

Evolución de fitoquímicos, poder antirradicalario y color durante el almacenamiento de pulpa de arándano

Paulino, Carolina¹; Ojeda, Mara¹; Rodríguez, Daniela¹; De Michelis, Antonio²; Ochoa, Mónica¹

¹Facultad Ciencias y Tecnología de los Alimentos - Univ. Nac. del Comahue. Villa Regina, Río Negro, Argentina.

²INTA AER El Bolsón - CONICET. El Bolsón - Río Negro. Argentina.

paulinocarolina@gmail.com



Resumen

Debido a que la dieta desempeña un papel importante en la prevención del daño oxidativo, la industria alimentaria muestra un interés creciente por el desarrollo de alimentos funcionales ricos en antioxidantes que puedan proporcionar beneficios para la salud del consumidor. Los berries, que poseen numerosos compuestos bioactivos, pueden ser considerados como alimentos funcionales. En este trabajo se estudió la influencia de las condiciones de almacenamiento sobre el poder antirradicalario, fenoles totales, flavonoides, antocianinas y color superficial en pulpas pasteurizadas de arándanos var. Elliot. Los frutos frescos fueron pulpados, envasados en viales de vidrio, pasteurizados y almacenados durante 240 días a temperatura ambiente en condiciones de anaquel (luz) y en oscuridad, tomándose muestras periódicamente y analizando el contenido de fenoles totales por Folin & Ciocalteu, poder antirradicalario con 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH), flavonoides por el método de formación de complejo con AlCl₃, antocianinas totales por el método del pH diferencial, color polimérico por tratamiento con metabisulfito. Se midió el color superficial en las pulpas con un colorímetro Minolta CR 400. Se observó que hay una marcada dis-

minución de las antocianinas totales en los primeros 50 días y luego una tendencia a mantenerse estable, degradándose un 60% en luz y 45% en oscuridad, por otra parte el color polimérico aumenta notablemente y se triplica a los 240 días. En color superficial no se hallaron cambios notables en Croma aunque el ángulo hue disminuye hacia tonos más purpuras. En fenoles totales se observó una disminución rápida en los primeros 50 días siendo la máxima degradación de un 20%, no hubo diferencias entre luz y oscuridad. Los flavonoides permanecieron estables y no se detectaron diferencias entre luz y oscuridad. En el poder antirradical hay una disminución hasta los 60 días y luego un aumento hasta recuperar aproximadamente los valores iniciales. Se observó un oscurecimiento de las pulpas, coincidente con el aumento de color polimérico y la variación en el ángulo hue.

Palabras clave: arándano - polifenoles - flavonoides - poder antirradicalario - antocianinas - color

Introducción

Aunque frutas y hortalizas frescas han formado parte de la dieta humana desde siempre, su importancia nutricional ha sido demostrada recientemente a través de estudios epidemiológicos que demuestran que su consumo regular está asociado con la disminución del riesgo de padecer cáncer, problemas cardiovasculares, derrames cerebrales, diabetes, hipertensión, etc. (Stintzing y Carle, 2004; Schieber y col., 2001). Estas enfermedades se asocian principalmente con dietas inadecuadas y con un estilo de vida urbano que propicia el llamado estrés oxidativo, un cuadro de cambios fisiológicos y bioquímicos determinado por la producción excesiva de radicales libres, lo que provoca un daño tal a las biomoléculas que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa. Afortunadamente, al incrementar el consumo de antioxidantes en la dieta es posible lograr un equilibrio entre éstos y los agentes oxidantes.

Se considera "componente bioactivo" de un alimento a aquel que aporta un beneficio para la salud más allá de las consideraciones propias de la nutrición básica, se encuentran en general en productos de origen

vegetal y también se los denomina fitoquímicos. Dentro de ellos se podrían destacar a las vitaminas C, E, K, vitaminas del grupo B, el ácido fólico; minerales, como el hierro, zinc, calcio, selenio; carotenoides (tanto los que poseen actividad provitamínica A como los que no la poseen); compuestos fenólicos (flavonoides, cinamatos y taninos), glucosinolatos y fitoesteroles, etc. (Cao y col., 1996; Prior y col., 1998; Zheng y col., 2003; Speisky y col., 2008).

El arándano es un fruto muy difundido en América del Norte y Europa. En la Argentina su producción comenzó a partir de la década del '90 y en los últimos diez años nuestro país se ha transformado en uno de los mayores productores del Hemisferio Sur (Pérez y col., 2008). El fruto es una baya casi esférica de 0,7 a 1,5 cm de diámetro, nace en racimos, es blanco al principio y a medida que madura se torna rojizo-púrpura para convertirse en azul cuando está completamente maduro (en algunas variedades permanece rojizo). La epidermis del fruto está provista de secreciones cerosas (pruina), que le dan a éste una terminación muy atractiva. (Martínez, De Michelis, 2011).

Diversos estudios han demostrado que esta fruta es una fuente muy importante de compuestos bioactivos, como flavonoides, ácidos fenólicos, vitamina C y antocianinas, estas últimas responsables de su atractivo color, el cual deberá preservarse durante los procesos y almacenamiento, ya que el consumidor juzga principalmente el ali-

mento por su apariencia y lo relaciona directamente con su calidad (Häkkinen y col., 1999; Kahkonen y col., 2001; Szajdek y Borowska, 2008).

Debido a su carácter estacional, los arándanos frescos están disponibles por un corto periodo de tiempo, por lo que resulta importante evaluar la estabilidad durante el almacenamiento de productos derivados, para extender su oferta. En el presente trabajo se pretende contribuir al conocimiento del efecto del almacenamiento de pulpa de arándano pasteurizada sobre algunos compuestos bioactivos y el color.

Materiales y métodos

Material vegetal: se utilizaron arándanos var. Elliot obtenidos de productores de la zona de la Comarca Andina del Paralelo 42 (Río Negro, Argentina), enviados a Villa Regina en transporte refrigerado y luego mantenidos a 4°C hasta su utilización.

Proceso: los frutos frescos fueron pulpados mediante un homogeneizador de inmersión, la pulpa se envasó en viales de vidrio, sellados con precintos metálicos, se pasteurizó en baño María a 100°C por 10 minutos y se almacenó a temperatura ambiente durante 240 días en condiciones de anaquel (luz) y en oscuridad, tomándose muestras periódicamente.

 <p>Enzimas sólidas y líquidas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fermentación • Clarificación • Extracción • Filtración 	 <p>Levaduras - Nutrientes - Clarificantes Bacterias - Alternativos de roble</p>	 <p>papelera del besós placas filtrantes, s.l. España Placas filtrantes Módulos lenticulares</p>
 <p>Tierras filtrantes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diatomeas • Precpas con celulosa 	 <p>Químicos Industriales S.A.</p> <p>San Rafael: Bombal 1021 (Esq. Granaderos) C.P. 5600 Tel/Fax: (0260) 4422 221 E-mail: sanrafael@quiminsa.com.ar</p> <p>Mendoza: Avda. Maza 4019 (norte) C.P. 5511 Gral. Gutiérrez - Maipú Tel/Fax: (0261) 493-0888 / 493-0932 E-mail: info@quiminsa.com.ar</p> <p>San Martín: Aquadro 648 - C.P. 5570 Tel.: (0263) 4428 492 E-mail: sanmartin@quiminsa.com.ar</p> <p>San Juan: Avda. Benavidez 1050 (E) Chimbas - C.P. 5413 Tel.: (0264) 431-0262 E-mail: sanjuan@quiminsa.com.ar</p>	 <p>Tierras Filtrantes perlíticas</p>
<p>Glensol</p> <ul style="list-style-type: none"> • Efluentes industriales • Ósmosis inversa • Resinas • Tratamiento de agua 		<p>Oakite</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sanitización • Limpieza • Lubricantes para cinta
<p>FABRICAMOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sorbato de Potasio: Granulado • Aquarábiga: Goma arábica líquida microfiltrada menor índice de colmación • Aquagel 50: Gelatina líquida • Cremor Tártaro: micronizado • Ácido Metatartárico: alto índice de esterificación • Casevín-K: Caseinato de potasio • Enobenton: Bentonita granular • Iorasol 22: Iodóforo 22.000 PPM • Ácido peracético activo 	 <p>• AMONÍACO ANHIDRO</p>  <p>• Epoxi para vasijas y pisos • Poliuretanos</p>  <p>• Bentonitas enológicas</p>	<p>IMPORTAMOS Y DISTRIBUIMOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido cítrico • Ferrocianuro de potasio • Ácido ascórbico • Gelatina enológica • Bentonitas • Carbón activado - Aktivkhole 200 (Enology Activated carbón) • Ácido málico L y DL

Tabla 1. Valores de los compuestos bioactivos en pulpa de arándano en las condiciones ensayadas

	FT (mg GAE/ 100 g Pulpa)	Fv (mg CE/ 100 g Pulpa)	PA (mg ⁻¹ Pulpa)	ACY (mg cianidina-3-glu/ 100 g pulpa)	% CP
Pulpa Control	441 ± 4 ^A	134 ± 9 ^A	0,81 ± 0,05 ^A	147 ± 4 ^A	11 ± 1 ^A
Luz (240 días)	359 ± 18 ^B	142 ± 5 ^B	0,85 ± 0,03 ^A	55 ± 3 ^B	36 ± 1 ^B
Oscuridad (240 días)	369 ± 12 ^B	143 ± 5 ^B	0,84 ± 0,01 ^A	69 ± 5 ^C	31 ± 1 ^C

Los valores rep. la media (n = 3) ± SD. Medias con una letra común por columna no son significativamente diferentes (p <= 0,05). FT=fenoles totales, Fv = flavonoides, PA = poder antirradical, Acy = antocianinas totales, %CP = % color polimérico



Extracción: se tomó 2 g de muestra, se añadió 20 ml de solución al 1% de HCl en etanol y se colocó en un baño termostático con agitación (modelo Dubnoff) a 37°C durante 30 minutos. Luego se filtró mediante vacío y el residuo se volvió a extraer con otros 20 ml de solvente. Finalmente los extractos reunidos se llevaron a 50 ml con agua destilada. Los extractos y las determinaciones se realizaron por triplicado.

Fenoles totales (FT): la concentración de fenoles totales se midió por el método descrito por Swain y Hillis (1959) con algunas modificaciones. Se adicionó a una alícuota de 50 µl de extracto, 1500 µl de agua destilada y 100 µl del reactivo Folin-Ciocalteu 1N. Se agitó con vortex y a los 3 minutos se adicionó 300 µl de Na₂CO₃ 20%. Se incubó 30 minutos a 40°C. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas con un espectrofotómetro Metrolab 1700 a 765 nm, contra un estándar externo de ácido gálico. Los resultados finales se expresaron como mg ácido gálico equivalente/100g pulpa.

Flavonoides (Fv): se determinaron por el método de formación de complejo con AlCl₃. Una alícuota del extracto se mezcla con 300 µl NaNO₂ 5%. Luego de 5 min se añaden 300 µl AlCl₃ 10% y finalmente, luego de 6 min, 2 ml NaOH 1 N. Se lleva a 10 ml con agua destilada. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas con un espec-

trofotómetro Metrolab 1700 a 510 nm, contra un estándar externo de catequina. Los resultados finales se expresaron como mg catequina equivalente/100g pulpa (Zhishen y col., 1999).

Poder Antirradical (PA): el poder antirradical fue analizado empleando el radical estable 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH.) en metanol (Brand-Williams y col., 1995). Se adicionan a 3 ml de solución metanólica de DPPH. de concentración 60 µM distintas alícuotas de extractos ajustadas de modo de consumir entre 30 a 70% del radical. El monitoreo del decaimiento se realizó a los 60 minutos, leyendo la absorbancia a los 515 nm. La cantidad de antioxidante presente en la matriz (mg de tejido fresco) necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50% se denominó EC50 y para mayor simplicidad se definió el poder antirradical como 1/EC50 (mg⁻¹ de tejido fresco). Esto significa que a mayor poder antirradical, más efectivo es el tejido como antioxidante.

Antocianinas (Acy): se determinaron las antocianinas totales mediante el método de pH diferencial reportado por Giusti y Wrolstad (2001). Las antocianinas experimentan una transformación reversible en función del pH manifestado por cambio en la absorbancia. Se midió la absorbancia a 510 y 700 nm a pH 1 y 4,5. La concentración de antocianinas fue expresada como mg de cianidina-3- glucósido/100 g pulpa, usando una absorptividad molar de 29600 L cm⁻¹ mol⁻¹ y un peso molecular de 449,2 g/mol.

Porcentaje de color polimérico (CP): el porcentaje de color polimérico (%CP) mide la resistencia de los pigmentos al blanqueado por bisulfitos e indica la polimerización de las antocianinas. El % CP se determinó utilizando el método de Somers, como lo describen Giusti y Wrolstad (2001). Se midió la absorbancia a 420, 510 y 700 nm en extractos sin tratar y en extractos tratados con solución al 20% de bisulfito de sodio.

Color superficial: se determinó el color utilizando un fotocolorímetro Minolta CR400, evaluando los parámetros correspondientes al espacio de color CIELAB: L*, a*,

b*, donde L* mide la luminosidad, a* mide el grado de componente rojo o verde y b* el grado de componente amarillo o azul. Se calcularon los parámetros Chroma: $(a^*2 + b^*2)^{1/2}$ y hue: $\arctan(b^*/a^*)$.

Análisis estadístico: en una primera instancia se aplicó un diseño factorial a dos vías completamente aleatorizado donde se encontró que para la mayoría de las variables hay interacción, por lo que a los efectos de evaluar el tratamiento se consideró el último punto de medición con un nivel de significancia del 5%. A los efectos de evaluar el tiempo de conservación y para todos los tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) acompañado de contraste de tendencias (lineal y cuadrática) con un nivel de significancia del 5%. Se utilizó el programa estadístico Infostat v. libre (Di Rienzo y col., 2011).

Resultados y discusión

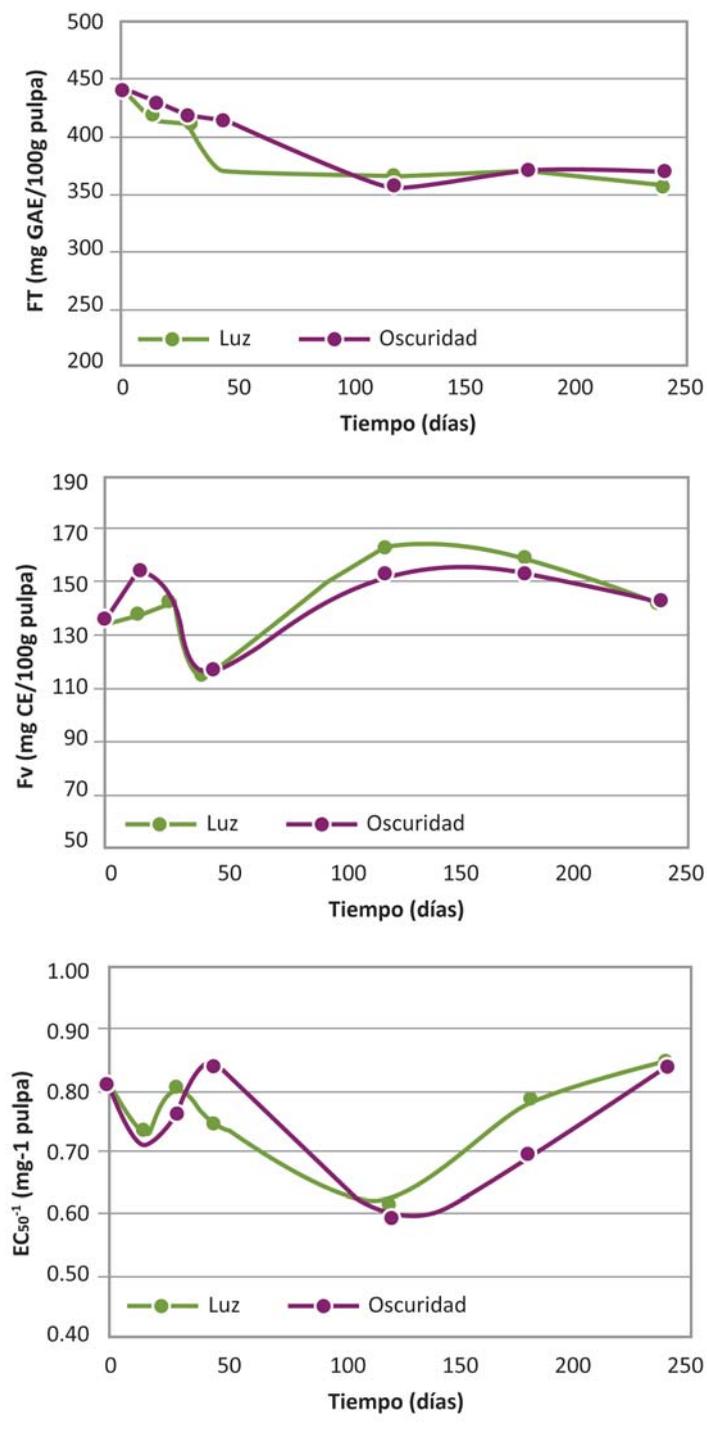
En la tabla 1 se informan las concentraciones en los compuestos bioactivos analizados en la pulpa inicial y luego de ocho meses de almacenamiento en condiciones de luz y oscuridad. Sólo se observa disminución significativa de FT y ACY respecto a la pulpa tiempo cero. Observando las figuras 1, 2 y 3 (FT, Fv y PA respectivamente) y del análisis estadístico surge que luego de los 240 días de almacenamiento de la pulpa no se encuentran diferencias significativas entre condición de luz y oscuridad.

En cuanto a la variable FT, su concentración a lo largo del tiempo total de estudio disminuyó en un 17% y del análisis de contraste de las curvas se observa tendencia asintótica (contraste lineal $p < 0,0001$ y contraste asintótico $p = 0,0181$), es decir la concentración disminuye hasta aproximadamente los cuatro meses de almacenamiento, manteniéndose luego constante alcanzando un valor aproximado de 360 mg GAE/100 g pulpa, comportamiento similar al hallado para productos de otros berries (Savikin y col., 2009).

En Fv la tendencia observada fue lineal ($p < 0,0001$). A lo largo de los primeros 50 días de análisis la concentración media se redujo y luego aumentó, recuperando la concentración inicial, presentando un valor final de 142 mg CE/100 g pulpa, significativamente mayor que el valor inicial, debido a la formación de nuevas estructuras también reactivas.

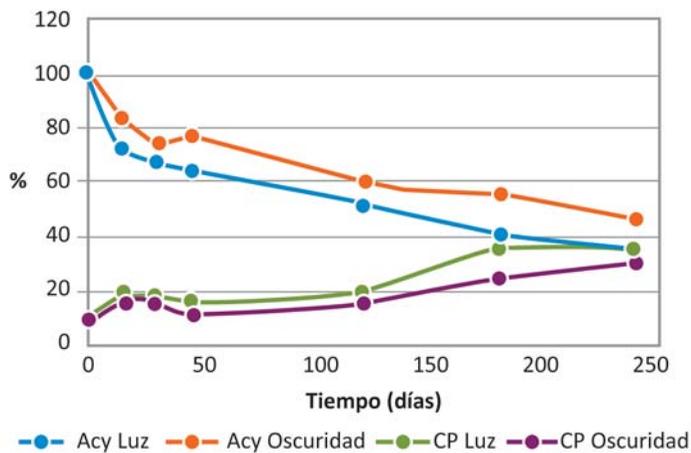
La tendencia que presentaron las curvas de PA fue cuadrática ($p < 0,0001$), lo que refleja el recupero de la concentración inicial luego del periodo de almace-

Figuras 1, 2 y 3 - Contenido medio de Fenoles Totales (FT), Flavonoides (Fv) y Poder Antirradical (PA) en pulpa de arándano en las condiciones ensayadas

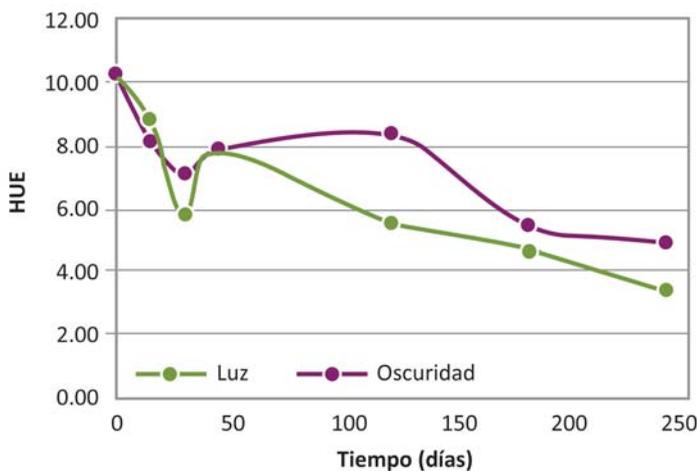


miento. Se cree que la causa de ello podría explicarse a través de la condensación de los productos de la oxidación de los polifenoles, lo que determina la formación de procianidinas con estructuras aromáticas más grandes y mayor capacidad antioxidante (Nicoli y col., 2000). Murakami y col., (2004) sobre la base de sus investigaciones, han demostrado que los compuestos polifenólicos son más estables en los alimentos procesados y

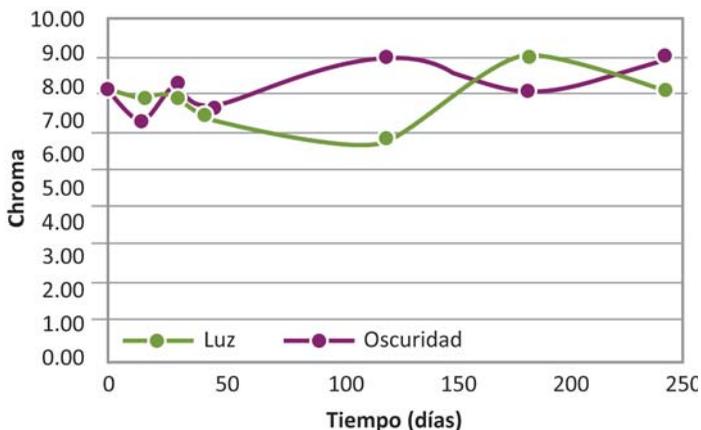
Figuras 4 - Contenido medio de Antocianinas (Acy) y Color Polimérico (CP) en pulpa de arándano en las condiciones ensayadas



Figuras 5 - Evolución del parámetro hue en pulpa de arándano en las condiciones ensayadas



Figuras 6 - Evolución del parámetro Croma en pulpa de arándano en las condiciones ensayadas



cocidos que en la matriz original, como consecuencia de la mayor actividad antirradical de los productos de descomposición. Estos datos se conciden con los hallados por Brownmiller y col. (2008) para pulpas pasteurizadas de arándano almacenadas a 25°C en oscuridad. Se cree que el mayor PA de los polímeros formados durante el almacenamiento compensa las pérdidas de antocianinas monoméricas, resultando en el cambio imperceptible en el PA luego de ocho meses.

En la figura 4 se puede observar el contenido medio de antocianinas y color polimérico en pulpas de arándano. Del análisis estadístico surgen diferencias significativas entre las condición aplicadas, durante los ocho meses de almacenamiento, en ambos parámetros, incrementándose el color polimérico en un 40% y reduciéndose el contenido de Acy en un 60%, tomando para ambos la referencia en condición de anaquel (luz).

Del contraste de tendencias para contenido de antocianinas surge un comportamiento lineal altamente significativo ($p < 0,0001$). La concentración disminuye gradualmente con el tiempo, siendo más afectada en condiciones de luz. En color polimérico la tendencia predominante fue asintótica (contraste lineal $p < 0,0001$ y contraste asintótico $p < 0,0001$), es decir se registra un aumento gradual en el tiempo hasta aproximadamente los ciento cincuenta días donde comienza a mantenerse constante.

Los resultados indican que las antocianinas se encuentran polimerizadas durante el almacenamiento, y que las pérdidas de antocianinas monoméricas están acompañadas por el aumento del porcentaje de color polimérico. Estos resultados concuerdan con los hallados por Ochoa y col. (1999) para pulpas de frambuesa almacenadas a diferentes temperaturas. En las figuras 5 y 6 se puede observar la evolución de los parámetros de color Croma y hue en pulpas de arándano. Del análisis estadístico surgen diferencias significativas entre las condición aplicadas, durante los ocho meses de almacenamiento, para ambos parámetros. El contraste de tendencias para hue muestra un comportamiento lineal altamente significativo ($p < 0,0001$), disminuyendo gradualmente con el tiempo hacia tonos más púrpuras. En el caso de Croma, la tendencia también fue lineal ($p = 0,0024$), incrementándose levemente el valor para oscuridad al cabo de los ocho meses de almacenamiento, lo cual implica un oscure-

cimiento del producto probablemente relacionado con la polimerización y/o copigmentación de antocianinas y con la aparición de productos de la Reacción de Maillard iniciada durante el procesado.

Conclusiones

Se puede concluir que la pulpa de arándano pasteurizada es un producto que presentaría una estabilidad adecuada en el tiempo de almacenamiento, ya que la mayor parte de los fitoquímicos, el poder antirradicalario y el color no son fuertemente afectados por las condiciones de conservación, lo cual permitiría contar fuera de estación con productos de alta calidad.

Bibliografía

Brand-Williams, W., Cuvelier, M., and Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Tech*, 28(1):25-30.
Brownmiller C., Howard L., Prior R. (2008). Processing and Storage Effects on Monomeric Anthocyanins, Percent Polymeric Color, and Antioxidant Capacity of Processed Blueberry Products. *J. of Food Science*. 73(5): 72-79.
Cao, G., Sofic E., and Prior R. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. of Agric. and Food Chem*. 44: 3426-3431.

Di Rienzo J., Casanoves F., Balzarini M., González L., Tablada M., Robledo C. *InfoStat* versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, U.N.C., Arg.

Gomez Mora, S. (2012). Valor nutricional y funcional de frutas finas patagónicas. UNCo, Argentina. Memoria para optar por el título de Técnico en Control e Higiene de los Alimentos de la UNCo.

Giusti, M., Wrolstad, R. (2001). Unit F1.2 Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In R.E. Wrolstad (Ed.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. J. Wiley & Sons, New York

Häkkinen, S., Karenlampi S., Heinonen M., Mykkanen H., and Torronen A. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. *J. of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 2274-2279.

Kahkonen, M., Hopia A., and Heinonen M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. of Agricultural and Food Chemistry*. 49:4076-4082.

Martinez E., De Michelis A. (2011). Cultivo, Cosecha, Postcosecha inmediata y elaboración de Frambuesas, Moras e Híbridos. Ediciones del INTA, En prensa.

Murakami, M.; Yamaguchi, T.; Takamura, H.; (2004). Effects of Thermal Treatment on Radical-scavenging Activity of Single and Mixed Polyphenolic Compounds. *J. of Food Science*. 69: 7-10.

Nicoli, M., Calligaris, S.; Manzocco, L. (2000). Effect of enzymatic and chemical oxidation on the antioxidant capacity of catechin model



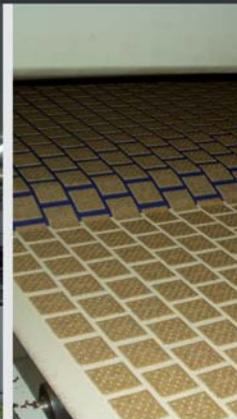
www.warbel.com.ar

CINTAS TRANSPORTADORAS DE ALIMENTOS



Hasta 2300 mm. de ancho

Instalamos en todo el país



CASA CENTRAL: Ruta 11-Km 1006.5 - Resistencia (H3500) Chaco. **ROSARIO:** Santa Fe 4673 - Rosario (S2000KVM) Santa Fe. **CORDOBA:** Pedro Zani 85 - Córdoba (X5003GPC) Córdoba.
CAMPANA: Liniers 452 - Campana (B2804MHA) Bs.As. **PUERTO MADRYN:** Av. Kenneth Woodley 876 - Puerto Madryn (9120) Chubut. **MENDOZA:** Maza 1869 - Mendoza
BRASIL: Rua Bartolomeu Lorenço de Gusmão 599 - Vila Hauer (81610-060) Curitiba - Paraná. **PARAGUAY:** Paseo del Solar 1220 - Lambaré. **BOLIVIA:** Av. Charagua 284 / Av. 26 de Febrero 244 - Santa Cruz