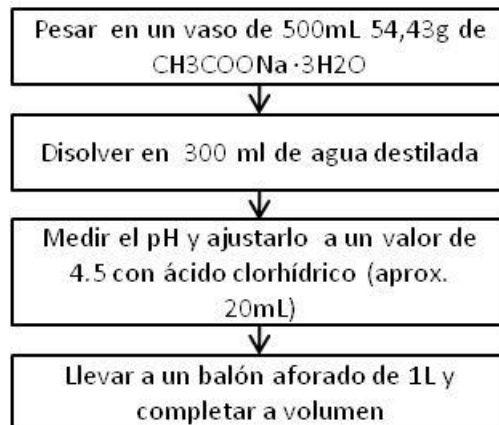
### ANEXOS

#### DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA ELABORACIÓN DE LAS SOLUCIONES

Buffer cloruro de potasio



Buffer acetato de sodio




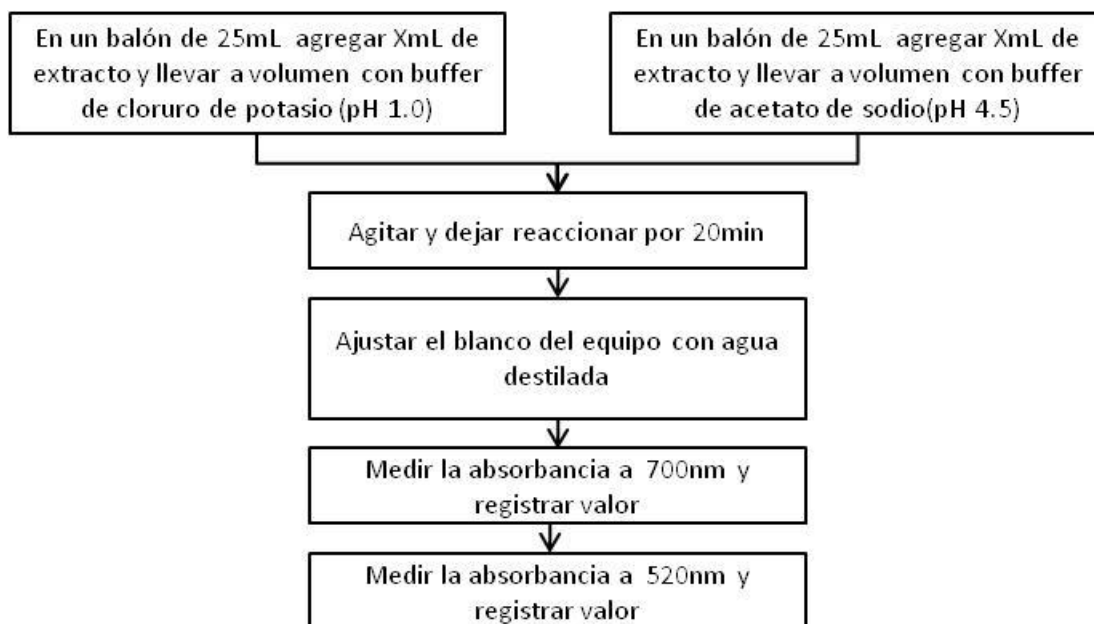

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS POR EL MÉTODO DEL pH DIFERENCIAL</b>	Página 6 de 6

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS





## **F. Procedimiento para la determinación del perfil aromático de bayas por medio de nariz electrónica**

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL AROMÁTICO DE BAYAS POR MEDIO DE NARIZ ELECTRÓNICA</b>	Página 1 de 5

### 1. OBJETIVO

Determinar el perfil aromático de bayas (mora, agraz, etc) por medio de nariz electrónica

### 2. ALCANCE

Este método es aplicable a frutos de tamaño comparable con el de la mora o el agraz que no necesiten de calentamiento para la determinación de sus compuestos volátiles.

### 3. DEFINICIONES

**Espacio de cabeza:** espacio libre en un recipiente entre su contenido y la parte superior en el que se espera se concentren los volátiles encargados de generar el olor del producto ya sea por calentamiento o por simple equilibrio entre los medios.

**Estadística multivariada:** área de la estadística que se encarga de estudiar a las diferentes variables/características de una misma muestra; es muy útil por que se encarga de reducir los conjuntos grandes de datos para facilitar el análisis y de encontrar la relación entre variables, muestras o entre los dos. Para este tipo de análisis se tiene un conjunto de metodologías que se clasifican en dos grupos: i métodos supervisados: permiten explorar y predecir patrones de comportamiento, clasifican y diferencian los datos, ii métodos no supervisados que se encargan únicamente de la clasificación (agrupamiento) de datos. Respecto a los métodos supervisados las técnicas más aplicadas son el análisis de componentes principales PCA y análisis de la función discriminante. [1]

**Huella digital:** resultado del análisis del perfil aromático de una muestra; permite identificar respuestas características y se obtiene a partir de análisis estadístico multivariado.

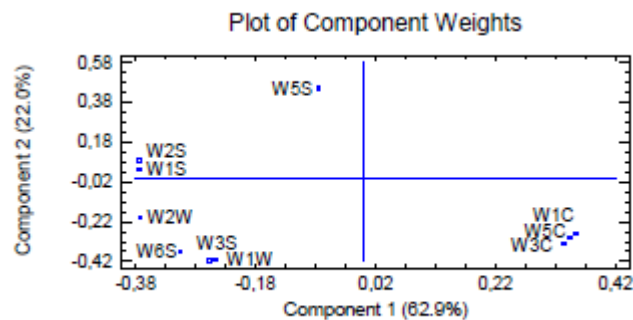



Fig.2 Plot of Component weights obtained with electronic nose data analysis

Figura No. 1 Análisis de la respuesta de los sensores para una muestra cualquiera

Fuente [1]

**Nariz electrónica:** instrumento que simula el sentido del olfato del cuerpo humano. Es un dispositivo que tiene un arreglo de sensores encargado de detectar y distinguir olores en diferentes matrices (farmacéuticas, cosméticas, alimenticias, entre otras) [2]. El objetivo de éste equipo es generar una huella digital a partir de los volátiles liberados por la muestra en un espacio de cabeza; no identifica sustancias pero es sensible a grupos funcionales, lo que le permite monitorear el producto y establecer su perfil aromático según las condiciones en las que se encuentre [3]. Este procedimiento no es destructivo y una de las aplicaciones en alimentos ha sido el control de la

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL AROMÁTICO DE BAYAS POR MEDIO DE NARIZ ELECTRÓNICA</b>	Página 2 de 5

maduración en las frutas y los cambios durante el periodo de vida útil de productos procesados [4-7]. El equipo se compone de tres partes [2]: i. el sistema para el manejo de muestra: sistema de inyección por medio del cual se absorben los volátiles y se transportan hasta la cámara de detección, ii. sistema de detección: arreglo de sensores (generalmente fabricados con un óxido metálico) que al interactuar con los volátiles química y físicamente transforman la respuesta en términos de conductividad y iii. un dispositivo para el procesamiento de información.[1]

**Perfil aromático:** respuesta de los sensores de una nariz electrónica a la interacción con las moléculas responsables del olor de un alimento o en general de una muestra.

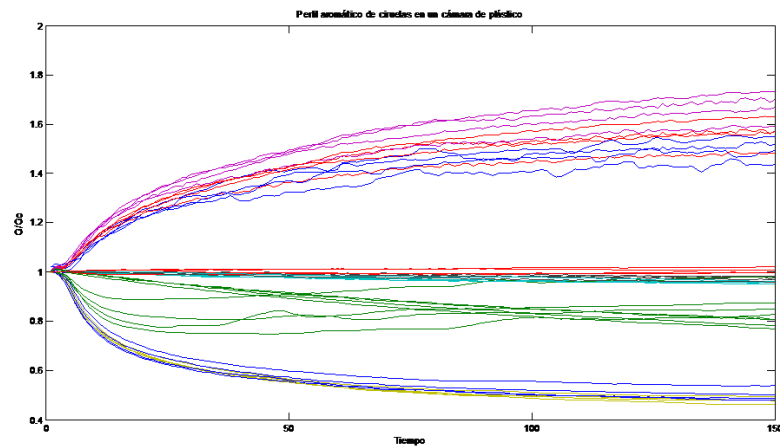


Figura No. 2 Perfil aromático de ciruelas en una cámara de plástico

#### 4. NOTAS DE SEGURIDAD Y CONSIDERACIONES GENERALES

##### Seguridad

Es indispensable el uso del material de protección como bata, gafas de seguridad y guantes.

##### Generalidades


La nariz electrónica debe utilizarse en ambientes preferiblemente aislados de olores fuertes y material particulado para no afectar los resultados.

Los recipientes plásticos donde se concentran los aromas deben estar libres de olores que alteren los resultados.

La cantidad de muestra a evaluar debe asegurar que en el recipiente haya un espacio de libre igual a 1/3 del volumen total.

En el momento de la lectura el vial debe estar formando un ángulo recto con el soporte, se deben evitar los movimientos tanto del vial como de la aguja y el contacto de ésta con las paredes.

Las paredes de la cámara de concentración no deben estar untadas de muestra, de lo contrario se pueden generar errores en la lectura.

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL AROMÁTICO DE BAYAS POR MEDIO DE NARIZ ELECTRÓNICA</b>	Página 3 de 5

Trate de organizarse para que pueda realizar el análisis de más de una muestra de manera continua.

## 5. PRINCIPIO DE LA TÉCNICA

Las etapas para la determinación de un perfil aromático son:

-Generación de volátiles: los alimentos son almacenados en frascos sellados en los que se asegura un espacio de cabeza proporcional al volumen del recipiente donde se acumulan las sustancias volátiles encargadas de darle el aroma característico; algunas muestras requieren de calentamiento y otras a condiciones ambiente puede lograr la el equilibrio entre las fases y una concentración mínima para ser detectada por los sensores de la nariz.

-Transporte de volátiles: el contenido del espacio de cabeza debe ser transportado hasta la cámara de los sensores para poder ser detectado, para esto se utiliza una jeringa y dos bombas (al interior del equipo) que se encargan de controlar el flujo.

-Análisis de la señal: los 10 sensores con los que cuenta el equipo interactúan con las sustancias enviando respuestas en términos de conductividad. Esta información es almacenada, descargada y analizada; para su interpretación es necesario recurrir a herramientas del análisis multivariado que dará como resultado un gráfico correspondiente a la huella digital aromática del producto analizado

## 6. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras a analizar serán frutas pequeñas, en cualquier estado de madurez, que puedan ser ubicadas en los recipientes plásticos dispuestos para este fin, en una cantidad tal que asegure el espacio de cabeza y almacenados un tiempo determinado e igual para cada muestras que permita la concentración de sus compuestos volátiles. Es importante la homogeneidad de la muestra (que las condiciones de cada fruto en una misma lectura sean uniformes) para no alterar la reproducibilidad de los datos.

## 7. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

### Equipos:

Nariz electrónica (Airsense PEN3 equipada con 10 sensores)

Balanza analítica

### Materiales y reactivos:

Recipientes plásticos (cámara de concentración)

Septum

Espátula-cuchara


Cinta pegante

Agujas para jeringa

## 8. PROCEDIMIENTO

### Determinación del perfil aromático

- Encender la nariz y luego iniciar el software en el computador (ver documento de manejo del equipo).
- Pesar 25g de fruta y llevarla al vial de plástico (sin cerrarlo)
- Ajustar los parámetros de la nariz:
  - Flujo de cámara: 70ml/min
  - Flujo de inyección: 60ml/min

 <p>UNIVERSIDAD <b>NACIONAL</b> DE COLOMBIA</p>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL AROMÁTICO DE BAYAS POR MEDIO DE NARIZ ELECTRÓNICA</b>	Versión: 1.0

Tiempo de limpieza de sensores: 450s

Tiempo de lectura de muestra: 150s


- d. Iniciar con la limpieza de sensores, pasados 150s de este paso cerrar el vial de la muestra que se desea analizar; asegúrese de pegar el septum en la abertura de la tapa y de que el frasco no tenga escapes.
- e. Una vez finalice la limpieza del sensor introduzca la aguja por el orificio de la tapa y permita que el equipo realice la lectura durante el tiempo definido.
- f. Guarde el archivo (ver documento de manejo del equipo)
- g. Limpie de nuevo los sensores, ya sea para analizar otra muestra o para dejar el equipo en condiciones adecuadas para el próximo análisis.
- h. Descargue los datos de cada sensor durante todo el tiempo de análisis (ver documento de manejo del equipo)

## 9. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Análisis estadístico multivariado que depende del objetivo de las medidas

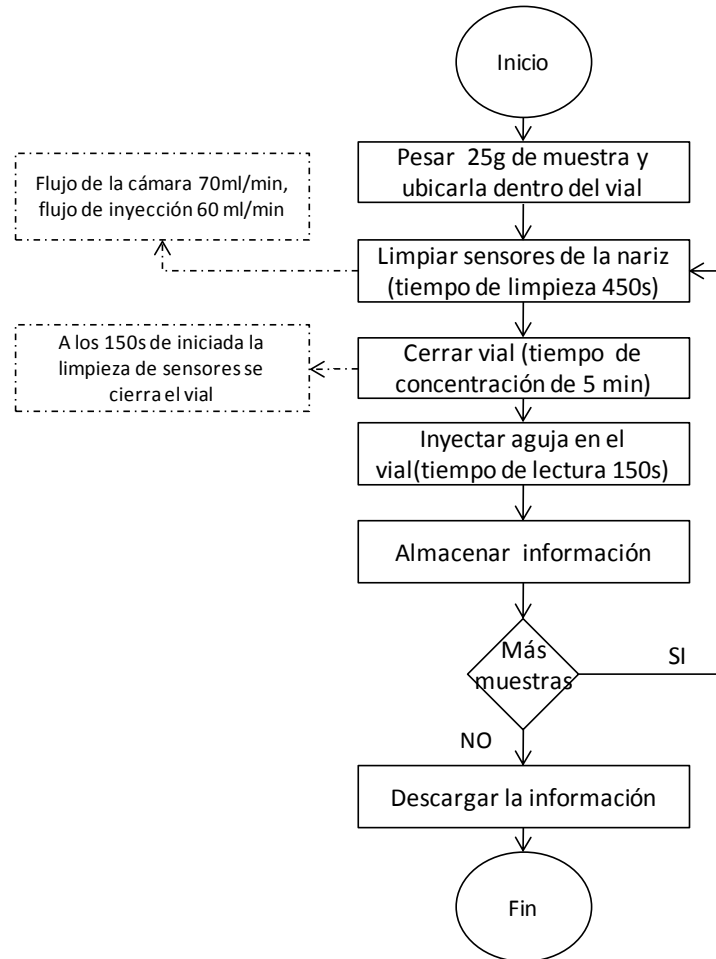
## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Zuluaga, C.M., *Análisis Quimométrico para Diferenciar la Huella Digital de los Productos de las Abejas en Colombia*, in *Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos*. 2010, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín: Medellín, Antioquia. p. 245.
2. Peris, M. and L. Escuder-Gilabert, *A 21st century technique for food control: Electronic noses*. *Analytica Chimica Acta*, 2009. **638**(1): p. 1-15.
3. Pathange, L.P., et al., *Non-destructive evaluation of apple maturity using an electronic nose system*. *Journal of Food Engineering*, 2006. **77**(4): p. 1018-1023.
4. Torri, L., N. Sinelli, and S. Limbo, *Shelf life evaluation of fresh-cut pineapple by using an electronic nose*. *Postharvest Biology and Technology*, 2010. **56**(3): p. 239-245.
5. Benedetti, S., et al., *Electronic nose as a non-destructive tool to characterise peach cultivars and to monitor their ripening stage during shelf-life*. *Postharvest Biology and Technology*, 2008. **47**(2): p. 181-188.
6. Brezmes, J., et al., *Fruit ripeness monitoring using an Electronic Nose*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2000. **69**(3): p. 223-229.
7. Lebrun, M., et al., *Discrimination of mango fruit maturity by volatiles using the electronic nose and gas chromatography*. *Postharvest Biology and Technology*, 2008. **48**(1): p. 122-131.

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b>	<b>MACROPROCESO GESTIÓN DE LABORATORIOS</b>	Código:
	<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL AROMÁTICO DE BAYAS POR MEDIO DE NARIZ ELECTRÓNICA</b>	Versión: 1.0

### ANEXOS

#### DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL AROMÁTICO





## Bibliografía

1. Balasundram, N., K. Sundram, and S. Samman, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 2006. 99(1): p. 191-203.
2. J Pokorný, I.o.C.T., N.Y. Czech Republic, Institute of Organic Chemistry,, and U.o.R. M Gordon, *Antioxidants in Food*, ed. I. o.C.T. J Pokorný, N.Y. Czech Republic, Institute of Organic Chemistry,, and U.o.R. M Gordon. 2001, Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
3. Wang, L.-S. and G.D. Stoner, Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 2008. 269(2): p. 281-290.
4. Kris-Etherton, P.M., et al., Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 2002. 113(9, Supplement 2): p. 71-88.
5. Apuesta Exportadora Agropecuaria, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 2006-2020, M.d.A.y.D. Rural, Editor. 2005. p. 19.
6. Talcott, S.T., Chapter 2: Chemical components of berry fruits, in *Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion*, Y. Zhao, Editor. 2007, CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL.
7. Eudes de Jesús Velásquez Chaverra, C.H.A.W., *Anuario Estadístico de Frutas y Hortalizas 2004-2008 y sus Calendarios de Siembras y Cosechas*, M.d.A.y.D. Rural, Editor. 2009: Bogotá. p. 290.
8. Zhao, Y., *Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion*. 2007, Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group.
9. Boletín informativo CEF Número 9 Distribución e Agraz o Mortiño (*Vaccinium* spp.) en Antioquia. [online] [cited 2010 27 mayo]; Available from: <http://www.ica.gov.co/CEF/boletines/boletin09.htm>



10. Ligarreto Moreno, G.A., Agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz), algunas prácticas de cultivo y poscosecha. 2011, Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
11. Mitcher, D. Balance Sector Industrial 2011. 2011 [cited 2012 28 de mayo]; Available from:  
[http://www.dnp.gov.co/LinkClick.aspx?fileticket=v7DGHcl\\_gbw%3D&tabid=1436](http://www.dnp.gov.co/LinkClick.aspx?fileticket=v7DGHcl_gbw%3D&tabid=1436).
12. Benedetti, S., et al., Electronic nose as a non-destructive tool to characterise peach cultivars and to monitor their ripening stage during shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*, 2008. 47(2): p. 181-188.
13. Zuluaga, C.M., Análisis Químico para Diferenciar la Huella Digital de los Productos de las Abejas en Colombia, in Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos. 2010, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín: Medellín, Antioquia. p. 245.
14. Brezmes, J., et al., Fruit ripeness monitoring using an Electronic Nose. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2000. 69(3): p. 223-229.
15. García, M., et al., Electronic nose for ham discrimination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006. 114(1): p. 418-422.
16. García, M., et al., Artificial olfactory system for the classification of Iberian hams. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2003. 96(3): p. 621-629.
17. García-González, D.L., et al., Relationship between sensory attributes and volatile compounds qualifying dry-cured hams. *Meat Science*, 2008. 80(2): p. 315-325.
18. Panagou, E.Z., et al., Table olives volatile fingerprints: Potential of an electronic nose for quality discrimination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008. 134(2): p. 902-907.
19. Di Natale, C., et al., The evaluation of quality of post-harvest oranges and apples by means of an electronic nose. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2001. 78(1-3): p. 26-31.
20. Trihaas, J., L. Vogensen, and P.V. Nielsen, Electronic nose: New tool in modelling the ripening of Danish blue cheese. *International Dairy Journal*. 15(6-9): p. 679-691.
21. Magalhães, L.M., et al., Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 2008. 613(1): p. 1-19.

22. Oliveira, I., et al., Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Research International*, 2011. 44(5): p. 1401-1407.
23. Vasco, C., J. Ruales, and A. Kamal-Eldin, Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 2008. 111(4): p. 816-823.