

EFFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ANTIOXIDANTES DE PRODUCTOS DERIVADOS DEL FRUTO AGRAZ (*VACCINIUM MERIDIONALE SWARTZ*)

EFFECT OF STORAGE TIME ON THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND ANTIOXIDANTS OF PRODUCTS DERIVED OF ANDEAN BERRY (*VACCINIUM MERIDIONALE SWARTZ*)

Yuly Nataly FRANCO TOBÓN. ND¹, Benjamín ROJANO PhD², Andrés Felipe ALZATE ARBELÁEZ, QF². Claudia Estela RESTREPO FLOREZ Msc³, Diana Marsela RIVERO BARRIOS IA³. María Elena MALDONADO CELIS. PhD^{1*}

Recibido: Julio 19 de 2016 Aprobado: Noviembre 28 de 2016

RESUMEN

Antecedentes: Agraz es una baya globosa, de color púrpura intenso cuando está madura. Posee alta capacidad antioxidante comparada con bayas del mismo género, atribuido al contenido de compuestos polifenólicos. **Objetivo:** Evaluar la composición, actividad antioxidante y algunos parámetros microbiológicos de pulpa de agraz congelada (PAC) y pulpa de agraz liofilizada (PAL) y analizar su comportamiento durante 60 días de almacenamiento. **Métodos:** Se midieron pH, °Brix, acidez titulable, % humedad, cenizas, grasa, proteína, carbohidratos, calorías totales y actividad acuosa a intervalos de 15 días durante el almacenamiento. En las mismas condiciones se determinó el contenido de fenoles y antocianinas totales mediante Folin-Ciocalteu y método diferencial de pH, respectivamente. La actividad antioxidante mediante FRAP y ORAC. **Resultados:** no presentaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) durante el almacenamiento en pH, °Brix, a_w (liofilizado), % humedad, grasa, cenizas, carbohidratos y calorías totales para PAC y PAL, indicando estabilidad de estas variables a través del tiempo de almacenamiento. La acidez titulable expresada en mg de ácido cítrico/ml, varió significativamente ($p < 0,05$) a través del tiempo de almacenamiento para PAC y PAL entre 1,65-1,82 y 4,66-4,79 respectivamente. La proteína varió durante el almacenamiento para PAC y PAL entre 1,25-2,10 g y 4,70-5,20 g, y se observó para ambos un aumento significativo entre el día 15 y 60 de almacenamiento. PAC y PAL presentaron pérdidas significativas del contenido de antocianinas, fenoles totales y valor FRAP durante el almacenamiento; sin embargo la PAL conservó hasta el día 60 alto contenido de fenoles totales: 1046 mg eq de ácido gálico/100g), antocianinas totales: 82,64 (mg eq de cianidin-3-glicosido/100g), capacidad reductora (FRAP): 1032,17 mg de equivalentes de ácido ascórbico/100g y valor ORAC 33935 μmol de equivalentes de Trolox/100g. **Conclusión:** las variables fisicoquímicas analizadas en la PAL fueron estables y se conservó el contenido de compuestos polifenólicos por mayor tiempo comparado con la PAC. Considerando que el agraz tiene dos temporadas de cosecha al año en Colombia (mayo y diciembre), la liofilización es una estrategia que permitirá al productor abastecimiento constante de la fruta para el mercado.

Palabras clave: *Vaccinium meridionale*, actividad antioxidante, almacenamiento, fenoles, antocianinas.

¹ Grupo Impacto de los Componentes Alimentarios en la Salud ICAS, Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

² Laboratorio de Ciencia de los Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Medellín, Colombia.

³ Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria INTAL.

* Autor de correspondencia: maria.maldonado@udea.edu.co

ABSTRACT

Background: Andean berry is a globose berry, deep purple when it reaches its highest degree of maturity. Its fruit has a high antioxidant capacity compared to other *Vaccinium* berries, attributed to the content of polyphenolic compounds. **Objectives:** To evaluate the composition, antioxidant activity and some microbiological parameters of frozen pulp of Andean berry (PAC) and freeze-dried pulp of Andean berry (PAL) and analyze their behavior during 60 days of storage. **Methods:** the variables pH, ° Brix, titratable acidity, % moisture, ash, fat, protein, carbohydrates, total calories and water activity (lyophilized) were measured at intervals of 15 days during storage. Under the same conditions the content of phenols and total anthocyanins by *Folin-Ciocalteu* and pH differential method respectively was determined. The antioxidant activity by FRAP and ORAC. **Results:** There were no significant differences ($p > 0,05$) during storage in pH, ° Brix, Aw (lyophilized), % moisture, fat, ash, carbohydrates and total calories for PAC and PAL indicating stability of these variables over time storage. Titratable acidity expressed in mg citric acid/ml, varied significantly $p (< 0,05)$ over time storage for PAC and PAL between 1.65 to 1.82 and 4.66 to 4.79 respectively. The protein varied during storage for PAC and PAL between 1.25 to 2.10 g and 4.70 to 5.20 g, and was observed for both a significant increase between day 15 and 60 of storage. PAC and PAL showed significant losses of anthocyanins, total phenols and FRAP value during storage; however the PAL retained until day 60 high content of total phenols: 1046 (mg gallic eq/100 g acid), anthocyanins: 82.64 (mg eq of cyanidin-3-glucoside/100g), reducing capacity (FRAP): 1032.17 mg ascorbic acid equivalents /100 g and ORAC value 33935 μmol equivalents Trolox/100g. **Conclusions:** physicochemical variables analyzed in the PAL were stable and content of polyphenolic compounds retained for longer compared to PAC. Whereas Andean berry has two growing seasons a year in Colombia (May and December), freeze-dried is a strategy that will allow the producer constant supply of fruit on the market.

Keywords: *Vaccinium meridionale*, physicochemical, antioxidant activity, storage, phenols, anthocyanins.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las personas buscan alimentos más saludables, que además de suplir la necesidad fisiológica de alimentarse, puedan aportar beneficios para su salud, lo que cobra importancia en el momento de elegir lo que consumen (1, 2, 3, 4). Las frutas han despertado gran interés, porque además de contener alta cantidad de agua (entre un 80% y un 90% de su peso total); macronutrientes (proteínas, lípidos, carbohidratos entre 0 y 80% del peso seco) y micronutrientes (vitaminas y minerales) (5) contienen también, compuestos con actividad biológica, conocidos como compuestos bioactivos que además confieren aroma, color y sabor (6) y a su vez, tienen propiedades funcionales como la capacidad de prevenir enfermedades entre ellas algunos tipos de cáncer, problemas cardiovasculares y neurodegenerativos (2,3,7,8).

Una clase de frutas que forma parte de la dieta son las bayas del género *Vaccinium*, que incluye la mora azul, mora negra, el arándano; algunas de las cuales son consumidas en fresco y/o en formas procesadas (mermeladas, yogurt y jugos). Estas frutas son una fuente de ácidos fenólicos, anto-

cianinas, flavonoides, flavonoles, entre otros, (9) este contenido varía de acuerdo a factores genéticos y ambientales que afectan consecuentemente su actividad biológica. Los compuestos polifenólicos han demostrado poseer varios efectos positivos sobre la salud humana, con el potencial de prevenir el daño oxidativo causado por especies reactivas del oxígeno, y poseen actividad preventiva contra una amplia gama de enfermedades degenerativas, que implica el estrés oxidativo, la inflamación y la carcinogénesis (3,10).

La especie *Vaccinium meridionale* Swartz, pertenece a la familia Ericaceae (11), posee frutos de forma globosa, de color verde en estado inmaduro y tonos rojizos a púrpura intenso cuando están maduros (12). Es común encontrarlos entre altitudes de 2100 y 3500 msnm y en regiones de clima frío entre 13 y 22°C. (13) y se presentan dos momentos de mayor cosecha anual: en mayo y en diciembre, además la composición nutricional del fruto puede variar de acuerdo al origen de este y variedad analizada. (11)

Existen estudios que evalúan las características físicoquímicas para la fruta fresca, reportando valores de sólidos solubles de 7,00 (14) 13,8 (13) y 11,1 (15) °Brix Valores de pH 2,1 (13) 2,85 (16) y 2,95

(15). Acidez titulable expresada como gramos ácido cítrico/100 g de fruta: 3,0 (13) 1,35 (16) y 2,22 (15).

Estudio realizado por Bernal y colaboradores en el año 2012 reporta para la pulpa de agraz proveniente de Boyacá (Colombia), sin piel, ni semillas, valores de humedad 85,15%; °Brix 10,5; pH 2,94; acidez titulable 2,13 g ácido cítrico/100 g y para pulpa concentrada a 1 atmósfera de presión y 75°C valores de % humedad 78,9; °Brix 16,3; pH 2,87 y acidez titulable 2,88 g ácido cítrico/100 g (15).

Otro estudio realizado por Ávila y colaboradores en el año 2007 (17), durante un tiempo de almacenamiento del fruto entero por 9 días, reportó valores de sólidos solubles entre 14,13 - 14,73 °Brix; pH entre 3,12 - 3,05; acidez titulable entre 1,44 - 1,52 g ácido cítrico/100 g. Se reportan valores de fenoles totales en 201 mg de equivalentes de ácido gálico/100g de fruta fresca de 201 (12); 758,6 (16) y 1373 (18). Para el contenido de antocianinas totales en mg eq cianidin-3 glucósido/100g de fruta fresca, se reportan valores de 609 (12); 319 (16) y 271,9 (18). La capacidad antioxidante medida por el método FRAP en mg equivalentes de ácido ascórbico/100 g fruta fresca, reportada es de 581 (12); 375 (18) y FRAP 87,0 μ mol de equivalentes de Trolox/g (16). Existe estudio que evalúa la capacidad antioxidante en extracto de fruta liofilizada, reportando fenoles totales 2546 mg equivalentes de ácido ascórbico (GAE) y antocianinas totales 150,7 mg de cianidin 3 glucósido (C3G) (19). Los estudios existentes han evaluado el análisis proximal y/o fitoquímico en un único momento, a través de los estadios de maduración durante la cosecha (20) o durante 9 días de almacenamiento postcosecha del fruto entero (17); sin embargo no existen estudios que evalúen el comportamiento de dichas características a través del tiempo de almacenamiento en la fruta fresca y procesada, por tal motivo este estudio tiene como objetivo describir los cambios en la composición fisicoquímica, proximal, actividad antioxidante y algunos parámetros microbiológicos de pulpa de agraz maduro almacenado (PAC) entre $-10 \pm 2^\circ\text{C}$ y pulpa de agraz maduro liofilizada (PAL) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante un periodo de almacenamiento de 60 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Bayas frescas, maduras (color negro-violáceo), obtenidas del municipio del Retiro (Antioquia,

Colombia), Kilómetro 2, Vereda Puente Peláez, Parcelación La Guija N° 7, con una altura de 2175 msnn, temperatura promedio de 16°C y recogidas al azar para el estudio.

Preparación de pulpa congelada (PAC) y pulpa liofilizada (PAL)

Las bayas fueron lavadas, seleccionadas, desinfectadas con hipoclorito de sodio (100 ppm), y licuadas por 2 min a 2500 rpm, con piel y semillas incluidas. El 50% de esta pulpa fue almacenada a $-10^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, empacada en porciones de 200g en empaque coestruido de poliamida y polietileno flexible 70 micras. El 50% restante se liofilizó en cámara de vacío a presión 0,427 + 0,5 mm Hg, a temperatura de -50°C y se almacenó a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, protegido de la luz, en cantidades de 200g en empaque PET aluminio, polietileno de baja densidad.

Reactivos y equipos

Metanol, tricloruro de hierro, 2, 4, 6 -tri(2-piridil) triazina (TPTZ), Trolox® (Acido 6-hidroxi- 2,5,8-tetrametilchromano-2-carboxylic), ácido ascórbico, ácido gálico, carbonato de sodio, persulfato de potasio fueron obtenidos de Sigma Chemical®; Folin-Ciocalteu fue obtenido de Merck®. El agua usada en los experimentos era grado HPLC. Los ensayos de absorción UV-Vis se hicieron en un espectrofotómetro Jenway® 6405 y en lector de placas Thermo Scientific Multiskan® Spectrum UV-Vis. Los ensayos ORAC fueron realizados en espectrofotómetro de fluorescencia, PerkinElmer® LS55.

Acidez Titulable (AT), pH, °Brix (21)

La AT se determinó usando el método AOAC 942.15A por titulación de la muestra (2 g de homogeneizado + 50 mL de agua destilada libre de CO_2) con solución estandarizada de NaOH 0,1 N a pH 8,2. Fue expresada en % de ácido cítrico por 100 g de fruta. El pH se realizó de acuerdo a la AOAC 981.12, en 2 g de homogeneizado por un pH-metro Metrohm modelo 744. Para la medición de los sólidos solubles refractométrico AOAC 932.12 y realizada la lectura, en refractómetro digital Pocket PAL® 88S (Japón).

Análisis de Composición Proximal (21)

Se determinaron parámetros como humedad según la AOAC 931.04; grasa total de acuerdo a la Guía Técnica Colombiana (GTC) 6.1 (22); cenizas

totales siguiendo la AOAC 923,03, proteína total, de acuerdo a la AOAC 954,01. Carbohidratos y calorías totales, a partir de los componentes y actividad acuosa, siguiendo la AOAC 978.18.

Determinación del contenido de antocianinas

Se utilizó el método diferencial de pH (23). La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro Jenway® 6405 UV/ Vis a 530 nm y 700 nm en buffers pH 1,0 y 4,5, usando $A = [(A_{530} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{530} - A_{700})_{pH4.5}]$, con un coeficiente de extinción molar para el cianidin-3-glucósido (C-3-G) de 26900. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de cianidin-3-glucósido (C3G) por 100 g de fruta fresca, en el caso de la pulpa; para el liofilizado se expresaron los resultados como miligramos equivalentes de cianidin-3-glucósido por 100 g de fruta seca. Las mediciones fueron replicadas tres veces.

Determinación del contenido de fenoles totales

Se realizó por el método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu* (24). Dicho reactivo está compuesto por una mezcla de ácido fosfotungstenico y ácido fosfomolibdico, los cuales, después de la oxidación de los fenoles, se reducen a una mezcla de óxidos de tungsteno y molibdeno de color azul, dichos óxidos presentan un máximo de absorción a 760 nm, por lo tanto se cuantificó mediante espectrofotometría de luz visible. Para expresar la concentración de los fenoles totales, se utilizó el ácido gálico como reactivo de referencia, construyendo una curva patrón. Se diluyó la muestra a una concentración del 10% en la cual el contenido de fenoles se encontrara dentro del intervalo de la curva patrón. Para realizar la medición se preparó una solución de carbonato de sodio al 7.5%, y la solución de Folin diluida, que finalmente se mezclaron con la muestra y se dejó reaccionar por 1 hora en la oscuridad, cuando pasó este tiempo se midió la absorbancia en un lector de placas Thermo Scientific Multiskan® Spectrum UV-Vis, a una longitud de onda de 760 nm. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de fruta fresca, para el caso de la pulpa y para el caso del liofilizado los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GA)/100 g de fruta seca. Las mediciones fueron realizadas por triplicado.

Determinación de la actividad antioxidante

Poder reductor FRAP

Este método evaluó la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}), que tuvo un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm. (25) Este ensayo se llevó a cabo en un buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3,4), que contenía TPTZ y $FeCl_3$. Se utilizaron 900 mL de esta solución, 50 mL de muestra y 50 mL de agua destilada. Luego de 60 min de reacción se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm en un espectrofotómetro Jenway® 6405 UV/Vis. Para cada muestra se tuvo en cuenta la lectura de la absorbancia del blanco sin cromóforo. La curva de referencia se construyó usando ácido ascórbico como patrón primario. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Ensayo ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

El procedimiento experimental fue basado en reportes (26) *Ou et al*, 2001, empleando el estándar de Trolox y condiciones controladas de temperatura 37°C y pH 7,4. Las lecturas se realizan a una λ de excitación 493 nm con *slit* de excitación 10 nm; y λ de emisión 515 nm con *slit* de emisión 15 nm, atenuador del 1%. Para el desarrollo de la técnica se utilizan soluciones de fluoresceína 1×10^{-2} M en PBS (75mM) AAPH 0,6 M, en PBS, (75mM). La muestra contiene 21 μ l de fluoresceína, 2,899 μ l de PBS, 30 μ l de diluciones de agraz y 50 μ l de AAPH. El efecto protector antioxidante de las muestras se calculó usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de fluoresceína entre un blanco y la muestra, se comparó contra la curva del trolox y se expresa en valores TEAC/100g muestra (μ mol equivalentes de trolox por 100g de muestra), de acuerdo a la Ecuación 1.

$$ORAC = \frac{(AUC - AUC^0)}{(AUC_{Trolox} - AUC^0)} f [Trolox] \quad (1)$$

Donde AUC es el área bajo la curva de la muestra, AUC^0 el área bajo la curva para el control, AUC_{Trolox} área bajo la curva para el trolox, f es el factor de dilución de la muestra. La fluoresceína se midió en un espectrofotómetro de fluorescencia PerkinElmer® LS55.

Análisis microbiológico

La contaminación microbiológica de coliformes totales y fecales fue analizada en la pulpa, mientras que la de hongos y levaduras se analizó en el liofilizado durante los días 1, 15, 35 y 60 de almacenamiento.

Se evaluó la calidad microbiológica para coliformes según la NTC 4458 de 2007 (27), para este análisis las muestras fueron diluidas 1/10 y homogenizadas durante cinco minutos para preparar las diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} en agua peptonada. Se incubó a profundidad 1 mL de cada dilución en agar Cromo Coult, y se dejaron a 37 °C por 48 h. La cantidad de hongos filamentosos y levaduras fueron evaluados de acuerdo a la NTC 4132 de 1997 (28) de la siguiente manera: alícuotas de 1 mL de cada dilución fueron sembradas en cajas Petri con medio CGA (cloranfénicol glucosa agar). La incubación se llevó a cabo a 25 °C por cinco días y se realizó la respectiva lectura.

Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar, comprobando homogeneidad de varianza por Levens y se realizaron las respectivas pruebas de normalidad. Para determinación de significancia estadística se usó la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI y el IBM SPSS Statistics versión 19.

RESULTADOS

Análisis microbiológico

Los resultados microbiológicos, se muestran en la Tabla 1 y 2.

Tabla. 1 Recuento de coliformes totales y fecales en pulpa de agraz almacenada a -10 ± 2 °C

Tiempo (días)	Coliformes Totales UFC/g	<i>E. coli</i> UFC/g
0	<10	<10
15	<10	<10
35	<10	<10
60	<10	<10

Tabla. 2 Crecimiento de mohos y levaduras en pulpa de agraz liofilizada a 25 ± 2 °C

Tiempo (días)	Recuento de Mohos UFC/g	Recuento de Levaduras UFC/g
0	200	<10
15	140	<10
35	130	<10
60	80	<10

Propiedades fisicoquímicas: acidez titulable, pH, sólidos solubles, actividad acuosa (a_w).

En las Tablas 3 y 4 se muestran los valores de pH determinados en la PAC y PAL entre 2,87-2,80 y 3,01- 3,02 durante el tiempo de almacenamiento. No se encontró efecto significativo del tiempo del almacenamiento sobre el pH en ambos productos.

Tabla 3. Características fisicoquímicas de pulpa de agraz congelada almacenada a $-10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Media \pm Desviación Estándar

PULPA DE AGRAZ									
Días	pH	Acidez titulable ¹	Sólidos solubles ²	Humedad ³	Proteína total ⁴	Grasa total ⁴	Cenizas totales ⁴	CHOS totales ⁵	Calorías totales ⁶
0	2,87 \pm 0,01	1,65 \pm 0,01	11,48 \pm 0,65	83,22 \pm 0,87	1,25 \pm 1,35	0,19 \pm 0,08	0,28 \pm 0,04	15,02 \pm 0,52	60,09 \pm 2,08
15	2,82 \pm 0,08	1,70 \pm 0,01	11,45 \pm 0,53	83,58 \pm 1,28	1,10 \pm 1,49	0,14 \pm 0,08	0,28 \pm 0,03	14,83 \pm 0,81	59,33 \pm 3,22
30	2,80 \pm 0,09	1,68 \pm 0,02	11,25 \pm 0,74	83,34 \pm 0,45	1,26 \pm 1,33	0,21 \pm 0,05	0,29 \pm 0,03	14,86 \pm 0,30	59,43 \pm 1,21
45	2,83 \pm 0,02	1,80 \pm 0,01	11,78 \pm 0,44	82,87 \pm 0,21	1,62 \pm 1,26	0,23 \pm 0,03	0,30 \pm 0,02	14,95 \pm 0,31	59,81 \pm 1,24
60	2,85 \pm 0,04	1,82 \pm 0,01	11,75 \pm 0,25	83,37 \pm 0,73	2,10 \pm 1,27	0,22 \pm 0,04	0,49 \pm 0,24	13,78 \pm 1,02	55,13 \pm 4,06

¹mg ácido cítrico/ml). ²°Brix. ³%. ⁴g/100g de muestra. ⁵ Carbohidratos totales g/100 g de muestra. ⁶ Kcal/100g muestra.

Tabla 4. Características fisicoquímicas de la pulpa de agraz liofilizada almacenada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Media \pm Desviación Estándar

PULPA LIOFILIZADA DE AGRAZ										
Días	pH	Acidez titulable ¹	Sólidos solubles ²	a_w	Humedad ³	Proteína total ⁴	Grasa total ⁴	Cenizas totales ⁴	CHOS totales ⁵	Calorías totales ⁶
0	3,01 \pm 0,04	4,66	5,02 \pm 0,08	0,17 \pm 0,04	5,28 \pm 0,01	4,70 \pm 1,09	1,44 \pm 0,18	1,75 \pm 0,03	86,82 \pm 0,32	347,27 \pm 1,27
15	2,96 \pm 0,07	4,7	5,02 \pm 0,12	0,18 \pm 0,06	5,67 \pm 0,17	4,27 \pm 1,11	1,22 \pm 0,13	1,79 \pm 0,05	87,03 \pm 0,63	348,13 \pm 2,51
30	3,01 \pm 0,12	4,7	4,90 \pm 0,09	0,20 \pm 0,02	6,40 \pm 0,19	4,33 \pm 1,13	1,45 \pm 0,14	1,78 \pm 0,06	86,02 \pm 0,59	344,08 \pm 2,35
45	3,01 \pm 0,09	4,75	4,90 \pm 0,09	0,21 \pm 0,03	7,48 \pm 0,58	4,92 \pm 1,13	1,36 \pm 0,23	1,78 \pm 0,06	84,43 \pm 1,04	337,72 \pm 4,16
60	3,02 \pm 0,11	4,79	5,02 \pm 0,04	0,23 \pm 0,04	7,52 \pm 1,11	5,20 \pm 1,01	1,41 \pm 0,11	1,76 \pm 0,02	84,11 \pm 1,18	336,43 \pm 4,73

¹mg ácido cítrico/ml). ² °Brix. ³%. ⁴g/100g de muestra. ⁵ Carbohidratos totales g/100 g de muestra. ⁶ Kcal/100g muestra.

La acidez titulable varió a través del tiempo almacenamiento para la pulpa y el liofilizado entre 1,65-1,82 y 4,66-4,79 respectivamente, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el tiempo de almacenamiento inicial y los tiempos restantes para PAC y PAL.

La variación en el contenido de sólidos solubles totales durante el almacenamiento para PAC y PAL, expresados como °Brix fue 11,48-11,75 y 5,02-5,02 respectivamente. Dicha variación no fue significativa en el tiempo (Ver tabla 3 y 4).

El a_w del liofilizado presentó poco cambio durante el período de almacenamiento, presentando valores entre $0,17 \pm 0,04$ y $0,23 \pm 0,04$ (Tabla 4).

Análisis de Composición proximal

No se observaron diferencias significativas en el contenido de humedad entre el inicio y final del almacenamiento, tanto en PAC como en PAL. En PAC varió entre 83,22 y 83,37 %, y en PAL, entre 5,28 y 7,52 %.

En el contenido de proteína se observó aumento durante el almacenamiento para la PAC y PAL entre 1,25-2,10 y 4,70-5,20 g/100g respectivamente, siendo el cambio significativo entre el día 15 y el día 60 de almacenamiento.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) en el contenido de grasa total, cenizas y carbohidratos totales para PAC y PAL durante el almacenamiento.

Contenido de Metabolitos secundarios: Fenoles Totales y Antocianinas Totales

En la Figura 1A se presentan los valores obtenidos para el contenido de metabolitos secundarios fenoles y antocianinas totales durante el almacenamiento para PAC y PAL. Se presenta una disminución significativa del contenido de fenoles del día inicial al día 60 de almacenamiento ($p < 0,05$) 11,41% para PAC y 10,87% para PAL.

El contenido de antocianinas totales, (Figura 1B) presentó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la PAC de 21,6% y en la PAL se disminuyó en un 6,3%.

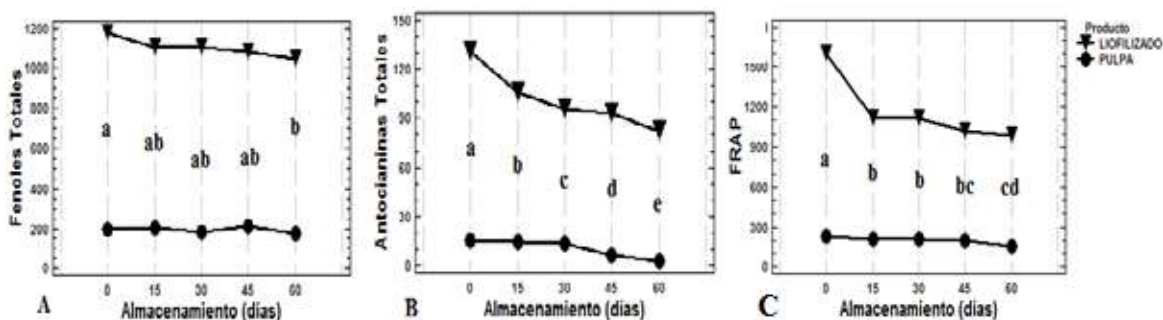


Figura 1A. Fenoles totales durante almacenamiento, expresados como mg equivalentes de ácido gálico/100 g de muestra. **B.** Antocianinas totales durante almacenamiento, expresadas como mg equivalentes de cianidin-3-glucósido/100 g de muestra **C.** FRAP durante el almacenamiento, expresado como mg equivalentes de ácido ascórbico/100g muestra. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Cambios en la Actividad Antioxidante

En la Figura 1C. Se muestra disminución significativa ($p < 0,05$), en el valor FRAP durante el almacenamiento. PAC (226,21- 152,92) presentó una disminución de 67,6% y PAL (1603,12-989,75) disminuyó 63,8%.

Debido a que los compuestos antioxidantes pueden actuar mediante diferentes mecanismos dependiendo del mecanismo de reacción o fuente radicalaria, y considerando el alto valor de FRAP encontrado en la PAL, se midió su capacidad atrapa-dora de radicales de oxígeno (ORAC), a los 60 días de almacenamiento, obteniendo un valor de ORAC de 33935 ± 2259 TEAC μmol de equivalentes de Trolox/100 g”.

DISCUSIÓN

Análisis microbiológicos

Los resultados microbiológicos indicaron que las condiciones de procesamiento y almacenamiento fueron adecuadas para la conservación de la PAC y la PAL de acuerdo a los parámetros evaluados en este estudio para cada de estos productos, puesto que todas las muestras analizadas cumplieron con los estándares microbiológicos para los parámetros analizados, de acuerdo con la NTC 4458 (27) de 1998 y la Resolución 3939 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social (29).

Propiedades fisicoquímicas: acidez titulable, pH, °Brix, actividad acuosa (a_w)

Los valores de pH para la PAC y para la PAL fueron consistentes con valores reportados en estudios previos para el fruto fresco encontrando valores de 2,17 (14) 2,92 (17) y 2,52 (25).

La diferencia significativa encontrada en la acidez titulable entre el día inicial de almacenamiento y los tiempos restantes, pudo deberse a la pérdida de agua, provocando aumento de la concentración al final del almacenamiento que generó la conservación y el aumento de la acidez (30). Ávila y colaboradores en el año 2007 (17), evaluaron esta característica en fruta fresca almacenada a 2°C durante 9 días, encontrando un rango de acidez titulable entre 1,44 a 1,63 mg ácido cítrico/ml, los resultados reportan valores mayores por dos posibles razones: la primera porque al convertir la fruta fresca en un producto (pulpa) se realiza un proceso mecánico que puede liberar ácidos orgánicos aumentando la acidez; esto

pudo evidenciarse también en estudio realizado por Bernal y colaboradores en el año 2012, quienes determinaron la AT en fruta fresca obteniendo un valor de 2,22 con un % de humedad inicial de 82,65 y al concentrar el fruto obtuvo una AT de 2,88 con una humedad de 78,9 (15, 31). La segunda razón podría deberse a que el fruto utilizado por Ávila y colaboradores fue proveniente de Chiquinquirá, Boyacá; mientras que el fruto de nuestro estudio proviene del municipio del Retiro, Antioquia, existiendo diferencias en la composición del fruto de acuerdo a la región de cosecha.

Con respecto a la fruta liofilizada, al deshidratarse, teniendo en cuenta que su composición es más del 80% de agua se origina una concentración de ácidos orgánicos que aumentan la acidez.

Los sólidos solubles no mostraron diferencia significativa, durante el tiempo de almacenamiento ($p > 0,05$), lo cual indica que no hay pérdidas de sólidos disueltos totales como azúcares durante el almacenamiento, debido a la inactivación por temperatura que sufren las enzimas, y algunas reacciones hidrolíticas no se ven favorecidas (32).

Para la pulpa estos valores se encuentran dentro del rango reportado también por otros autores para la misma baya reportando valores entre 11-12 °Brix (14) y entre 9,6 y 12 (20).

Los valores de °Brix para la PAL, no son consistentes con único estudio reportado por la literatura para agraz concentrado, el cual reporta un valor de °Brix de 16,3, esto puede explicarse porque existen diferencias entre ambos estudios, ellos concentraron exponiendo el fruto a - 75° y 1 atm, hasta un % de humedad de 78,9; mientras que en el estudio realizado, se liofilizó la pulpa de agraz en cámara de vacío a presión 0,427 + 0,5 mm Hg, a temperatura de - 50°C, obteniendo una PAL con un % de humedad de 5,28 y un valor de °Brix de 5,02 (15).

Con relación al a_w , esta propiedad se evaluó solo en el liofilizado, debido a que es un parámetro de calidad para dicho producto, que permite determinar la capacidad de su conservación, y se reduce cuando se extrae agua de los alimentos. La estabilidad de un producto se puede alcanzar cuando la a_w se encuentra entre 0,2 y 0,4, que corresponde a la humedad de la monocapa y se logra la conservación en condiciones ambientales (33), limitando la cantidad de agua disponible para el crecimiento de microorganismos y las reacciones oxidativas, hidrolíticas y enzimáticas, alargando la vida útil del producto (34). Los valores de dicha variable se

encontraron dentro de este rango reportado por la literatura, lo que indicó estabilidad del producto a través del tiempo y disminución del riesgo de proliferación microbiana, observando cumplimiento de los estándares microbiológicos (ver Tabla 2.)

Análisis de Composición proximal

El contenido de humedad, grasa total, cenizas totales, carbohidratos y calorías totales fueron muy estables a través del tiempo de almacenamiento en ambos productos y no presentaron variaciones significativas; los cambios entre la PAC y la PAL, son debidos claramente al proceso de transformación, debido a que en la PAL, se concentran todos los sólidos. La cantidad de carbohidratos y calorías totales ambos productos fue baja, lo que los hace más apreciables y benéficos para la salud.

Contenido de Metabolitos secundarios: Fenoles Totales y Antocianinas Totales

El contenido de fenoles totales en la PAC fue inferior a los valores reportados para la fruta fresca por Garzón et al 2010 (758,6±62.3 mg GAE/100g) (16); a su vez fue inferior al reportado para otras especies de *Vaccinium* como *V. floribundum* de Ecuador (882 mg GAE/100g de fruta fresca) (35); *V. Myrtillus* de Norte América (882 mg GAE/100g de fruta fresca) (36); *V. Corymbosum*, *V. ashei*, *V. angustifolium* (entre 190 y 473 mg GAE/100g de fruta fresca) (36). Aunque se observó disminución significativa de estos compuestos a través del tiempo de almacenamiento, dicha disminución fue mayor en la PAC, la presencia de mayor contenido de humedad, puede favorecer reacciones de degradación de algunos componentes entre ellos los fenoles, además el agua puede solubilizar oxígeno, oxidando así los fenoles (17). Los resultados indican que el proceso de liofilización permite concentrar el contenido de estos metabolitos secundarios del agraz, además la menor cantidad de agua presente en PAL, puede minimizar la pérdida de estos fitoquímicos.

El valor de antocianinas encontrado al inicio del período de almacenamiento de la PAL fue cercano al reportado en un estudio anterior de 159.7 mg/C3G/100 g fruta (19), en dicho producto se observó una disminución del contenido de antocianinas del 63,3%. En la PAC se observó una disminución de dicho contenido del 21,6% encontrando valores inferiores a los reportados por Garzón et al 2010 (300±28 mg C3G/100g fruta) (15) y Gaviria et al 2009 (201±10 mg C3G/100g fruta) (12).

Los resultados obtenidos permiten analizar que durante el procesamiento del fruto (pulpa congelada y pulpa liofilizada) se presentan grandes pérdidas de compuestos bioactivos, que pueden ocurrir debido a múltiples factores, entre ellos la ruptura de la matriz vegetal del fruto en el proceso mecánico, y a su vez la exposición a factores ambientales como la luz, el oxígeno, temperatura y acción enzimática de oxidasas. (37, 38).

Cambios en la Actividad Antioxidante

La inactivación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) puede darse por diferentes mecanismos, SET (*Single-Electron Transfer*), transferencia de electrones y HAT (*Hydrogen Atom Transfer*), transferencia de hidrógenos (39, 40). La actividad FRAP evalúa la capacidad antioxidante de acuerdo a su capacidad reductora siendo un mecanismo SET (17) y fue el mecanismo utilizado en este estudio para analizar la capacidad antioxidante de la pulpa y liofilizado de agraz.

Existen reportes de valores FRAP para el género *Vaccinium* de 581 mg de ácido ascórbico por cada 100g de fruta fresca (12), valor mayor que el observado para la PAC. Aunque en la PAL el valor FRAP disminuyó significativamente a través del tiempo, su capacidad reductora fue mayor a PAC, debido a reducción del contenido de humedad y concentración de los compuestos durante el procesamiento.

Los resultados mostraron que la PAL presentó un alto contenido de fenoles totales, lo que potencia el alto valor ORAC observado, encontrando un valor similar al reportado previamente por Zapata et al (2014) (41) de 34825,6 ± 819,7 μmol Trolox/100 g, una característica ya descrita por Prior et al 1998 en diferentes frutos del género *Vaccinium*. Lo anterior indica que la PAL puede ser considerado un alimento con mayor capacidad antioxidante, que la PAC analizada.

El estudio realizado amplía el conocimiento de un fruto como el agraz y permite ver en este, una materia prima, que puede ser aprovechada, por los floricultores y pequeños campesinos como una opción de cultivo, posibilitando el aumento de sus ingresos, a la vez se convierte en una opción para la industria alimentaria por la posibilidad de aprovechamiento para el desarrollo de productos novedosos, y el hecho de que solo tenga 2 picos altos de producción al año no sería un obstáculo para dicha industria, si se consideran opciones de procesado como la PAL aquí estudiada; además la baya y sus

productos ofrecen una opción de alimento para el consumidor, que cada día emprende la búsqueda de productos con potenciales beneficios para la salud.

LIMITACIONES

Las limitaciones de este estudio, estriban en el hecho de no haber determinado un perfil fenólico completo y poder determinar en el tiempo, cuáles compuestos fenólicos, específicos, sufren mayor deterioro; además sería importante también haber medido la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC, todo el tiempo de almacenamiento y en ambos productos y otra limitación podría ser el hecho de no haber realizado análisis microbiológico completo para cada uno de los productos.

CONCLUSIONES

Se presentaron bajas tasas de variación y diferencias no significativas durante el tiempo de almacenamiento en pH, °Brix, a_w (liofilizado), % humedad, grasa, cenizas, carbohidratos y calorías totales para la PAC y PAL, lo que indicó que estas variables fueron estables en cada producto a través del tiempo de almacenamiento de 60 días. Se observó diferencia estadísticamente significativa de la acidez titulable y la proteína durante el tiempo.

Los resultados microbiológicos indicaron conservación de la PAC y la PAL de acuerdo a los parámetros evaluados en este estudio para cada de estos productos, puesto que todas las muestras analizadas cumplieron con los estándares microbiológicos de acuerdo normatividad vigente.

Tanto en la PAC, como en la PAL se presentaron pérdidas significativas del contenido de antocianinas, fenoles totales y capacidad reductora de hierro (FRAP) durante el almacenamiento; sin embargo en PAL se logró conservar mayor contenido de compuestos fenólicos y mayor capacidad antioxidante al final del período de almacenamiento en comparación con la pulpa. Esta información indica que el proceso de liofilizado del agraz es un opción para mantener características composicionales, fisicoquímicas y microbiológicas estables y conservar el contenido de fitoquímicos del fruto a través del tiempo, para su posterior utilización como un ingrediente con capacidad antioxidante, colorante natural con potencial beneficio para la salud humana, además teniendo en cuenta que en Colombia sólo se presentan dos momentos de mayor cosecha anual,

la fruta liofilizada permite tener abastecimiento constante en el mercado.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores de la Universidad de Antioquia Alejandro Estrada Restrepo, Escuela de Nutrición y Dietética y Gabriel Agudelo Viana, Facultad de Ciencias Exactas, por sus enseñanzas, su apoyo y acompañamiento. A la Estrategia de Sostenibilidad 2014-2015 de la Universidad de Antioquia.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores manifiestan que no existe ningún conflicto de interés con los resultados publicados.

REFERENCIAS

- Alves RE, Brito EA, Rufino MS, Sampaio CG. Antioxidant activity measurement in tropical fruits: A case study with acerola. *Acta Hort.* 2008; (773): 299-305.
- Quiñones M, Miguel M, Alcixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp.* 2012; 27(1): 76-89.
- Haminiuk CWI, Maciel GM, Plata-Oviedo MSV, Peralta RM. Phenolic compounds in fruits – an overview. *Int J Food Sci Technol.* 2012; 47: 2023-2044.
- Donno D, Cerutti AK, Prgomet I, Mellano MG, Becaro GI. Foodomics for mulberry fruit (*Morus spp.*): Analytical fingerprint as antioxidants' and health properties' determination tool. *Food Res Int.* 2015; 69: 179-188.
- Vicente A, Manganaris GA, Sozzi G, Cristoso C. Postharvest handling: a systems approach. *Nutritional quality of fruits and vegetables 2 ed.* Burlintong (EE.UU): Academic Press, 2009. 57-106.
- Li TSC. *Vegetables and fruits: nutritional and therapeutic values.* 1 ed. Boca Raton (EE.UU): CRC Press is an imprint of Taylor and Francis Group, 2008. 207 p.
- Lopera YE, Fantinelli J, González Arbeláez LF, Rojano B, Ríos JL, Schinella G, Mosca S. Antioxidant Activity and Cardioprotective Effect of a Nonalcoholic Extract of *Vaccinium meridionale Swartz* during Ischemia-Reperfusion in Rats. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2013:1-10.
- Chang SK, Alasalvar C, Shahidi F. Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. *J Funct Foods.* 2016. 21:13-132
- Szajdek A, Borowska EJ. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods Hum Nutr.* 2008; 63:147-156.
- Zafra-Stone S, Bagchi VA, Chatterjee JA, Vinson D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food Res.* 2007; 5:675-683.
- Abreu O, Cuéllar A, Prieto S. Fitoquímica del género *Vaccinium* (Ericaceae). *RCPM.* 2008; 13(3):1-11.
- Gaviria Montoya C, Ochoa Ospina C, Sánchez Mesa N, Medina Cano C, Lobo Arias M, Galeano García et al. Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale SW*). *B Latinoam Caribe PL.* 2009; 8(6):520-528.
- Mosquera AJ, Tamayo A, Rojano BA, Gaviria C, Medina C, Ochoa C et al. Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño (*Vaccinium*

- meridionale Swartz*) en la zona altoandina de Colombia, Primera Ed. Bogotá: Gente Nueva Editorial, 2009.
14. Buitrago CM, Rincón MC, Balaguera HB, Ligarreto GA. Tipificación de Diferentes Estados de Madurez del Fruto de Agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*). Rev. Fac. Nal Agr. Medellín. 2015; 68(1):7521-7531.
 15. Bernal Roa LJ. Evaluación de las Propiedades Bioactivas de Mora (*Rubus glaucus*) y Agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*), en Fresco y Durante Procesos de Transformación. [Tesis de maestría]. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. Fac. de Ciencias Agropecuarias, Dpto. Ing. Agrícola y Alimentos; 2012.
 16. Garzón GA, Narváez CE, Riedl KM, Schwartz SJ. Chemical composition, anthocyanins, non – anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale Swartz*) from Colombia. Food Chem. 2010; 122: 980-986.
 17. Ávila Rodríguez HG, Cuspoca Riveros JA, Fischer G, Ligarreto Moreno GA, Quicazán de Cuenca MC. Caracterización físico-química y organoléptica del fruto de agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*) almacenado entre 1 y 2°C. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 2007; 60(2): 4179-4193.
 18. Gaviria Montoya C, Hernández Arredondo JD, Lobo Arias M, Medina Cano CI, Rojano BA. Cambios en la Actividad Antioxidante en Frutos de Mortiño (*Vaccinium meridionale Sw.*) durante su Desarrollo y Maduración. Rev. Fac. Nal Agr. Medellín. 2012; 65(1):6487-6495.
 19. Maldonado ME, Arango SS, Rojano BA. Free radical scavenging, cytotoxic and antiproliferative effects of *Vaccinium meridionale Sw.* in human colon cancer cell lines. RCPM. 2014; 19(2):172-184.
 20. Rincón Soledad MC, Buitrago Guacaneme CM, Ligarreto Moreno GA, Torres Aponte WS, Balaguera López HE. Behavior of agraz fruit (*Vaccinium meridionale Swartz*) harvested in different maturity stages and stored under refrigeration. Rev. Fac. Nal Agr. Medellín. 2012; 65 (2):6615-6625.
 21. Association of Official Analytical Chemist AOAC. "Official Methods of Analysis" 12 Edition (1975), 13 Edition (1980), 14 Edition (1984), 15 Edition, (1990), 16 Edition (1995), 18 Edition (2007). Washington. U.S.A
 22. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. Guía técnica colombiana 6.1. ICONTEC: Bogotá DC
 23. Giusti M, Rodríguez E, Wrolstad. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. J Agric Food Chem. 1999; 47(11): 4631-4637.
 24. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965; 16(3):144-158.
 25. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal. Biochem. 1996; 239(1):70-76.
 26. Ou BM, Hampsch-Woodill, Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. J. Agric Food Chem. 2001; 49(10):4619-4622.
 27. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. Norma técnica Colombiana 4458. Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. 2007, ICONTEC: Bogotá DC.
 28. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. Norma técnica Colombiana 4132. Microbiología. Guía general para el recuento de mohos y levaduras. Técnica de recuento de colonias a 25°C. 1997, ICONTEC: Bogotá DC.
 29. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 3929 de 2013, por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir las frutas y las bebidas, con adición de jugo (zumo) o pulpa de fruta o concentrados de fruta, clarificados o no, o la mezcla de éstos que se procesen, empaqueten, transporten, importen y comercialicen en el territorio nacional. 2013.
 30. Wills RB, McGlasson D, Graham, Joyce D. Postharvest. An introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals. CAB Intl. New York. 1998. 262 p.
 31. Bernal LJ, Melo LA, Diaz Moreno C. Evaluation of the Antioxidant Properties and Aromatic Profile During Maturation of The Blackberry (*Rubus glaucus Benth*) and The Bilberry (*Vaccinium meridionale Swartz*). Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 2014; 67(1): 7209-7218.
 32. Safner RJ, Polashock M, Ehlenfeldt, Vinyard B. Instrumental and sensory quality characteristics of blueberry fruit from twelve cultivars. Postharvest Biol Technol. 2008; 49(1): 9-26.
 33. Martínez N, Andrés A, Chiralt A, Fito P. Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno. Servicio de publicaciones. 1998.
 34. Ayala A, Serna L, Mosquera E. Liofilización de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*). CV. 2010;17(2):121-127.
 35. Vasco C, Riihinen K, Ruales J, Kamal-Eldin A. Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*). J Agric Food Chem. 2009; (57):8274-8281.
 36. Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. J Agric Food Chem. 1998; (46):2686-2693.
 37. Patras A, Brunton NP, Da Pieve S, Butler F. Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. Innov food sci. 2009; 10 (3):308-313.
 38. Patras A, Brunton NP, Odonnell C, Tiwari BK. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. Trends Food Sci Technol. 2010; 21(1):3-11.
 39. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem. 2005; 53(10): 4290-4302.
 40. Rivero D, Pérez S, González LM, Valls-Belles V, Codoñez P, Muñiz P. Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: Correlation with the content of polyphenols and melanoidins. J Agric Food Chem. 2005; 53(9): 3637-3642.
 41. Zapata S, Piedrahita AM, Rojano B. Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. Perspect Nutr Hum. 2014; 16(1):25-36.