

Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, antioxidantes y antiproliferativa de néctar de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz)

Yuly Nataly Franco Tobón, Benjamín A. Rojano, Andrés Felipe Alzate Arbeláez,
Diana Marcela Morales Saavedra, María Elena Maldonado Celis

Grupo Impacto de los Componentes Alimentarios en la Salud ICAS, Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de Antioquia UdeA, Medellín, Colombia. Laboratorio de Ciencia de los Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional UNAL, Medellín, Colombia..

RESUMEN. El Agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz), es una baya que posee alta capacidad antioxidante debido a su contenido de compuestos polifenólicos como antocianinas, ácidos fenólicos y flavonoides. El objetivo de este estudio fue evaluar la composición proximal inicial y el efecto en las características fisicoquímicas (pH, °Brix, acidez titulable (AT)), actividad antioxidante y antiproliferativa de néctares elaborados a partir de agraz liofilizado, almacenados durante 42 días. Se prepararon dos néctares: NA (sacarosa) y NB (aspartame), se evaluó cambio en pH, °Brix y AT cada 7 días durante el almacenamiento. Se determinó contenido de fenoles y antocianinas totales mediante Folin-Ciocalteu y método diferencial de pH, respectivamente, actividad antioxidante mediante FRAP y ORAC. Se analizó la actividad antiproliferativa con sulforodamina B en células SW480 (adenocarcinoma de colon). Los resultados mostraron que ambos néctares presentaron estabilidad en °Brix, pH y AT y el NB presentó menor aporte calórico. El contenido de fenoles totales aumentó durante el almacenamiento. El contenido de antocianinas y capacidad antioxidante se redujo significativamente ($p < 0,05$). NA presentó mejor actividad antiproliferativa a las 72h, con un porcentaje de inhibición del crecimiento celular a una concentración de 1g/mL de 63,50% ($IC_{50} = 0,6g/mL$). Se puede concluir que NA presentó mayor capacidad antiproliferativa y NB mejor actividad antioxidante, que aunque disminuyó significativamente durante el almacenamiento, continuó siendo alta comparada con estudios reportados en la literatura. Para productos realizados a partir de bayas del género *Vaccinium*. Se requieren estudios adicionales "in vivo" que permitan comprobar su eficacia quimiopreventiva y dilucidar mecanismos moleculares de acción para beneficio de la salud humana, demostrando su potencial funcional descrito hasta ahora "in vitro".

Palabras clave: *Vaccinium meridionale*, néctar, características fisicoquímicas, actividad antioxidante, actividad antiproliferativa.

SUMMARY. Effect of storage time on the physicochemical characteristics, antioxidant and antiproliferative nectar of unripe (*Vaccinium meridionale* Swartz). Agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) is a berry that has high antioxidant capacity due to its content of polyphenolic compounds as anthocyanins, phenolic acids and flavonoids. The aim of this study was to evaluate the initial proximal composition and the effect on the physicochemical characteristics (pH, ° Brix, titratable and acidity (TA), antioxidant and antiproliferative activity of nectars made from unripe lyophilized and stored for 42 days. Two nectars were prepared: NA (sucrose) and NB (aspartame), was evaluated change in pH, °Brix and AT every 7 days during storage. It was determined and total phenols content by Folin-Ciocalteu anthocyanins and pH differential method, respectively, antioxidant activity by FRAP and ORAC. Antiproliferative activity with sulforhodamine B in SW480 cells (colon adenocarcinoma) were analyzed. The results showed that both were stable nectars ° Brix, pH and changes in AT. The NB has lower calories. The content of total phenols increased during storage. The anthocyanin content and antioxidant capacity was significantly reduced ($p < 0.05$). NA presented better antiproliferative activity at 72 h, with a percentage of inhibition of cell growth at a concentration of 1g / ml of 63.50% ($IC_{50} = 0.6 g/mL$). It can be concluded that NA had a higher antiproliferative capacity and NB better antioxidant activity than even decreased significantly during storage, remained high compared to studies reported in the literature. Further studies "in vivo" to verify their chemopreventive efficacy and elucidate molecular mechanisms of action for the benefit of human health, showing their functional potential described so far "in vitro" are required.

Key words: *Vaccinium meridionale*, nectar, physicochemical characteristics, antioxidant activity, antiproliferative activity.

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país con una gran variedad de frutas, da origen a por lo menos 150 frutos, y su consumo actualmente ha incrementado a nivel doméstico y en los mercados internacionales, tanto en fresco como procesadas, en vinos, mermeladas, jaleas y yogures. Sin embargo, está claro que la mejor forma de obtener antioxidantes es por medio del consumo directo de la fruta entera sin transformación (1). En Colombia en la actualidad, hay una mayor inclinación por el consumo de bebidas como néctares o jugos, especialmente aquellos que contienen fitoquímicos, con beneficios para la salud (2).

Dentro de los frutos colombianos, se encuentra el agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz), arbusto silvestre pequeño, entre 1 y 4m de altura, cuyo fruto es una baya globosa, con un tamaño entre 5 y 10 mm, de color púrpura en su mayor estado de madurez. Puede crecer en zonas tropicales de montaña y en altitudes bajas, por lo que se da en América Central y al norte de América del Sur, como en Venezuela (2200 a 3400msnm). Algunos estudios han documentado la composición de antocianinas, fenoles totales, actividad antioxidante y características fisicoquímicas del fruto o de sus extractos (3,4), demostrando su alta capacidad antioxidante. Además, un estudio realizado por Maldonado y col. (5), exhibió actividad citotóxica y antiproliferativa de los extractos de agraz, en células de adenocarcinoma de colon SW480, comparables a las de otras bayas del género *Vaccinium*.

Aunque existen estudios que resaltan los beneficios del fruto fresco de agraz o sus extractos, pocos evalúan sus propiedades fisicoquímicas y antioxidantes a través del tiempo en productos elaborados a partir de la fruta (néctar o jugos) siendo esta la manera como puede ser mayor su consumo, además no hay investigaciones donde se haya estudiado la capacidad antiproliferativa de dichos productos en modelos celulares. A su vez, teniendo en cuenta que el fruto agraz solo tiene dos picos altos de producción al año, y la baya aún no se encuentra domesticada, es importante pensar en técnicas para su preservación, con el fin de mantener disponibilidad constante para la elaboración de los productos. Los métodos de secado se convierten en una buena opción para la preservación del fruto, siendo la liofilización el proceso elegido, debido a que el uso de temperaturas y presiones bajas, evita la pérdida y el daño de componentes

del fruto tales, como antocianinas y otros compuestos fenólicos, ampliamente asociados con la actividad antioxidante y por ende con posibles efectos benéficos para la salud; además la liofilización a diferencia de otros tipos de secado, permite retención del aroma, color y la rápida rehidratación facilitando la elaboración de bebidas a partir de éste. En estudio previo se pudo mostrar las características de agraz liofilizado y cómo éste, a pesar de las pérdidas esperadas por la previa transformación, logra mantener el contenido de compuestos fenólicos y antocianinas (6), igualmente en el presente se hace un estudio de análisis sensorial de este producto para tener un perfil al respecto de la bebida de agraz liofilizado reconstituido que aquí se estudió, resultados que se publicarán en un estudio posterior a éste.

Es así como este trabajo tiene por objetivo evaluar el efecto en las características fisicoquímicas (pH, °Brix y acidez titulable), además de la actividad antioxidante y antiproliferativa en néctares elaborados a partir de agraz liofilizado y almacenados durante 42 días en condiciones controladas de temperatura, luz y humedad relativa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Agraz o mortiño

Bayas frescas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz), maduras (color negro-violáceo), obtenidas del municipio del Retiro (Antioquia, Colombia), a una altura de 2175 msnm, temperatura promedio de 16°C, fueron recogidas al azar para el estudio en mayo del año 2015, éstas fueron lavadas, seleccionadas, desinfectadas (hipoclorito de sodio 100 ppm), secadas y procesadas por 2 min a 2500 rpm y se liofilizaron en cámara de vacío a presión 0,427 + 0,5 mm Hg, a temperatura de -50°C, finalizada la liofilización se almacenaron a temperatura ambiente y protegido de la luz en cantidades de 200g en empaque PET aluminio, polietileno de baja densidad, para ser utilizadas como ingrediente en la posterior preparación del néctar.

Preparación del néctar

Se utilizaron bayas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) liofilizadas, se mezclaron con agua y azúcar (NA) 11,1°Brix; acidez titulable 4,33mg de ácido cítrico/mL; pH 3,06. Para el NB las bayas liofilizadas se mezclaron con agua y edulcorante (aspartame 3%), 5°Brix, acidez titulable 5,29 mg de ácido cítrico/mL; pH 3,06. Cumpliendo las normas de inocuidad y pará-

metros fisicoquímicos establecidos en normatividad vigente (7). Cada néctar se agregó a botellas de 500 mL en vidrio blanco y pasteurizado a 85°C por 10 min, se almacenó a 4°C ± 2°C protegido de la luz.

Acidez Titulable, pH y °Brix

La acidez titulable (AT) se determinó por titulación de la muestra (2g de homogeneizado + 50 mL de agua destilada libre de CO₂) con solución estandarizada de NaOH 0,1 N a pH 8,2. Fue expresada en gramos ácido cítrico por 100 g de muestra. El pH se midió sobre 2 g de homogeneizado en un pH-metro Metrohm modelo 744. Los °Brix fueron determinados usando refractómetro digital Pocket PAL® 88S (Japón). Estos análisis se realizaron de acuerdo a la Norma Técnica Colombiana (NTC)-4624 (7) y NTC-440 (9).

Análisis de Composición Proximal: Se determinaron parámetros como humedad, grasa total, cenizas totales, proteína total, carbohidratos y calorías totales, actividad acuosa. Estos análisis fueron realizados de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Asociación Americana de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC 9234.03, AOAC 954.01) y Guías Técnicas Colombianas (GTC 1,14, GTC 6.1) Los carbohidratos y calorías totales se calcularon a partir de componentes.

Reactivos y equipos

Metanol, tricloruro de hierro, 2,4,6-tri(2-piridil) triazina (TPTZ), Trolox® (Ácido 6-hidroxi-2,5,8-tetrametilchromano-2-carboxílico), ácido ascórbico, ácido gálico, carbonato de sodio, persulfato de potasio fueron obtenidos de Sigma Chemical®; Reactivo de *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

Determinación del contenido de antocianinas

Las muestras de néctar fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos y se usó el sobrenadante. Se utilizó el método diferencial de pH (10). 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, la estimación de las antocianinas totales se realizó usando la expresión: $A = [(A_{530} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{530} - A_{700})_{pH4.5}]$, con un coeficiente de extinción molar para el cianidin-3-glucósido (C-3-G) de 26900. Los resultados fueron expresados como mg eq de cianidin-3-glucósido

(C3G) por 100 g de muestra para el agraz liofilizado y mg eq de cianidin-3-glucósido por 100 ml de muestra para los néctares.

Determinación del contenido de fenoles totales

Las muestras de néctar fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos, se usó el sobrenadante. Se realizó por el método colorimétrico descrito por *Folin-Ciocalteu* (10), se construyó una curva patrón usando como estándar ácido gálico. Se diluyó la muestra a una concentración en la cual el contenido de fenoles se encontrara dentro del intervalo de la curva patrón. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de muestra, para el liofilizado y para los néctares los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GA)/100 ml de muestra. La absorbancia fue medida en lector de placas Thermo Scientific Multiskan® Spectrum UV-Vis.

Ensayo FRAP

(*Ferric ion Reducing Antioxidant Power*)

Las muestras de néctar fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos y se usó el sobrenadante. Se realizó según el método de Benzie y Strain, 1996 (12). Se utilizaron 900 µL de solución de Fe⁺³, 50 µL de muestra y 50 µL de agua destilada. Luego de 30 min se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm. Se construyó la curva de referencia usando ácido ascórbico estándar. Las actividades de las muestras se expresaron como mg equivalentes de ácido ascórbico/100g de muestra (AAC)/100g de muestra. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro Jenway® 6405 UV/Vis. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Ensayo ORAC

(*oxygen radical absorbance capacity*)

Las muestras de néctar fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos y se usó el sobrenadante. El procedimiento experimental fue basado en reportes (13) 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 1x10⁻² M en PBS (75mM) AAPH 0,6 M, en PBS. La muestra contiene 21 µL de fluoresceína, 2,899 µL de PBS, 30 µL de diluciones de néctar de agraz y 50 µL de AAPH. El efecto protector antioxidante de las muestras es calculado usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia entre

un blanco y la muestra, se compara contra la curva del trolox y se expresa en valores TEAC/100g muestra (μmol equivalentes de trolox por 100ml de muestra), de acuerdo a la ecuación 1.

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

Donde AUC es el área bajo la curva de la muestra, AUC $^{\circ}$ 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 fluorescencia se midió en un espectrofotómetro de fluorescencia PerkinElmer $^{\text{®}}$ LS55.

Análisis microbiológico

Se evaluó la calidad microbiológica para recuento de heterótrofos en placa UFC/g según AOAC 988.18 ed.17, las muestras fueron diluidas y homogenizadas para preparar las diluciones consecutivas de 10 $^{-1}$, 10 $^{-2}$ y 10 $^{-3}$ en cajas de Petri estériles, se vertieron en éstas 15 mL de agar Plate Count fundido y mantenido a 45°C, se mezclaron y dejaron solidificar y se incubaron a 35°C \pm 2 durante 48 horas. El análisis de coliformes totales y fecales (NMP), se realizó de acuerdo a AOAC 966.24 ed. 17, 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 sembró en profundidad 1 mL de cada dilución en *Caldo Fluorocult*, incubándose a 37 °C por 48 h. Los mohos y levaduras (UFC/ml) fueron evaluados de acuerdo a AOAC 17.2.02 ed.17, alícuotas de 1 mL de cada dilución fueron sembradas en cajas Petri de agar OGY (agar extracto de levadura glucosa cloranfenicol), se incubaron a 25 °C por cinco días.

Análisis de la actividad antiproliferativa

Mediante el ensayo colorimétrico de sulforodamina B (SRB), se estimó el número de células por tinción indirecta de proteína celular total. Las células se incubaron por 48 y 72 horas; posteriormente el medio se descartó y las células se fijaron con 50 μL de ácido tricloroacético al 50% en frío. Las células se incubaron a 4°C durante 1 hora, y se lavaron las placas 5 veces con agua a temperatura ambiente, el exceso de agua se descartó y las placas se dejaron secar durante la noche. Luego se añadió 200 μL de SRB (0,4% m/v en 1% de ácido acético) por 30 minutos, finalmente las placas se lavaron con 50 mL de ácido acético 1%, y se enjuagaron 4 veces. Finalmente se adicionó buffer Tris 10mM (pH 10.5) y se leyó a densidad óptica de 490nm.

Cultivos celulares

Las células SW480, se obtuvieron del *American*

Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) se mantuvieron como fue descrito en Maldonado et al 2009 (13). Brevemente, se utilizó medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con 10% suero de caballo inactivado, 100 U/mL penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomycin, y 1% de aminoácidos no-esenciales. Las incubaciones se hicieron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO $_2$. Para todos los experimentos, 24 h después de sembrar, se hizo reducción de la concentración del medio a 3% de suero, con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulina, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de transferrina, 5 ng/mL de selenio.

Análisis Estadístico

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

RESULTADOS

Análisis microbiológico

El NA aumentó su contenido de mesófilos y levaduras al final del almacenamiento, mientras que el NB permaneció estable microbiológicamente, los resultados microbiológicos se muestran en la Tabla 1.

Las características del liofilizado de agraz que se utilizó como ingrediente para la elaboración de los néctares se observan en la Tabla 2.

La utilización del liofilizado como ingrediente para la elaboración de los néctares, permitió obtener productos con valores ORAC altos, comparados con otros alimentos de acuerdo a informe de la USDA, en el año

TABLA 1. Resultados análisis microbiológicos en ambos néctares periodo inicial y final del almacenamiento

Análisis	Néctar A		Néctar B	
	Día 1	Día 42	Día 1	Día 42
Recuento De Heterótrofos en Placa (UFC/g)	<10	300	<10	<10
Coliformes totales (NMP)	<3/ml	<3/ml	<3/ml	<3/ml
Coliformes fecales	<3/ml	<3/ml	<3/ml	<3/ml
Levaduras UFC/ml	<10	190	<10	<10
Mohos UFC/ml	<10	<10	<10	<10

2010 (15), esto se asocia con la capacidad antioxidante del producto, claro está sin olvidar que pueden existir múltiples efectos sinérgicos que contribuyen también con dicha actividad.

TABLA 2. Propiedades fisicoquímicas, fenoles totales, antocianinas totales y actividad antioxidante del agraz liofilizado utilizado como ingrediente para la elaboración de los néctares.

Característica	Liofilizado de agraz
pH (20°C)	3,05±0,12
°Brix	5,02±0,04
Acidez titulable (AT) *	5,13
Fenoles Totales* *	1046,01±26,95
Antocianinas Totales***	82,64±2,86
FRAP****	1115,76±34,70
ORAC*****	33935±2259

*g ácido cítrico/100 g de muestra

**mg Ácido gálico/100g muestra)

***mg Cianidin 3 glucósido/100 g muestra

****mg Ácido ascórbico/100g muestra

*****TEAC (μmol Trolox /100 g muestra).

Propiedades fisicoquímicas:

acidez titulable, pH, °Brix

Ambos néctares, indicaron estabilidad en °Brix y pH y disminución de la acidez titulable, durante el tiempo de análisis (Tabla 4 y 5).

Análisis de consumo proximal

Los resultados de la composición proximal de los néctares evaluados se muestran en la tabla 3. Se presentó diferencia estadística ($p < 0,05$) entre el % humedad, cenizas, proteína, carbohidratos y calorías totales del NA con respecto a NB.

Análisis fitoquímico: contenido de fenoles totales y antocianinas totales

El NB presentó un contenido mayor de antocianinas y fenoles totales que el NA desde el inicio del almacenamiento. Se observó cambio significativo ($p < 0,05$) del contenido de fenoles del día inicial al día 42 de almacenamiento para NA (217,93-285,02) y NB (242,55-299,40), a su vez se presentó disminución significativa ($p < 0,05$) del contenido de antocianinas a través del tiempo de almacenamiento (Tabla 4 y 5 y Figura 1A y 1B).

TABLA 3. Composición proximal del NA y NB, al inicio del almacenamiento

Néctar	Humedad (% m/m)	Cenizas* (%m/m)	Grasa total* (%m/m)	Nitrógeno total* (%m/m)	Proteína total* (%m/m)	Carbohidratos totales* (%m/m)	Calorías totales** (Kcal/100 g)
NA	87,46 ± 0,32	0,08± 0,0	0,01 ± 0,01	0 ± 0,00	0 ± 0,00	12,48 ± 0,24	49,98 ± 0,32
NB	93,77± 1,24	0,05± 0,01	0,03± 0,01	0,01 ± 0,00	0,07± 0,01	6,07± 0,2	24,88± 0,14

*g/100mL de néctar. ** Kcal/100 mL de néctar

TABLA 4. Características fisicoquímicas y capacidad antioxidante del Néctar A durante un periodo de almacenamiento de 42 días

NÉCTAR A							
Días	pH	AT*	°Brix	Fenoles totales**	Antocianinas totales***	FRAP ****	ORAC*****
0	3,06±0,01	4,35	11,03±0,12	217,93±3,22	56,44±2,90	459,51±4,19	6531,35±226,38
7	3,17±0,20	4,33	11,00±0,10	207,39±4,21	36,13±3,11	437,57±61,12	5543,78±136,26
14	3,19±0,25	4,41	10,99±0,19	181,36±28,54	29,50±6,67	454,32±38,96	4522,62±63,11
21	3,20±0,06	3,94	11,05±0,13	346,92±5,80	21,49±4,14	434,18±3,54	4028,29±179,75
28	3,22±0,01	3,83	10,87±0,06	330,12±16,91	22,32±2,15	429,19±20,45	4140,06±172,69
35	3,24±0,01	3,24	10,98±0,17	302,28±8,99	18,20±2,36	420,61±12,25	4043,34±180,01
42	3,25±0,02	2,57	10,90±0,10	285,02±7,91	16,48±2,24	412,04±18,90	3410,29±111,96

*AT: Acidez titulable (mg ácido cítrico/100 mL)

**mg Ácido gálico/100 mL

***mgeq Cianidin 3 glucósido/100 mL

****mg Ácido ascórbico/100 mL

*****TEAC (μmol Trolox /100 mL)

TABLA 5. Características fisicoquímicas y capacidad antioxidante del Néctar B durante un periodo de almacenamiento de 42 días

NÉCTAR B							
Días	pH	AT*	°Brix	Fenoles totales**	Antocianinas totales***	FRAP****	ORAC*****
0	3,10±0,01	5,29	4,97±0,06	242,55±7,41	63,57±1,58	580,27±9,85	7702,43±298,22
7	3,09±0,01	5,59	5,00±0,00	183,37±1,65	31,17±2,76	570,41±12,77	4767,50±242,87
14	3,13±0,01	5,29	4,90±0,00	181,96±28,54	30,06±3,82	556,83±24,96	4165,89±152,42
21	3,15±0,01	4,68	4,97±0,06	314,23±8,10	27,94±6,14	511,47±18,85	3956,10±34,47
28	3,16±0,01	4,62	4,83±0,06	319,53±25,85	27,39±1,00	495,61±8,51	3913,39±39,33
35	3,16±0,10	3,02	4,90±0,00	297,28±13,36	24,71±0,33	503,59±26,10	3450,45±151,40
42	3,17±0,02	2,21	5,00±0,00	299,40±3,39	22,71±9,20	455,52±42,28	1964,44±53,70

* AT: Acidez titulable (mg ácido cítrico/100 mL)

** mg Ácido gálico/100 mL

***mgeq Cianidin 3 glucósido/100 mL

****mg Ácido ascórbico/100 mL

*****TEAC (μ mol Trolox /100 mL)

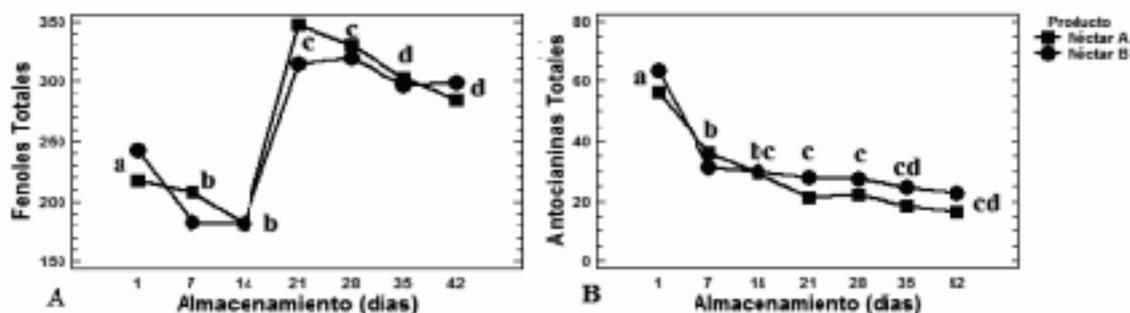


FIGURA 1. A. Fenoles totales durante almacenamiento. B. Antocianinas totales durante almacenamiento. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

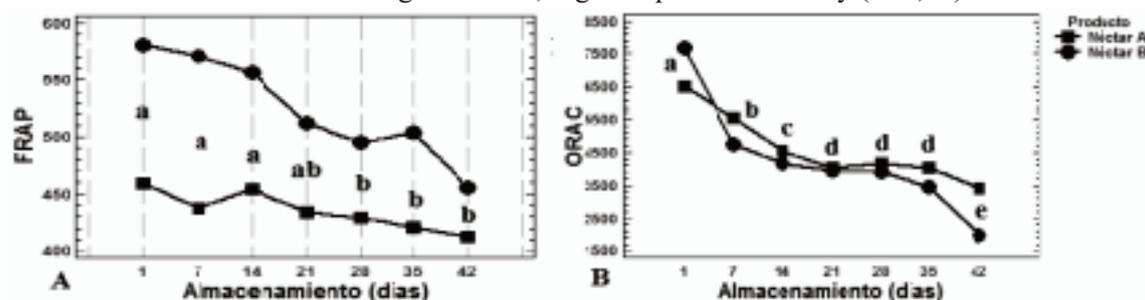


FIGURA 2. A. FRAP durante los días de almacenamiento. B. ORAC durante los días de almacenamiento. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

Propiedades antioxidantes

Posterior a la elaboración y en los días iniciales de almacenamiento, el NB presentó mayor valor FRAP y ORAC que el NA. Durante el tiempo de almacenamiento estudiado se observó disminución significativa ($p < 0,05$) entre la actividad antioxidante FRAP y ORAC de NA y NB, (Tabla 4 y 5 y Figura 2 A y 2 B)

Actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa incrementó de forma dependiente de la dosis. Indicando un efecto citotóxico de los néctares de agraz sobre las células de adenocarcinoma de colon SW480. El valor IC_{50} para el tiempo de exposición de 48 horas del NA y NB fue 1,12 y 0,4g/mL respectivamente y para el tiempo de 72 horas fue 0,60 g/mL (NA) y 1,04 g/mL (NB) (Figura 3).

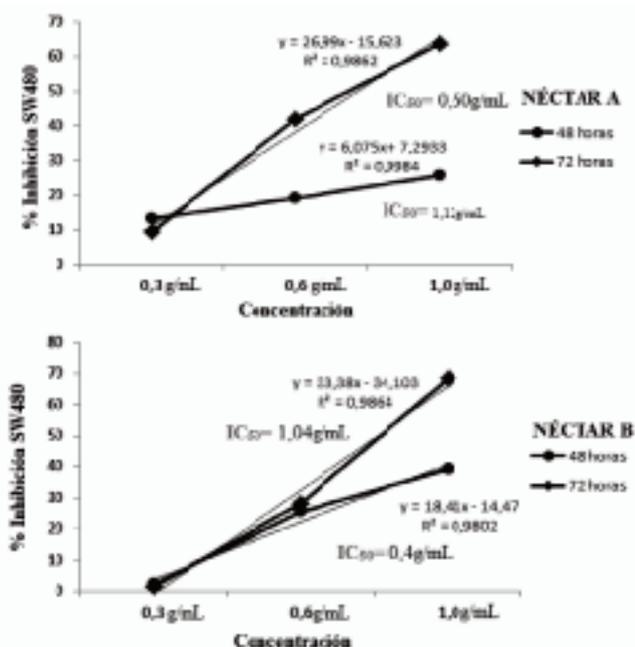


FIGURA 3. Efecto citotóxico de NA y NB sobre células de adenocarcinoma de colon SW480 durante un tiempo de exposición de 48 y 72 horas. Los datos son expresados como promedio \pm error estándar de la media ($n=3$)

DISCUSIÓN

Análisis microbiológico

Según la normatividad vigente (7), ambos néctares analizados cumplen con los estándares microbiológicos hasta el día final de almacenamiento. Sin embargo, pudo evidenciarse que el NB es mucho más estable microbiológicamente comparado con el NA, debido a que este último aumentó su contenido de mesófilos y levaduras al final del almacenamiento, lo que pudo deberse a que el NA es endulzado con sacarosa, una sustancia que fácilmente metabolizan los microorganismos (16).

Propiedades fisicoquímicas:

acidez titulable, pH, °Brix

Los °Brix fueron estables a través del tiempo de almacenamiento, y sus valores fueron consistentes con los reportados para productos similares de bayas del género *Vaccinium*, que reportan valores de $7,8 \pm 0,12\%$ °Brix (16). La diferencia significativa de los °Brix entre el NA y NB se debe a que al NA se le adicionó sacarosa como endulzante en la cantidad necesaria para cumplir con los °Brix exigidos por la normatividad vigente (7) para dicho producto; mientras que el NB fue endulzado con aspartame y este aporta sabor dulce, pero no contribuye con aumento de dicha variable, es decir que en

este caso este valor sería la cantidad de sacarosa que aporta la fruta por si sola.

Los valores encontrados de pH son consistentes con los reportados por la literatura para productos del género *Vaccinium*, encontrando valores para jugos de 3,04. (17), El cambio en el pH es consistente con lo reportado por otros autores durante el almacenamiento para diferentes tipos de *berries* (18).

La acidez titulable presentó un comportamiento tendiente a la disminución, consistente con reportes de otros estudios, esto podría ser un buen indicador de prolongación de la calidad del producto durante el almacenamiento (3, 19).

Análisis de consumo proximal

Se presentó una diferencia significativa ($p < 0,05$) del 6,31% en el contenido de humedad del NB con respecto al NA, dicha diferencia puede deberse a que la sacarosa para solubilizarse requiere mayor proporción de agua que el aspartame. A su vez se presentó diferencia entre el contenido de cenizas y proteína del NA con respecto a NB, el contenido de proteína pudo ser mayor en NB, debido a que el aspartame contiene fenilalanina, un aminoácido que contribuye al contenido proteico, mientras que la sacarosa no contiene dichos compuestos.

El aporte de carbohidratos y calorías totales encontrado en NA, es significativamente mayor ($p < 0,05$) al encontrado en NB, esto se debe a que NA fue endulzado con sacarosa, la cual aumenta carga calórica del producto, mientras que NB fue endulzado con aspartame, siendo este un edulcorante no calórico. Los resultados de carbohidratos totales obtenidos para NA son consistentes con los reportados por la literatura mientras que el aporte calórico es un poco inferior a dichos reportes, donde se han encontrado para néctar de mora azul, cantidades de carbohidratos totales de 15g/100g y 61 calorías por 100g, y para néctar con combinación de fresa, banana, uva y frambuesa se reporta un contenido de carbohidratos de 12g/100g y 53 calorías/100g, el promedio calórico reportado para néctares es de 56 ± 6 cal. (20).

En el NB se observó aporte de carbohidratos y calorías totales, significativamente ($p < 0,05$) menor que en NA por lo que se puede considerar un producto saludable, para todas las personas incluso aquellas que producen enfermedades crónicas, tales como la obesidad.

Análisis de metabolitos secundarios:

fenoles y antocianinas totales

Se observó pérdida significativa ($p < 0,05$) del con-

tenido de fenoles totales durante el proceso de elaboración de NA y NB. El comportamiento del contenido de fenoles totales durante el tiempo de almacenamiento fue similar en ambos néctares, observando un aumento de éstos, para NA en 30,8% y para NB en 23,44%; aumento observado también en estudio de almacenamiento de yogurt Saborizado (21) el cual puede atribuirse a varias razones, una de ellas a un efecto relacionado con una mayor producción de azúcares reductores durante el almacenamiento a lo que se refieren como "edulcorante en almacenamiento" y que son estos utilizados como sustratos para la síntesis de compuestos polifenólicos futuros, también puede deberse a un aumento en la actividad fenilalanina amonioliasa (PAL), que se traduce en un incremento en la concentración de compuestos polifenólicos libres, junto con el bajo nivel de actividad polifenoloxidasas que pueden reducir la oxidación de sustratos fenólicos a quinonas. A su vez podrían aumentar los metabolitos mencionados, como respuesta al estrés provocado durante el almacenamiento, ocurriendo reacciones derivadas del metabolismo de los compuestos fenólicos, algunos autores informan que las muestras vegetales comienzan la producción de glicoalcaloides y fenoles (22). El contenido de fenoles totales reportado al final de almacenamiento para NA y NB fue 285,02 y 455,52 (mg de ácido gálico/100 ml de muestra) respectivamente, otros autores han reportado valores inferiores para estos metabolitos medidos en (mg de ácido gálico/100 ml de muestra) en jugos de otros tipos de berries como: frambuesa roja (164,4), frambuesa negra (240,2), grosella negra (260,3), grosella roja (133) y arándano (236,3) (17); a su vez existen reportes de valores inferiores del contenido de compuestos fenólicos totales, para bebidas comerciales tales como "Berry Boost" que mezcla 4 diferentes bayas (mora, frambuesa, fresa y arándano) de la cual se reporta un contenido de 184 mg de ácido gálico/100 ml de muestra (23). Savikin y colaboradores en el año 2014 (24), reportaron un contenido de fenoles totales expresados en mg GAE/100ml para infusiones de berries como aronia (*Chokeberry*), arándano (*bilberry*) y grosellero negro (*Black currant*) de 88,77, 69,46 y 60,07 respectivamente; y para decocciones en las mismas especies de *berries* de 85,55, 63,82 y 58,64 respectivamente.

El NB mostró mayor contenido de estos compuestos fenólicos comparado con el NA.

En ambos néctares se presentó disminución signi-

ficativa ($p < 0,05$) del contenido de antocianinas desde el día inicial hasta el final de almacenamiento, dicha disminución pudo deberse a su degradación asociada a reacciones de oxidación y/o condensación con otros compuestos fenólicos (25). Se observó un porcentaje de disminución durante el tiempo de 70,8% para el NA y 64,28% para NB, disminución inferior a la reportada por Reque y colaboradores en el año 2013 para jugo de arándanos (*Vaccinium ssp.*) almacenados durante 10 días a 4°C, quienes reportan una disminución del 83%. A su vez la disminución observada en este estudio, es consistente con lo reportado en estudios por otros autores (26), algunos autores reportan valores de $0,18 \pm 0,03$ del contenido de antocianinas para el género *Vaccinium myrtillus* (15). Savikin y colaboradores en el año 2014 (24), reportaron un contenido de antocianinas totales expresados en mg C3G/100ml para infusiones de berries como aronia (*Chokeberry*), arándano (*bilberry*) y grosellero negro (*Black currant*) de 8,63, 25,68 y 8,94 respectivamente; y para decocciones en las mismas especies de *berries* de 8,12, 18,51 y 9,03 respectivamente. A pesar de presentarse en este estudio disminución durante el tiempo de almacenamiento del contenido de antocianinas totales, pudo encontrarse en el día 42 para ambos néctares un contenido alto, incluso mayor al reportado por otros autores para productos provenientes de bayas del mismo género, este contenido podría deberse a que las bayas fueron liofilizadas con epicarpio incluido, lo cual favorece el aumento del contenido de dichos compuestos. Esto permite rescatar que el néctar desarrollado a partir del liofilizado como un ingrediente, mantiene un contenido mayor de antocianinas, con respecto a valores encontrados en la literatura.

Propiedades antioxidantes

El tiempo inicial presentó un valor ORAC alto para ambos néctares, (Tabla 3 y 4), siendo este mayor en NB, posiblemente debido a que en este queda más solvente disponible, es decir agua, para solubilizar otros compuestos, la sacarosa para solubilizarse requiere mayor proporción de agua que el aspartame. El alto valor ORAC inicial podría ser atribuido en gran parte al contenido de fenoles totales; sin embargo el contenido de dichos fenoles, presentó un aumento durante el almacenamiento (Ver figura 1 A.), y esto no generó aumento en la actividad antioxidante, pues dicha actividad continuo un comportamiento tendiente a la disminución durante todo el periodo de estudio, por lo

que puede argumentarse que la actividad antioxidante puede estar mediada además, por el contenido de otros compuestos no polifenólicos, o incluso por la interacción sinérgica que se encuentra dentro de los componentes de cada néctar y que podría verse afectada durante el almacenamiento.

Existió pérdida significativa ($p < 0,05$) de la capacidad antioxidante medida por el valor ORAC durante la elaboración de los néctares; así mismo hubo disminución significativa ($p < 0,05$) durante el tiempo de almacenamiento del valor ORAC en ambos néctar para NA la disminución fue 52,2%; mientras que para el néctar B fue 74,6%, observando entonces mayor estabilidad en el néctar A.

El ensayo ORAC, permitió estimar “*in vitro*” el potencial que tiene cada uno de los néctares para aportar antioxidantes al organismo, y los resultados encontrados permiten ubicar a NA y NB, durante los primeros días de almacenamiento, como productos con alta capacidad antioxidante comparados con productos de otras especies de berries, encontrando valores ORAC (reportados en μmol equivalentes de trolox/100ml de muestra) de 1452 para jugo de arándano (*cranberry*) sin azúcar y 2370 para jugo de cereza negra (26); 2359 para jugos de mora azul (*blueberry*) y 1480 para uva y arándano (*cranberry*) (27), 10460 para jugo de frambuesa negra (27).

Existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la capacidad antioxidante FRAP del liofilizado y cada uno de los néctares.

Los resultados de actividad antioxidante por FRAP, evidenciaron cambio significativo ($p < 0,05$) entre NA y NB, observándose mayor capacidad reductora en el néctar B al inicio del almacenamiento (Ver figura 3 B.); sin embargo el néctar A fue más estable durante el tiempo de almacenamiento observando una disminución de 8,37% de actividad antioxidante, mientras que en el néctar B se observó una disminución de 21,5%.

Actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa incrementó de forma dependiente con la dosis (figura 5). Esto se ve reflejado en el aumento del % de inhibición de la viabilidad celular, dependiente de la concentración del néctar, lo que indicó un efecto citotóxico del néctar de agraz sobre las células cancerígenas SW480. La concentración con mayor efecto citotóxico fue 1,0g/mL, alcanzando un % de inhibición mayor del 30% para el néctar B después de 48 horas de exposición y más de un 50% en ambos

néctar después de 72 horas de exposición. El néctar B mostró mayor % de inhibición de crecimiento de células cancerígenas que el néctar A; 39,25% a las 48 horas de exposición a una concentración de 1,0g/mL y 68,30% a las 72 horas a esta misma concentración. El valor IC50 para el tiempo de exposición de 48 horas del NA y NB fue 1,12 y 0,4g/mL respectivamente y para el tiempo de 72 horas fue 0,60 g/ml (néctar A) y 1,04 g/mL (NB). Esto demuestra que el néctar A, a las 72 horas presenta mejor actividad antiproliferativa que el NB.

Nuestros resultados son consistentes con otros resultados previos de acción biológica “*in vitro*” de extractos y jugos (5, 17).

Se pudo observar estabilidad en las características fisicoquímicas °Brix y pH en ambos néctares durante el proceso de almacenamiento y cambios en la AT. El NB mostró mayor contenido de metabolitos secundarios antocianinas totales, fenoles totales y actividad antioxidante por FRAP y ORAC al inicio del almacenamiento, además presentó menor aporte calórico comparado con NA, por lo cual se considera mejor opción para aportar beneficios para la salud, favoreciendo incluso su consumo por personas que padecen enfermedades crónicas tales como diabetes y obesidad.

Pese a que durante el estudio el NA presentó menor contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante comparado con el NB, este último, mostró mejor actividad antiproliferativa contra células de adenocarcinoma de colon SW480, por lo que se sugieren más estudios comparativos de ambos productos para conocer los mecanismos de acción involucrados y los compuestos responsables del efecto antiproliferativo aquí observado contra esta línea celular, previo a su aplicación en modelos animales que permitan demostrar su eficacia quimiopreventiva contra el cáncer colorrectal.

CONCLUSIÓN

El tiempo de almacenamiento por 42 días disminuyó el contenido de fenoles y antocianinas totales con la consecuente reducción de la actividad antioxidante FRAP y ORAC, aunque no alteró significativamente las variables °Brix, pH. El néctar A mostró mayor actividad antiproliferativa. Podría pensarse como opción el mercadeo del agraz liofilizado como ingrediente directo para el desarrollo de néctar y otros productos nu-

tracéuticos, cuyo consumo debería ser en los primeros días de almacenamiento, debido a que fue el tiempo en el cual se presentó mayor capacidad antioxidante y acción antiproliferativa. Los resultados encontrados sugieren el potencial que tiene el néctar de agraz para aportar antioxidantes al organismo, presentando además actividad antiproliferativa “*in vitro*”, y siendo el NB una opción más saludable para consumo de sustancias antioxidantes comparado con NA, de acuerdo a los resultados encontrados en este estudio y a su bajo aporte calórico, apto para personas con enfermedades crónicas como diabetes u obesidad. Debido a que la evidencia de la capacidad anticancerígena de *Vaccinium meridionale* está limitada a un solo estudio *in vitro*, en células de adenocarcinoma de colon, son necesarios estudios adicionales tanto “*in vitro*” e “*in vivo*” con este tipo de baya, que permitan conocer su eficacia quimio-preventiva y mecanismos moleculares de acción para el cáncer colorrectal, así como ampliamente se ha estudiado otras bayas del mismo género pero no *Vaccinium meridionale* (agraz).

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.

REFERENCIAS

1. Crowe KM, Murray, E. Deconstructing a fruit serving: comparing the antioxidant density of select whole fruit and 100% fruit juices. *J. Acad.Nutr. Diet.* 113(10), 2013. Pág. 1354 - 1358.
2. 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.
3. Garzón GA, Narváez CE, Riedl KM, Schwartz SJ. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilderry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. *Food Chem* 122, (2010). Pág. 980 - 986.
4. Ávila Rodríguez HG, Cuspoca Riveros JA, Fischer G, Ligarreto Moreno GA, Quicazán de Cuenca MC. Caracterización fisicoquímica y organoléptica del fruto de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) almacenado entre 1 y 2°C. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.* 60(2). (2007). Pág. 4179 - 4193
5. Maldonado ME, Arango SS, Rojano BA. Free radical scavenging, cytotoxic and antiproliferative effects of *Vaccinium meridionale* Sw in human colon cancer cell lines. *Rev. Cubana Plant Med* vol.19 no.2 Ciudad de la Habana. (2014). Pág. 172 - 184.
6. Franco Tobón YN. Composición, actividad antioxidante y antiproliferativa de pulpa congelada, pulpa liofilizada y néctares del fruto agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) [Tesis]. Medellín: Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias; 2016
7. Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. Resolución 3929/2013 de 02 de octubre. *Diario Oficial*, n° 48.933, (04-10-13).
8. ICONTEC Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación NTC 4624. Jugo de frutas y hortalizas. Determinación del contenido de sólidos solubles. Método refractométrico. Pág. 11. Bogotá-Colombia (1999)
9. ICONTEC Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación NTC 440. Productos alimenticios y métodos de ensayo. Bogotá-Colombia (2015)
10. Giusti M, Rodríguez E, Wrolstad. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *J. Agric. Food Chem* 47(11). (1999). Pág. 4631 - 4637.
11. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic -phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965; 16(3): 144-158.
12. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal.Biochem.*239(1). (1996). Pág. 70 - 76.
13. 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*49(10). (2001). Pág. 4619 - 4622.
14. Maldonado ME, Bousseruel S, Gossé F, Minker C, Lobstein A, Raul F. Differential induction of apoptosis by apple procyanidins in TRAIL-Sensitive Human Colon Tumor Cells and Derived TRAIL-Resistant Metastatic Cells. *J. cancer mol.* 5 (1). 2009. Pág. 21 - 30.
15. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2010. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. Nutrient Data Laboratory Home Page: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/orac> Bhagwat S. USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2
16. Camacho A, Giles M, Ortegón A, Palao M, Serrano B,

- Velázquez O. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México, 2009.
17. Konic Ristic A, Savikin K, Zdunic G, Jankovic T, Juranic Z, Menkovic N, Stankovic I. Biological activity and chemical composition of different berry juices. *Food Chem.* 125. 2011. Pág. 1412 – 1417.
 18. Hornedo-Ortega, R; Álvarez-Fernández, A; Cerezo, Ana B; Troncoso, Ana M; García-Parrilla, MC. Influence of storage conditions on the anthocyanin profile and colour of an innovative beverage elaborated by gluconic fermentation of strawberry. *J.Funct. Foods*, 23. 2016. Pág. 198 – 209.
 19. 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*, 65 (2). (2012). Pág. 6615 – 6625.
 20. Ninfali P, Chiarabini A, Angelino D. The ORAC/kcal ratio qualifies nutritional and functional properties of fruit juices, nectars, and fruit drinks. *Int J Food Sci Nutr*, 65(6). 2014. Pág. 708 – 712)
 21. Zapata IC, Sepúlveda-Valencia U, Rojano BA. Efecto del Tiempo de Almacenamiento sobre las Propiedades Fisicoquímicas, Probióticas y Antioxidantes de Yogurt Saborizado con Mortiño (*Vaccinium meridionale Sw*). *Inf. tecnol.* vol.26 no.2 La Serena 2015.
 22. Ginzberg I, Tokuhisa JG, Veilleux RE. Potato steroidal glycoalkaloids: Biosynthesis and genetic manipulation. *Potato Research.*: 52 (1), 2009. Pág. 1- 15.
 23. Medina M. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *J.Funct. Foods* 3. 2011. Pág 79 - 87
 24. Savikin K, Zdunić G, Janković T, Godevac D, Stanojković T, Pljevljakusić D. Berry fruit teas: Phenolic composition and cytotoxic activity. *Food Res. Int.* 62. 2014. Pág. 677 - 683.
 25. Reque PM, Steffens RS, Jablonski A, Flores SH, Rios AO, Jong EV. Cold storage of blueberry (*Vaccinium spp.*) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity. *J. Food Comp. Anal*, 33, 2013. Pág. 111 - 116.
 26. Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M, Heber D. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 2008. Pág. 1415 - 1422.
 27. Hager A, Howard LR, Prior RL, Brownmiller C. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed black raspberry products. *J. Food Sci*; 73. 2008. Pág. H134 - H140.

Recibido: 06-06-2016

Aceptado: 23-08-2016