



Composición, actividad antioxidante y antiproliferativa de pulpa congelada, pulpa liofilizada y néctares
del fruto agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz)

Yuly Nataly Franco Tobón

Tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Tutora

María Elena Maldonado Celis

PhD en Ciencias de la vida

Comité tutorial

Benjamín Alberto Rojano

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Maestría en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias: Énfasis Alimentos

Medellín

Junio de 2016

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme salud, fortaleza y sabiduría en todo este proceso.

A mi tutora Maria Elena Maldonado, de la Escuela de Nutrición y Dietética de la Universidad de Antioquia, por sus enseñanzas y acompañamiento.

A mi asesor Benjamín A. Rojano, del Grupo de Ciencia de los Alimentos y Productos Naturales de la Universidad Nacional (sede Medellín) por su apoyo incondicional, por enseñarme que la academia es importante, pero que no tiene sentido llenarse de conocimientos sino se ponen al servicio del otro.

A Felipe Alzate Arbeláez por su acompañamiento, enseñanzas, e inmensa calidez humana.

A todos los compañeros del Grupo de Ciencia de los Alimentos y Productos Naturales de la Universidad Nacional (sede Medellín) por acogerme, abrirme las puertas y recibirme con tanta amabilidad

A mi familia, especialmente a mi madre por su amor incondicional y por iluminar mi vida siempre.

A mis amigos Liliana María Arroyave, Diana C Chaparro Rojas, Sebastián Orrego, Iván Gómez por su acompañamiento incondicional, por su apoyo, por hacerme sonreír y comprender que todo en esta vida se puede lograr.

A los profesores de la Universidad de Antioquia Alejandro Estrada Restrepo, Escuela de Nutrición y Dietética y Gabriel Agudelo Viana, Facultad de Ciencias Exactas, José Contreras Calderón y Andrés Pereañez Jiménez de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias por sus valiosas enseñanzas y su apoyo.

A don Mario González Rendón por el suministro de la fruta y la posibilidad de permitirme conocer más sobre ella.

Al personal de Icoal S.A.S por los servicios brindados y por su amabilidad y calidad humana.

A la Estrategia de Sostenibilidad 2014-2015 de la Universidad de Antioquia.

A todos los que de diferentes formas contribuyeron con el desarrollo y finalización de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Material Vegetal:.....	13
Preparación de pulpa congelada y pulpa liofilizada:.....	13
Preparación de néctares:.....	13
Acidez Titulable, pH, °Brix:	14
Análisis de Composición Proximal:.....	14
Reactivos y equipos.....	14
Determinación del contenido de antocianinas.....	15
Determinación del contenido de fenoles totales.....	15
Ensayo FRAP (<i>Ferric ion Reducing Antioxidant Power</i>).....	15
Ensayo ORAC (<i>oxygen radical absorbance capacity</i>)	16
Análisis microbiológico	17
Análisis de la actividad antiproliferativa.....	17
Cultivos celulares	18
Medición del Color.....	18
Análisis Estadístico	19
RESULTADOS	19
Análisis microbiológico	19
Propiedades fisicoquímicas: acidez titulable, pH, °Brix, actividad acuosa.	21
Análisis de Composición proximal	21
Análisis fitoquímico: contenido de fenoles totales y antocianinas totales	25

Propiedades antioxidantes	26
Medición del color	28
Actividad antiproliferativa	28
DISCUSIÓN	29
Análisis microbiológicos.....	29
Propiedades fisicoquímicas: acidez titulable, pH, °Brix, actividad acuosa.	29
Análisis de Composición proximal	32
Contenido de Metabolitos secundarios: Fenoles Totales y Antocianinas Totales	33
Propiedades antioxidantes	36
Medición del color	38
Actividad antiproliferativa	39
CONCLUSIONES	40
PRODUCCIÓN ACADÉMICA	41
Artículos científicos	41
Presentaciones en Congreso Nacional e Internacional.....	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Análisis microbiológicos para PAC almacenado a $-10\pm 2^{\circ}\text{C}$ y PAL almacenado a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.	19
TABLA 2: Resultados análisis microbiológicos en ambos néctares periodo inicial y final del almacenamiento	19
TABLA 3: Propiedades fisicoquímicas, fenoles totales, antocianinas totales y actividad antioxidante del agraz liofilizado utilizado como ingrediente para la elaboración de los néctares.....	20
TABLA 4: Características fisicoquímicas de pulpa de agraz congelada (PAC) almacenada a $-10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de agraz, Intervalo de Confianza del 95% para la media de cada variable.	22
TABLA 5: Características fisicoquímicas de la pulpa de agraz liofilizada (PAL) almacenada a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Intervalo de Confianza del 95% para la media de cada variable	22
TABLA 6: Composición proximal del néctar A (NA) y néctar B (NB), al inicio del almacenamiento ..	23
TABLA 7: Características fisicoquímicas y capacidad antioxidante del néctar A (NA), durante un periodo de almacenamiento de 42 días a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. Intervalo de confianza del 95% para la media de cada variable.....	24
TABLA 8: Características fisicoquímicas y capacidad antioxidante del néctar B (NB) durante un periodo de almacenamiento de 42 días a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Intervalo de Confianza del 95% para la media de cada variable.....	24
TABLA 9: Contenido de fenoles, antocianinas y actividad antioxidante de pulpa de agraz congelada (PAC) y pulpa de agraz liofilizada (PAL)	25

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Contenido de Fenoles totales durante almacenamiento. **B.** Contenido de Antocianinas totales durante almacenamiento. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). 25

FIGURA 2: Contenido de 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 ($P \leq 0,05$). 26

FIGURA 3: Valores FRAP durante los días de almacenamiento. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). 27

FIGURA 4: **A.** Valores FRAP durante los días de almacenamiento. **B.** Valores 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 ($P \leq 0,05$). 27

FIGURA 5: Cambio general (ΔE) del color durante el almacenamiento para cada uno de los néctares 28

FIGURA 6: 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 ($n=3$) 28

LISTA DE ABERVIATURAS

AT: Acidez titulable

FRAP (*Ferric ion Reducing Antioxidant Power*): Capacidad reductora de hierro

NA: Néctar de agraz endulzado con sacarosa

NB: Néctar de agraz endulzado con aspartame

ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*): Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

PAC: Pulpa de agraz congelada

PAL: Pulpa de agraz liofilizada

RESUMEN

ANTECEDENTES: El 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 calidad microbiológica de pulpa de agraz congelada (PAC) pulpa de agraz liofilizada (PAL), néctar A endulzado con sacarosa (NA) y néctar B endulzado con edulcorante (NB), evaluando en estos últimos productos, la actividad antiproliferativa y analizando el comportamiento durante 60 días de almacenamiento para las pulpas a intervalos de 15 días y durante 42 días de almacenamiento para los néctares a intervalos de 7 días. **MÉTODOS:** Bayas frescas, obtenidas del municipio del Retiro (Antioquia) fueron lavadas, seleccionadas, desinfectadas, secadas y procesadas por 2 min a 2500 rpm. El 50% de esta pulpa fue congelada 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 $0,427 \pm 0,5$ mm Hg, a temperatura de 50°C y se almacenó a 28°C y protegido de la luz en cantidades de 200g en empaque PET aluminio, polietileno de baja densidad. A partir del agraz liofilizado se prepararon dos néctares: NA (sacarosa) y NB (aspartame 3%), cada néctar se agregó a botellas de vidrio de 500mL y fue pasteurizado a 85°C por 10 min y se almacenó a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ protegido de la luz. Para PAC y PAL se midió % humedad, cenizas, grasa, proteína, carbohidratos, calorías totales y actividad durante el almacenamiento. Para PAC, PAL, NA y NB se midieron pH, °Brix, acidez titulable, y 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. En el día inicial se analizó en NA y NB, la actividad antiproliferativa por ensayo de sulforodamina B en células SW480 (adenocarcinoma de colon). **RESULTADOS:** Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de la composición y actividad antioxidante entre PAC y PAL,

presentándose poca variación y diferencias no significativas durante el almacenamiento en pH, °Brix, a_w (liofilizado), %humedad, grasa, cenizas, carbohidratos y calorías totales. 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. 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 ácido ascórbico/100g) y valor ORAC 33935 ($\mu\text{mol Trolox} / 100\text{g}$). En cuanto a NA y NB ambos mostraron estabilidad en °Brix, pH y color. 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 ($\text{IC}_{50}=0,6\text{g/mL}$) con respecto a NB. **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 permitiría al productor abastecimiento constante de la fruta para el mercado, a su vez la fruta liofilizada se convierte en un buen ingrediente para el desarrollo de productos como néctares. Los néctares evaluados (NA y NB) presentaron capacidad antioxidante y antiproliferativa durante los primeros días de almacenamiento, sin afectar las características fisicoquímicas aquí analizadas. Estudios adicionales de su actividad biológica y antioxidante para beneficio humano son requeridos para demostrar su potencial funcional descrito hasta ahora *in vitro*.

Palabras claves: *Vaccinium meridionale*, características fisicoquímicas, estabilidad microbiológica actividad antioxidante, , actividad antiproliferativa, fenoles, antocianinas.

ABSTRACT

BACKGROUND: Agraz is a globose berry, deep purple when ripe. It has high antioxidant capacity compared to the same genus berries, attributed to the content of polyphenolic compounds. **AIM:** To evaluate the composition, antioxidant activity and microbiological quality of pulp sour grapes frozen (PAC) pulp lyophilized verjuice (PAL), nectar A sweetened with sucrose (NA) and nectar B sweetened with sweetener (NB), evaluating the latter products, antiproliferative activity and analyzing the behavior for 60 days storage to the pulps at intervals of 15 days and for 42 days storage nectars at intervals of 7 days. **METHODS:** Fresh berries, obtained from the municipality of Retiro (Antioquia) were washed, selected, disinfected, dried and processed for 2 min at 2500 rpm. 50% of this pulp was frozen at $-10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, packed in portions 200g in packaging coextruido flexible polyethylene polyamide and 70 microns. The remaining 50% was freeze-drying vacuum chamber pressure 0.427 ± 0.5 mmHg at 50°C and stored at 28°C and protected from light in PET aluminum packaging in amounts 200g, low density polyethylene. From lyophilized agraz two nectars were prepared: NA (sucrose) and NB (Aspartame 3%), each nectar glass bottles 500mL was added and was pasteurized at 85°C for 10 min and stored at $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ protected from light. For PAC and PAL % moisture, ash, fat, protein, carbohydrates, total calories and activity it was measured during storage. For PAC, PAL, NA and NB pH, $^{\circ}\text{Brix}$, titratable acidity is measured, and the content of phenols and anthocyanins was determined by Folin-Ciocalteu method and differential pH, respectively. The antioxidant activity by FRAP and ORAC. In the initial days it was analyzed NA and NB, the antiproliferative activity by sulforhodamine B assay in SW480 cells (colon adenocarcinoma). **RESULTS:** Statistically significant differences ($p < 0.05$) of the composition and antioxidant activity between PAC and PAL were found, presenting little variation and no significant differences in pH during storage, $^{\circ}\text{Brix}$, a_w (lyophilized), % moisture, fat, ash, carbohydrates and total calories. Titratable acidity expressed in mg citric acid/ml, significantly ($p < 0.05$)

through the storage time for PAC and PAL. 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 (ascorbic mg / 100 g acid) and ORAC 33935 (umol Trolox / 100g) value. As NA and NB both showed stability in °Brix, pH and color. The content of total phenols increased during storage. The anthocyanin content and antioxidant capacity was significantly reduced ($p < 0.05$). NA presented to better antiproliferative 72h ($IC_{50} = 0.6g / mL$) with regard to NB activity.

CONCLUSION: physicochemical variables were analyzed in the PAL stable and content of polyphenolic compounds retained for longer compared to the PAC. Whereas agraz has two growing seasons a year in Colombia (May and December), freeze-drying is a strategy that would allow the producer steady supply of fruit to the market, in turn lyophilized fruit becomes a good ingredient for product development as nectars. Nectars evaluated (NA and NB) showed antioxidant and antiproliferative capacity during the first days of storage, without affecting the physicochemical characteristics analyzed here. Additional studies of their biological and antioxidant activity for human benefit are required to demonstrate their functional potential far described in vitro.

Keywords: *Vaccinium meridionale*, physicochemical characteristics, microbiological stability antioxidant activity, antiproliferative activity, phenols, anthocyanins.

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país con una gran variedad de frutas en el mundo, por lo menos 150 frutos son originarios de éste y su consumo actualmente ha incrementado a nivel doméstico y en los mercados internacionales (1), tanto en fruta fresca como en productos, aunque está claro que la mejor forma de obtener antioxidantes es por medio del consumo directo de la fruta entera sin transformación (2). Actualmente en Colombia hay una mayor inclinación por el consumo de bebidas en forma de néctares o jugos, especialmente aquellos que contengan sustancias fitoquímicas que puedan tener un beneficio positivo en la salud (3, 4, 5, 6).

Entre los frutos existentes en Colombia, se encuentra el agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale Swartz*), siendo este país en Suramérica el que presenta mayor riqueza en especies de este género, gracias a su gran diversidad de microclimas, relieves topográficos y tipos de suelos, y específicamente el departamento de Antioquia es la zona con mayor variabilidad y diversidad de ericáceas, con 23 géneros y más de 100 especies (7), éste departamento posee más reportes de presencia de *Vaccinium meridionale Swartz* (8). El agraz o mortiño es un 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, que con frecuencia se agrupa dentro del mismo renglón económico de los arándanos y “berries”, puede crecer en zonas tropicales de montaña, en altitudes bajas como América Central y el Norte de Sur América (2200 a 3400msnm) y en otros países como Venezuela, comercializándose para su consumo como fruta fresca o en productos como vinos, mermeladas, jaleas y yogures (9).

Algunos estudios han documentado la composición de antocianinas, fenoles totales, actividad antioxidante, color y características fisicoquímicas del fruto agraz o de extractos de este (10, 11, 12, 13); demostrando que posee una alta capacidad antioxidante comparable con otras especies del género *Vaccinium* (14, 15), estimada como una fuente de fitoquímicos con potencial efecto nutracéutico.

Además un estudio realizado por Maldonado y colaboradores en el año 2014 (16) con extracto acuoso de este fruto, mostró actividad citotóxica y antiproliferativa 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 extractos de éste, pocos son los estudios que han evaluado sus propiedades fisicoquímicas y antioxidantes a través del tiempo en productos elaborados a partir de la fruta, tales pulpa congelada, pulpa liofilizada y néctares o jugos, y no hay investigaciones donde se haya estudiado la capacidad antiproliferativa de estos últimos productos en modelos celulares. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto en las características fisicoquímicas (pH, °Brix, acidez titulable, color), actividad antioxidante de PAC, PAL, NA y NB y la actividad antiproliferativa de éstos últimos productos.

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 y pulpa liofilizada: Las bayas fueron lavadas, seleccionadas, desinfectadas con hipoclorito de sodio (100 ppm), secadas y procesadas por 2 min a 2500 rpm. El 50% de esta pulpa fue congelada 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 $0,427 \pm 0,5$ mm Hg, a temperatura de 50°C y se almacenó a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y protegido de la luz en cantidades de 200g en empaque PET aluminio, polietileno de baja densidad.

Preparación de néctares: Se utilizaron bayas de agraz 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 higiene y parámetros fisicoquímicos establecidos en normatividad vigente (17, 18). Cada néctar se agregó a botellas de vidrio de 500mL, se pasteurizó a 85°C por 10 min y se almacenó a 4°C ± 2°C protegido de la luz.

Acidez Titulable, pH, °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 fruta. El pH se realizó en 2 g de homogeneizado por 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 (19) y NTC-440 (20).

Análisis de Composición Proximal: Se determinaron parámetros como % humedad, grasa total, cenizas totales, proteína total, carbohidratos y calorías totales, actividad acuosa (a_w). 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[®] (Acido 6-hidroxi- 2,5,8-tetrametilchromano-2-carboxylico), 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

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 (21). 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 miligramos equivalentes de cianidin-3-glucósido (C3G) por 100 g de muestra, para el agraz liofilizado utilizado como ingrediente y miligramos equivalentes 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* (22). 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 caso del liofilizado y para el caso de los néctares los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 ml de muestra. La absorbancia fue medida en un 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 (23). 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 fruta fresca (AAC)/100g (FF). 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 de Ou y colaboradores en el año 2001 (24), 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. La muestra contiene 21 μ l de fluoresceína, 2,899 μ l de PBS, 30 μ l de diluciones de néctar de agraz y 50 μ l 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 (μ mol equivalentes de trolox por 100ml 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 fluorescencia se midió en un espectrofotómetro de fluorescencia PerkinElmer® 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 $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 48 horas, posteriormente se contó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mL. El análisis de coliformes totales y fecales (NMP) para NA y NB, se realizó de acuerdo a AOAC 966.24 ed. 17 para este 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. El análisis de coliformes totales y fecales (UFC/g) para PAC y PAL se realizó según la NTC 4458 de 2007 (25), 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 sembró en profundidad 1 mL de cada dilución en agar Cromo Coult, incubadas a 37°C por 48 h. Los mohos y levaduras (UFC/ml) fueron evaluados de acuerdo a AOAC 17.2.02 ed.17 de la siguiente manera: alícuotas de 1 mL de cada dilución fueron sembradas en cajas Petri de agar OGY (agar extracto de levadura glucosa cloranfenicol). La incubación se llevó a cabo a 25°C por cinco días y se realizó la respectiva lectura.

Análisis de la actividad antiproliferativa

Esta fue realizada en NA y NB, 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 50uL 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 200uL 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 (26). Brevemente, se utilizó medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con 10% suero de caballo inactivado, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomycin, y 1% de aminoácidos no-esenciales. Las incubaciones se hicieron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Para todos los experimentos, 24 h después de sembrar, se hizo reducción de la concentración del medio a 3% de suero, con 10 µg/mL insulina, 5 µg/mL de transferrina, 5 ng/mL de selenio.

Medición del Color

Se midió el color en NA y NB con un colorímetro Kónica-Minolta CR400. Las determinaciones se realizaron en un ambiente con temperatura constante (25 °C). La escala de color utilizada fue CIE L*a*b* (CIELAB), el cual es un modelo estándar internacional para la medición del color, desarrollada por la Comisión Internacional de la iluminación (*Commission internationale de l'éclairage*: CIE), en 1976, la cual es uniforme y el espacio de color está organizado en forma de esfera. El valor máximo de L* es 100 que representa una perfecta reflectancia difusa (blanco), y el valor mínimo es 0 el cual representa el negro. Los valores de a* y b* no tienen un límite numérico específico. Cuando a* es positiva representa el rojo y cuando es negativa el verde. Cuando b* es positivo representa amarillo y cuando es negativo azul (27, 28, 29). Se calculó el cambio general del color (ΔE) durante el almacenamiento por medio de la ecuación 2:

$$\Delta E = ((L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2)^{1/2} \quad (2)$$

Análisis Estadístico

Los análisis fueron realizados por triplicado. Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar, comprobando homogeneidad de varianza 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

La contaminación microbiológica de coliformes totales y fecales fue analizada en PAC, mientras que la de hongos y levaduras se analizó en PAL durante los días 1, 15, 35 y 60 de almacenamiento. Los resultados se muestran en la tabla 1.

TABLA. 1 Análisis microbiológicos para PAC almacenado a -10 ± 2 °C y PAL almacenado a 25 ± 2 °C

	PAC almacenada a -10 ± 2 °C		PAL almacenamiento a 25 ± 2 °C	
Tiempo (días)	Coliformes Totales UFC/g	E. Coli UFC/g	Recuento de Mohos	Recuento de Levaduras
1	<10	<10	200	<10
15	<10	<10	140	<10
35	<10	<10	130	<10
60	<10	<10	80	<10

En cuanto a los néctares, el NA aumentó su contenido de mesófilos y levaduras al final del almacenamiento, mientras que el NB permaneció estable microbiológicamente. (Tabla 2.)

TABLA 2. 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

En la tabla 3. Se observa la composición inicial del liofilizado de agraz utilizado como ingrediente para la elaboración de los néctares, se utilizó este como ingrediente, con el objetivo de obtener un producto con valores ORAC mayores a 3000 μ mol equivalentes de trolox por 100ml de muestra, buscando potenciar un posible efecto nutracéutico.

Se observó que no existe diferencia entre el pH del agraz liofilizado y los néctares, ni tampoco entre ambos néctares; sin embargo, si hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los °Brix y la AT del agraz liofilizado y cada uno de los néctares.

En cuanto al contenido de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante por el método FRAP, se evidenció diferencia significativa ($p < 0,05$) en el liofilizado y cada uno de los néctares.

Se presentó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la capacidad antioxidante ORAC del liofilizado y cada uno de los néctares pero no existió diferencia entre NA y NB.

TABLA 3. 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, actividad acuosa.

No se encontró efecto significativo del tiempo del almacenamiento sobre el pH y los °Brix, para PAC y PAL. (Tablas 4 y 5).

La acidez titulable varió a través del tiempo almacenamiento para PAC y PAL entre 1,65-1,82 y 4,66-4,79 respectivamente, se encontró diferencia significativa ($p < 0,005$) entre el tiempo de almacenamiento inicial y los tiempos restantes y entre el tipo de producto ($p < 0,05$) (Tabla 4 y 5).

Los resultados para NA y NB, indicaron estabilidad en °Brix, pH, y se presentó cambio en el color y disminución de la acidez titulable, durante los días de almacenamiento estudiados. (Tabla 5 y 6).

El a_w medido en PAL presentó poco cambio durante el período de almacenamiento estudiando (Tabla 5).

Análisis de Composición proximal

El % humedad durante el almacenamiento para la PAC y PAL varió respectivamente entre 83,22-83,37% y 5,28 y 7,52% sin presentar diferencias significativas.

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 respectivamente, siendo el cambio significativo entre el día 15 y el día 60 de almacenamiento (figura 1. B)

El contenido de grasa total presentó una baja tasa de variación, entre 0,19-0,22 y 1,44-1,41 para PAC y PAL respectivamente, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las muestras. Si se observó diferencia para el contenido de grasa entre la PAC y la PAL.

La cantidad de cenizas totales para PAC y PAL fue 0,28 – 0,49 y 1,75 – 1,76 respectivamente, la variación de esta característica durante el tiempo de almacenamiento fue baja y no se presentaron cambios significativos. Un resultado similar se observó en cuanto a la variación del contenido de carbohidratos totales para PAC y PAL; sin embargo, se encontró diferencia significativa del contenido entre ambos productos ($p < 0,05$). (Tablas 4 y 5).

TABLA 4. Características fisicoquímicas de pulpa de agraz congelada (PAC) almacenada a $-10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de agraz, Intervalo de Confianza del 95% para la media de cada variable

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

TABLA 5. Características fisicoquímicas de la pulpa de agraz liofilizada (PAL) almacenada a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Intervalo de Confianza del 95% para la media de cada variable

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

En la tabla 6. Se muestran los resultados de la composición proximal del NA y NB, al inicio del almacenamiento.

Existe diferencia estadística ($p < 0,05$) entre el % humedad, cenizas, proteína, carbohidratos y calorías totales del NA con respecto a NB.

TABLA 6. Composición proximal del NA y NB, al inicio del almacenamiento

Néctar	%humedad	Cenizas (gramos)	Grasa total (gramos)	Nitrógeno total(gramos)	Proteína total(gramos)	Carbohidratos totales(gramos)	Calorías totales
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

TABLA 7. Características fisicoquímicas y capacidad antioxidante del Néctar A durante un periodo de almacenamiento de 42 días a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. Intervalo de Confianza del 95% para la media de cada variable

NÉCTAR A										
Días	pH	Acidez titulable (mg ácido cítrico/100 mL)	°Brix	Fenoles totales (mg GAE/100mL)	Antocianinas totales (mg eq de C3G/100mL)	FRAP mg Ácido ascórbico/100ml	ORAC μmol Trolox / 100 ml muestra	Color (CIELAB)		
								L*	a*	b*
0	3,06 \pm 0,01	4,35	11,03 \pm 0,12	217,93 \pm 3,22	56,44 \pm 2,90	459,51 \pm 4,19	6531,35 \pm 226,38	5,92 \pm 0,22	4,36 \pm 0,12	2,12 \pm 0,55
7	3,17 \pm 0,20	4,33	11,00 \pm 0,10	207,39 \pm 4,21	36,13 \pm 3,11	437,57 \pm 61,12	5543,78 \pm 136,26	8,97 \pm 2,27	4,06 \pm 1,11	2,74 \pm 0,56
14	3,19 \pm 0,25	4,41	10,99 \pm 0,19	181,36 \pm 28,54	29,50 \pm 6,67	454,32 \pm 38,96	4522,62 \pm 63,11	10,98 \pm 2,40	4,31 \pm 1,31	2,68 \pm 0,97
21	3,20 \pm 0,06	3,94	11,05 \pm 0,13	346,92 \pm 5,80	21,49 \pm 4,14	434,18 \pm 3,54	4028,29 \pm 179,75	12,49 \pm 2,27	5,55 \pm 0,79	4,13 \pm 2,90
28	3,22 \pm 0,01	3,83	10,87 \pm 0,06	330,12 \pm 16,91	22,32 \pm 2,15	429,19 \pm 20,45	4140,06 \pm 172,69	13,05 \pm 1,64	6,25 \pm 1,07	5,69 \pm 2,36
35	3,24 \pm 0,01	3,24	10,98 \pm 0,17	302,28 \pm 8,99	18,20 \pm 2,36	420,61 \pm 12,25	4043,34 \pm 180,01	13,25 \pm 0,25	5,68 \pm 1,51	6,45 \pm 3,18
42	3,25 \pm 0,02	2,57	10,90 \pm 0,10	285,02 \pm 7,91	16,48 \pm 2,24	412,04 \pm 18,90	3410,29 \pm 111,96	13,18 \pm 0,25	5,37 \pm 1,41	6,85 \pm 0,27

TABLA 8. Características fisicoquímicas y capacidad antioxidante del Néctar B durante un periodo de almacenamiento de 42 días a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. Intervalo de Confianza del 95% para la media de cada variable

NÉCTAR B										
Días	pH	Acidez titulable (mg ácido cítrico/100 ml)	°Brix	Fenoles totales (mg GAE/100mL)	Antocianinas totales (mg eq de C3G/100mL)	FRAP mg Ácido ascórbico/100ml	ORAC μmol Trolox / 100 ml muestra	Color (CIELAB)		
								L*	a*	b*
0	3,10 \pm 0,01	5,29	4,97 \pm 0,06	242,55 \pm 7,41	63,57 \pm 1,58	580,27 \pm 9,85	7702,43 \pm 298,22	6,58 \pm 0,22	4,90 \pm 0,31	2,56 \pm 0,28
7	3,09 \pm 0,01	5,59	5,00 \pm 0,00	183,37 \pm 1,65	31,17 \pm 2,76	570,41 \pm 12,77	4767,50 \pm 242,87	10,26 \pm 0,22	5,28 \pm 0,37	3,60 \pm 0,70
14	3,13 \pm 0,01	5,29	4,90 \pm 0,00	181,96 \pm 28,54	30,06 \pm 3,82	556,83 \pm 24,96	4165,89 \pm 152,42	11,61 \pm 1,47	4,03 \pm 1,30	3,57 \pm 0,36
21	3,15 \pm 0,01	4,68	4,97 \pm 0,06	314,23 \pm 8,10	27,94 \pm 6,14	511,47 \pm 18,85	3956,10 \pm 34,47	11,67 \pm 1,45	6,14 \pm 2,70	3,45 \pm 0,67
28	3,16 \pm 0,01	4,62	4,83 \pm 0,06	319,53 \pm 25,85	27,39 \pm 1,00	495,61 \pm 8,51	3913,39 \pm 39,33	11,70 \pm 1,82	5,74 \pm 2,20	10,11 \pm 2,31
35	3,16 \pm 0,10	3,02	4,90 \pm 0,00	297,28 \pm 13,36	24,71 \pm 0,33	503,59 \pm 26,10	3450,45 \pm 151,40	11,45 \pm 1,50	4,75 \pm 3,08	9,23 \pm 1,77
42	3,17 \pm 0,02	2,21	5,00 \pm 0,00	299,40 \pm 3,39	22,71 \pm 9,20	455,52 \pm 42,28	1964,44 \pm 53,70	10,74 \pm 0,78	5,36 \pm 0,83	8,48 \pm 0,71

Análisis fitoquímico: contenido de fenoles totales y antocianinas totales

En la tabla 9 y figura 1A y 1B se presentan los valores obtenidos para el contenido de metabolitos secundarios fenoles y antocianinas totales durante el almacenamiento de la PAC y la PAL. Se presenta una disminución significativa del contenido de fenoles del día inicial al día 60 de almacenamiento ($p < 0,05$) para la PAC se presentó una disminución del 11,41% durante el almacenamiento, mientras que la PLA disminuyó en un 10,87% el contenido de fenoles, a su vez se observó diferencia estadísticamente significativa entre la PAC y la PAL.

El contenido de antocianinas totales, presentó una disminución significativa ($p < 0,05$) en PAC de 21,6%, y en PAL 63,3%.

TABLA 9. Contenido de fenoles, antocianinas y actividad antioxidante de PAC y PAL

Días	PULPA			LIOFILIZADO		
	Fenoles totales	Antocianinas totales	FRAP	Fenoles totales	Antocianinas totales	FRAP
1	199,67±9,30	15,60±0,68	226,21±17,99	1173,56±99,19	130,50±4,84	1603,12±118,18
15	204,91±17,19	14,94±1,03	207,28±7,58	1102,85±33,58	105,33±2,54	1120,30±23,20
30	184,59±5,89	13,71±0,39	204,67±5,07	1101,78±21,43	95,95±1,37	1115,76±34,70
45	209,07±8,17	6,19±0,38	202,56±3,32	1079,84±27,87	92,71±3,43	1023,17±15,24
60	176,88±12,60	3,37±0,20	152,92±2,49	1046,01±26,95	82,64±2,86	1023,17±15,24

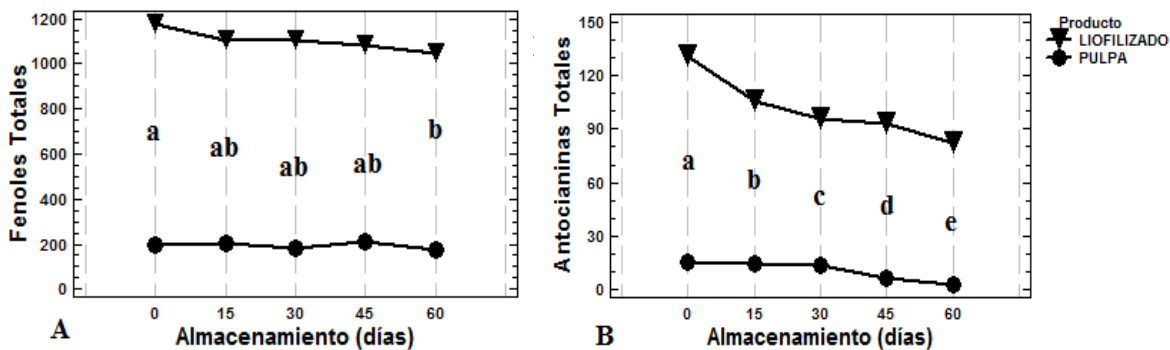


Figura 1. A. Contenido de Fenoles totales durante almacenamiento. **B.** Contenido de Antocianinas totales durante almacenamiento. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

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 presentándose un contenido en NA (55,44-16,48) y en NB (63,57-22,71) (Ver tabla 6 y 7 y figura 2. A y 2 B).

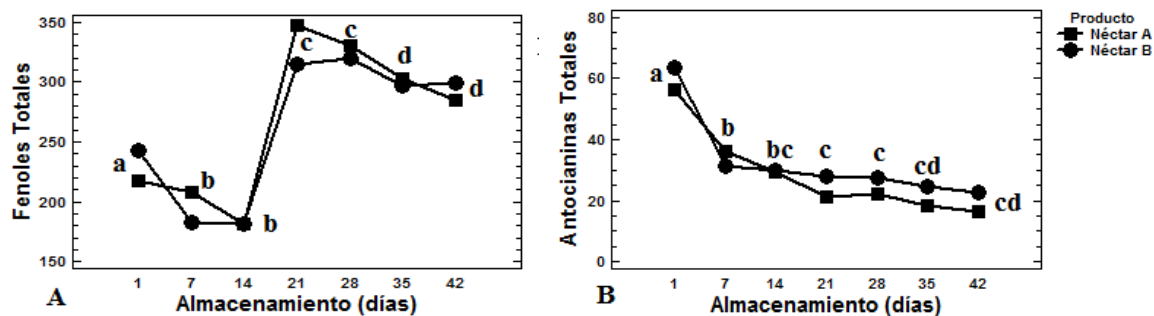


FIGURA 2. A. Contenido de Fenoles totales durante almacenamiento. **B.** Antocianinas totales durante almacenamiento. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

Propiedades antioxidantes

En la tabla 8 y figura 3. Se muestra disminución significativa ($p < 0,05$), en el valor FRAP de PAC (226,21- 152,92), presentando una disminución de 67,6% y PAL (1603,12-989,75), disminuyó 63,8% durante el almacenamiento, a su vez se observó diferencia estadísticamente significativa entre la capacidad reductora de PAC y la PAL.

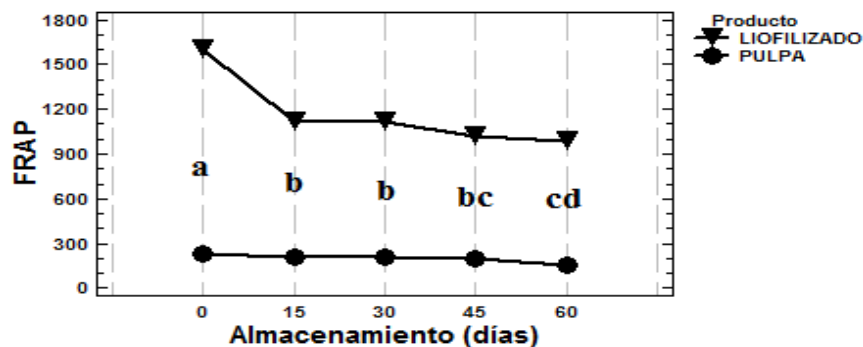


Figura 3. Valores FRAP durante los días de almacenamiento. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

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, (Ver tabla 7 y 8 y figura 4)

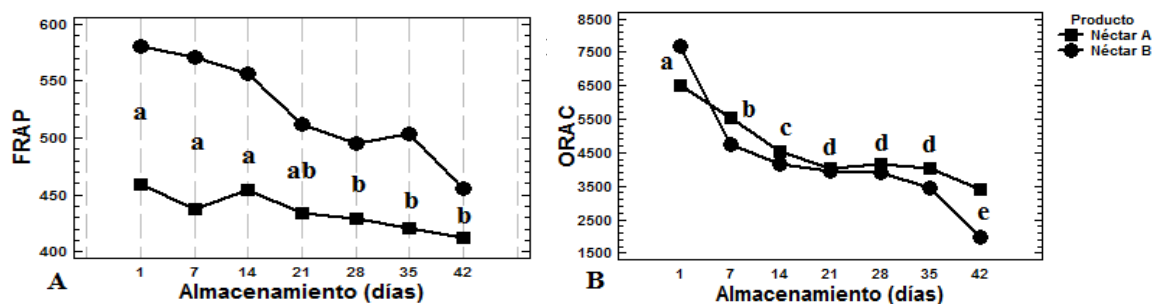


FIGURA 4. A. Valores FRAP durante los días de almacenamiento. **B.** Valores ORAC durante los días de almacenamiento. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

Medición del color

En color fue medido en NA y NB durante el tiempo de almacenamiento, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de la luminosidad (L^*) y la amarillez (b^*) durante el almacenamiento de ambos néctares, y variaciones no significativas en el enrojecimiento (a^*) (Tabla 6 y 7.). Se presentaron cambios en el color durante el proceso de almacenamiento estudiado (Figura 5.)

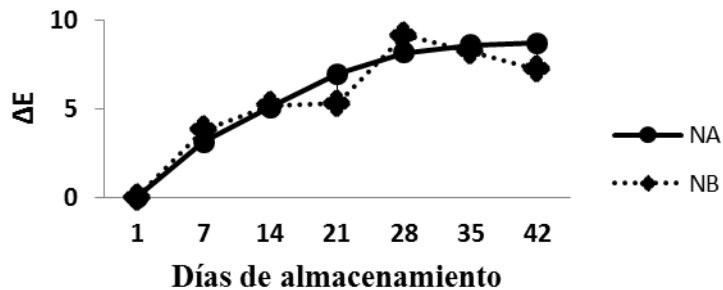


FIGURA 5. Cambio general (ΔE) del color durante el almacenamiento para cada uno de los néctares

Actividad antiproliferativa

Esta actividad fue medida en el tiempo inicial de elaboración de NA y NB. 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) (ver figura 4).

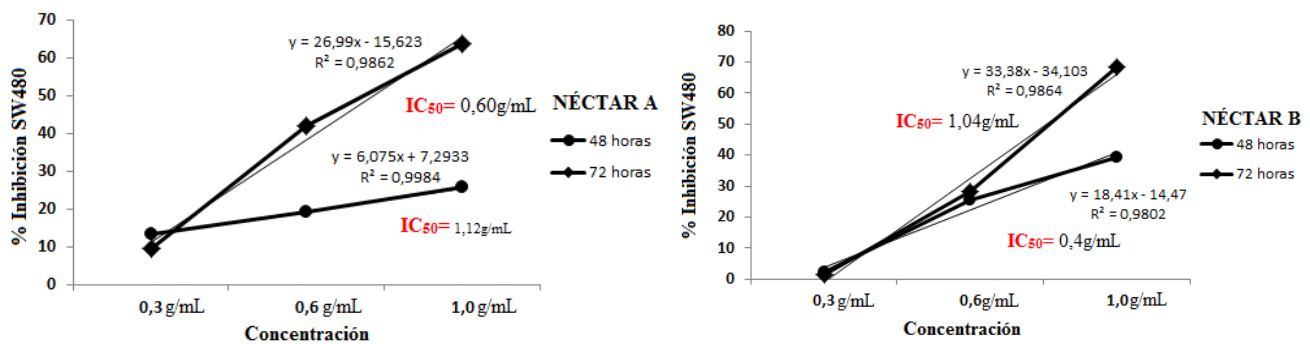


FIGURA 6. Efecto citotóxico de NA y NB sobre células de adenocarcinoma de colon SW480 durante un tiempo de exposición de 48 y 72 horas. Los datos son expresados como promedio \pm error estándar de la media (n=3)

DISCUSIÓN

Análisis microbiológicos

PAC y PAL cumplieron con los estándares microbiológicos, de acuerdo con la normativa vigente (18, 25), estos resultados evidenciaron adecuadas condiciones de procesamiento y almacenamiento para dichos productos, indicando una óptima estabilidad microbiológica.

En cuanto a NA y NB, ambos cumplen con los estándares microbiológicos hasta el día final de almacenamiento, de acuerdo con la Resolución 3929 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social (18); 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 (30).

Propiedades fisicoquímicas: acidez titulable, pH, °Brix, actividad acuosa.

Los valores de pH para la PAC y para la PAL fueron consistentes con valores reportados en estudios previos para el fruto fresco (10, 11, 31). Se observó que dicha variable fue estable durante el tiempo de almacenamiento. La diferencia significativa entre la pulpa y el liofilizado puede deberse a una diferencia en la concentración de ácidos orgánicos que se conservan bajo las condiciones de almacenamiento de la pulpa aquí utilizadas, pero que se afectan con el proceso de liofilización incrementando el valor de pH.

Los valores encontrados de pH para NA y NB son consistentes con los reportados por la literatura para productos del género *Vaccinium*, encontrando valores para jugos de 3,04. (32), El cambio en el pH es

consistente con lo reportado por otros autores durante el almacenamiento para diferentes tipos de *berries* (33).

La diferencia significativa encontrada en la acidez titulable para PAC y PAL entre el día inicial de almacenamiento y los tiempos restantes y a su vez entre productos, pudo deberse a que en PAL la pérdida de agua, provoca concentración de compuestos que puede generar la conservación y el aumento de la acidez (34). Ávila y colaboradores en el año 2007 (10), 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, 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; la segunda podría deberse a que el fruto utilizado por Ávila y colaboradores fue proveniente de Chiquinquirá, Boyacá; mientras que el fruto de este estudio proviene del municipio del Retiro, Antioquia, existiendo diferencias en la composición del fruto de acuerdo a las características edafoclimáticas del cultivo .

Con respecto a PAL, al deshidratarse, teniendo en cuenta que su composición es más del 80% de agua se concentran ácidos orgánicos que aumentan la acidez.

En los néctares preparados, la acidez titulable presentó un comportamiento de tendencia a la disminución. Los procesadores de jugos comerciales tienen diferentes requisitos con respecto a la acidez, generalmente, un bajo porcentaje de esta, es un buen indicador de prolongación de la calidad del producto durante el almacenamiento (35).

Para PAL y PAC los °Brix no mostraron una variación significativa, 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.

Para la pulpa estos valores se encuentran dentro del rango reportado también por otros autores para la misma baya (31, 36), aunque en otros estudios se mencionan valores inferiores 7,00 (11) debido a que el fruto pudo ser evaluado en menor grado de madurez y esto influye directamente en el contenido de azúcares (31).

Para los néctares elaborados a partir del agraz liofilizado, 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 (32). 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 (12) 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.

Con relación al a_w , esta propiedad se evaluó solo en PAL, 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 (37), limitando la cantidad de agua disponible para el crecimiento de microorganismos y las reacciones oxidativas, hidrolíticas y enzimáticas, alargando la vida útil del producto (38). 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 1.)

Análisis de Composición proximal

Se encontró que el contenido de humedad, grasa total, cenizas totales, carbohidratos y calorías totales fueron muy estables a través del tiempo de almacenamiento en PAC y PAL y no presentaron variaciones significativas; sin embargo si hubo cambios entre la PAC y la PAL, debido a que en este último proceso se concentran todos los sólidos. La cantidad de carbohidratos y calorías totales del fruto es baja, lo que lo hace más apreciable y benéfico para la salud.

En los néctares, 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 efecto saludable de los antioxidantes, puede verse obstaculizado, por un aumento de la cantidad de radicales libres producido durante el metabolismo del azúcar (39) por lo tanto es importante dar a conocer no solo la capacidad antioxidante de un producto, sino también su aporte calórico, 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.(40).

Aunque en el NA se observó un aporte calórico inferior al reportado por otros autores para estos mismos productos. En el NB se observó aporte de carbohidratos y calorías totales, significativamente menor, por lo que se puede considerar un producto saludable, para todas las personas incluso aquellas que producen enfermedades crónicas, tales como la obesidad (41).

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) (11); a su vez fue inferior al reportado para otras especies de *Vaccinium* como *V. floribundum* de Ecuador (882 mg GAE/100g de fruta fresca) (42); *V. Myrtillus* de Norte América (882 mg GAE/100g de fruta fresca) (14); *V. Corymbosum*, *V. ashei*, *V. angustifolium* (entre 190 y 473 mg GAE/100g de fruta fresca) (14). Aunque se observó disminución significativa de estos compuestos a través del tiempo de almacenamiento, dicha disminución fue mayor en la PAC, que en la PAL; 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. 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.

Durante el proceso de elaboración de NA y NB se observó pérdida significativa ($p < 0,05$) del contenido de fenoles totales. 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 (43) 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" que consiste en la utilización de éstos azúcares, como sustratos para la síntesis de

compuestos polifenólicos; también, puede deberse a un aumento en la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL), que se traduce en un incremento en la concentración de compuestos polifenólicos libres, junto con el bajo nivel de actividad polifenol oxidasa 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 (44, 45, 46).

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) (32); 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 (47). Savikin y colaboradores en el año 2014 (48), 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.

Aunque ambos néctares de agraz, pueden ser considerados como una buena fuente de compuestos fenólicos desde el día inicial hasta el día 42 de almacenamiento, el NB mostró mayor contenido de estos compuestos.

Las antocianinas son uno de los compuestos que se han encontrado en alto contenido en las bayas, reportando valores mayores de 100 mg C3G/100ml para *Chokeberry*, mora, grosella, arándanos y cereza dulce (42); además, se han asociado varios efectos benéficos para la salud humana y animal (32).

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 FF (16), 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 y colaboradores en el año 2010 (300±28 mg C3G/100g FF) (11) y Gaviria et al 2009 (201±10 mg C3G/100g FF) (8).

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. (14, 49).

El contenido de antocianinas, disminuyó de manera significativa en el proceso de elaboración de los néctares, observando mayor contenido de éstas en el agraz liofilizado utilizado como ingrediente para el desarrollo de dichos productos (Ver tabla 3.)

En ambos néctares se presentó disminución significativa ($p < 0,05$) de su contenido 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 (50, 51). 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 (50) 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 (52, 53). Algunos autores reportan valores de $0,18 \pm 0,03$ del contenido de antocianinas para el género *Vaccinium Myrtillus* (32). Savikin y colaboradores en el año 2014 (48), 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 el 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 para productos similares.

Propiedades antioxidantes

La inactivación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) puede darse por diferentes mecanismos, SET (*Single-Electron Transfer*) y HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) (54, 55). La actividad FRAP evalúa la capacidad antioxidante de acuerdo a su capacidad reductora siendo un mecanismo SET (12) y fue uno de los mecanismos utilizados en este estudio para analizar la capacidad antioxidante de PAC, PAL, NA y NB.

Existen reportes de valores FRAP expresados como AEAC para el género *Vaccinium* de 581 mg de ácido ascórbico por cada 100g de fruta fresca (8), 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 al valor encontrado en la PAC durante al menos 60 días de almacenamiento.

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 4 A.); 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%.

Otros estudios de la capacidad antioxidante en jugos o néctar de especies de *Vaccinium* han sido consistentes con estos resultados, demostrando una disminución significativa de la capacidad antioxidante durante el tiempo de almacenamiento (50).

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 atrapadora de radicales de oxígeno (ORAC), encontrando un valor similar al reportado previamente por Zapata et al (2014) (54) de $34825,6 \pm 819,7 \mu\text{mol Trolox}/100 \text{ g}$. Los resultados mostraron que la PAL presentó un alto contenido de fenoles totales, lo que potencia el alto valor ORAC observado, una característica ya descrita por Prior et al 1998 (14) en diferentes frutos del género *Vaccinium*. Lo anterior indica que la PAL puede ser considerada un alimento con mayor capacidad antioxidante, que la PAC analizada.

Para los néctares estudiados el tiempo inicial presentó un valor ORAC alto, (ver tabla 5 y 6), 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 (figura 2 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 (57); 2359 para jugos de mora azul (*blueberry*) y 1480 para uva y arándano (*cranberry*) (57, 58) 10460 para jugo de frambuesa negra (59).

Medición del color

El color violeta propio de los néctares de agraz, se debe principalmente al contenido de antocianinas, compuestos hidrosolubles que se encuentran en las vacuolas de las células vegetales, y que fácilmente se degradan en su forma aislada (60). Existen múltiples factores que favorecen su degradación tales como pH, generalmente mayor de 7 (61), tipo de estructura química, la temperatura, la luz, el oxígeno, el ácido ascórbico, la presencia de enzimas (peroxidasa, polifenoloxidasa y glucosidasa), iones metálicos, proteínas y otros flavonoides (62) como también el procesamiento y almacenamiento del fruto (63).

Para el agraz tanto en fruta como en néctar, el color violeta intenso, acompañado de un aroma agradable, es un indicador de calidad; sin embargo, durante el proceso de transformación de la fruta y

almacenamiento del néctar, se pueden experimentar cambios en el color debido principalmente a oxidación o pérdida de compuestos (49).

L^* es el parámetro de mayor importancia durante el periodo de almacenamiento. Cuando este disminuye, significa que el producto, empieza a oscurecerse y por lo tanto a perder su calidad organoléptica, durante el almacenamiento pudo observarse un aumento significativo ($p < 0,05$) de L^* y b^* , y no se presentaron cambios significativos en la variable a^* . Se pudo evidenciar en ambos néctares cambios en el color, durante el periodo de almacenamiento estudiado (Figura 4.), aunque no existen otros tipos de estudios específicos para analizar esta variable en productos de agraz, algunos estudios de otras *berries* como el maqui (*Aristotelia Chilensis*), han mostrado estabilidad en el comportamiento del color (64), aspecto no encontrado en este estudio, estos cambios pueden deberse a que las antocianinas se degradan en innumerables sustancias menos coloridas con tonalidades naranjas o marrones (65), también pueden deberse a la precipitación de flavanonas (66).

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 NB mostró un % de inhibición de crecimiento de células cancerígenas de 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 NA mostró un % de inhibición de crecimiento de células cancerígenas de 25,66% a las 48 horas de exposición y 63,50% a las 72 horas. 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). Esto demuestra que el néctar A, a las 72 horas presenta mejor actividad antiproliferativa que el NB.

Los resultados de este estudio, son consistentes con otros resultados previos de acción biológica “*in vitro*” de extractos y jugos (16, 32, 67, 68).

Se pudo observar estabilidad en las características fisicoquímicas °Brix y pH en ambos néctares durante el proceso de almacenamiento y cambios en el color y 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, 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.

CONCLUSIONES

El tiempo de almacenamiento de 60 días para PAC y PAL mostró estabilidad de estos productos en pH, °Brix, a_w (PAL), %humedad, grasa, cenizas, carbohidratos y calorías totales, a su vez se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la actividad antioxidante, la acidez titulable y la proteína durante el tiempo, entre la PAC y la PAL.

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 PAC. Esta información indica que el proceso de liofilizado del agraz es una opción para mantener características composicionales, fisicoquímicas y microbiológicas estables y conservar el contenido de fitoquímicos del fruto a través del tiempo, para su 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.

En los néctares elaborados 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 se alteró significativamente los variables ° Brix, pH y color. 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 cuyo consumo debe 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*”. Se requieren estudios adicionales de su actividad biológica y antioxidante para beneficio humano, demostrando su potencial funcional descrito hasta ahora “*in vitro*”.

PRODUCCIÓN ACADÉMICA

Artículos científicos

Franco Tobón YN, Rojano BA, Alzate Arbeláez AF, Restrepo Flórez CE, Rivero Barrios DM, Maldonado Celis ME*. Cambios en la estabilidad oxidativa y microbiológica para pulpa congelada y liofilizada del fruto de agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*). Sometido a la Revista Vitae de la

Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Antioquia en el mes de abril de 2016, a espera de aprobación.

Franco Tobón YN, Rojano BA, Alzate Arbeláez AF, Maldonado Celis ME*. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, antioxidantes y antiproliferativa de néctar de agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*). Sometido a la revista Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN), en el mes de mayo de 2016, a espera de aprobación.

Presentaciones en Congreso Nacional e Internacional

Franco Tobón YN, Rojano BA, Alzate Arbeláez AF, Maldonado Celis ME*. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de néctar de agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*). V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales CIPNat 2016, el XIII Congreso Colombiano de Fitoquímica y el VIII Congreso Colombiano de Cromatografía COCOCRO. Abril de 2016, presentación en póster.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Contreras Calderón J, Calderón Jaimes Lilia, Guerra Hernández Eduardo, García Villanova Belén. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International* 44; 2011. Pág 2047 -2053.
2. Crowe KM, Murray, E. Deconstructing a fruit serving: comparing the antioxidant density of select whole fruit and 100% fruit juices. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113(10), 2013. Pág. 1354 - 1358.
3. Lima IFP, De Dea Lindner J, Soccol VT, Parada JL, Soccol CR. Development of an Innovative Nutraceutical Fermented Beverage from Herbal Mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) Extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 2012. Pág. 788 - 800.
4. Zucca P, Sanjust E, Trogu E, Sollai F, Rescigno A. Evaluation of antioxidant capacity of antioxidant-declared beverages marketed in Italy, 22, 2010. Pág. 313 - 320.
5. Shipp J. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients, 2010. Pág. 7–22.
6. Blasa, M; Gennari, L; Angelino, D; Ninfali, P. Health. Bioactive Foods in Promoting Health (First Edit., (2014). Pág. 37- 58.
7. Luteyn J. Neotropical blueberries: The plant family Ericaceae. (Sitio en internet) Disponible en: <http://www.nybg.org/bsci/res/lut2>. New York Botanical Garden (Jardín Botánico de New York). 2006. Consultado en noviembre de 2014.
8. Gaviria *et al.* Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). En: Gustavo Adolfo Ligarreto M. Editor. *Perspectivas del Cultivo de Agraz o Mortiño Vaccinium meridionale Swartz, en la zona altoandina de Colombia*, Primera edición, Universidad Nacional de Colombia; 2009. Pág. 93 – 109

9. Mosquera AJ, Tamayo A, Rojano BA, Gaviria C, Medina C, Ochoa C, Ligarreto G, Montoya I, Muñoz J, Toro J, Martínez L, Patiño MP, Lobo M, Sánchez N, Delgado O, Galeano P, Lopera S, Magnitskiy SV, Torres W, Lopera E. Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale Swartz*) en la zona altoandina de Colombia, Primera Ed. Bogotá: Gente Nueva Editorial.2009.
10. Ávila-Rodríguez HG, Cuspoca-Riveros JA, Fischer G, Ligarreto-Moreno GA, Quicazan-De Cuenca MC. Caracterización fisicoquímica y organoléptica del fruto agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*) almacenado entre 1 y 2 °C. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.Vol.60, N°2. 2007. Pág. 4179 - 4193.
11. 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 Chemistry 122, (2010). Pág. 980 - 986.
12. 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 65(1). (2012). Pág. 6487 - 6495.
13. Rincón-Soledad MC, Buitrago-Guacaneme M, Ligarreto-Moreno GA, Torres-Aponte WS, Balaguera-López HE. Comportamiento del fruto agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*) cosechado en diferentes estados de madurez y almacenado en refrigeración. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.Vol.65, N°2. (2012). Pág. 6615 - 6625.
14. Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, Brien C, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G, Mainland CM. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 1998. Pág. 2686 - 2693.

15. Vrhovsek, U; Masuero, D; Palmieri, L; Mattivi, F. Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 25, 2012. Pág. 9 – 16.
16. 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.
17. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 2674 de 2013, por la cual se reglamenta el artículo 126 del Decreto-ley 019 de 2012 y se dictan otras disposiciones.
18. 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.
19. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. Norma técnica Colombiana 4624 por la cual se establece método refractométrico para la determinación de sólidos solubles en jugos de frutas y hortalizas y en productos derivados. 1999, ICONTEC: Bogotá DC
20. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. Norma técnica Colombiana 440 por la cual se establecen los métodos de ensayo para determinar las características físicas y químicas de los productos alimenticios. 2015, ICONTEC: Bogotá DC
21. Giusti M, Rodríguez E, Wrolstad. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 47(11). (1999). Pág. 4631 - 4637.
22. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1965; 16(3): 144-158.

23. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996; 239(1): 70 - 76.
24. Ou BM, Hampsch-Woodill, Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49(10): 4619-462.
25. 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. Técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénico. 2007, ICONTEC: Bogotá DC
26. 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 Molecules*, 5. 2009. Pág. 21 - 30.
27. Chung C, Rojanasasithara T, Mutilangi W, McClement DJ. Enhancement of colour stability of anthocyanins in model beverages by gum arabic addition. *Food Chemistry* 201 (2016) 14–22.
28. Yam KI, Papadakis SE. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *J Food Eng*, 61. 2004. Pág. 137-142.
29. HunterLab. Hunter Lab Color Scale. *Insight on Color* 8 9 (August 1–15, 1996). Hunter Associates Laboratories. Reston, VA, USA, (1996).
30. 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.
31. 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.

32. 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 Chemistry* 125. 2011. Pág. 1412 – 1417.
33. 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.
34. 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.
35. Kushman LJ, Ballingen WE. Acid and sugar changes during ripening in Wolcott blueberries. *Proceeding of American Society of Horticulture Sciences*, 92. 1969. Pág. 290 - 295.
36. Safner RJ, Polashock M, Ehlenfeldt, Vinyard B. Instrumental and sensory quality characteristics of blueberry fruit from twelve cultivars. *Postharvest Biology and Technology*. 2008; 49(1): 19 - 26.
37. Martinez N, Andrés A, Chiralt A, Fito P. Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno. Servicio de publicaciones.1998.
38. Ayala A, Serna L, Mosquera E. Liofilización de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*). *Vitae, Revista de la facultad farmacéutica*, 2010; 17(2): 121 - 127.
39. Finley JW, Kong AN, Hintze KJ, Jeffery EH, Ji LL, Lei XG. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *J Agric Food Chem* 59. (2011). Pág. 6837 – 6846.
40. 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)
41. Allison DB, Mattes RD. Nutritively sweetened beverage consumption and obesity: the need for solid evidence on a fluid issue. *J Am Med Assoc* 301, 2009. Pág. 318 - 320.)

42. Vasco C, Riihinen K, Ruales J, Kamal-Eldin A. Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57: 8274–8281
43. 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.
44. Piljac Zegarac J, Samec D. Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures. *Food Research International* 44, 2011. Pág. 345 - 350.
45. Ginzberg I, Tokuhisa JG, Veilleux RE. Potato steroidal glycoalkaloids: Biosynthesis and genetic manipulation. *Potato Research.*: 52 (1), 2009. Pág. 1- 15.
46. Kalt W, Forney CF, Martin A, Prior RL. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1999. Pág. 4638 - 4644.
47. Medina M. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *Journal of Functional Foods* 3. 2011. Pág 79 - 87
48. Savikin K, Zdunić G, Janković T, Godevac D, Stanojković T, Pljevljakusić D. Berry fruit teas: Phenolic composition and cytotoxic activity. *Food Research International* 62. 2014. Pág. 677 - 683.
49. Patras A, Bruntonn 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. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2009; 10 (3): 308-313
50. 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. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33, 2013. Pág. 111 - 116.

- 51.** Pinelo M, Manzocco L, Nuñez MJ, Nicoli MC. Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 2004. Pág 1177 - 1180.
- 52.** Kalt, W; McDonald, JE; Donner, H. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of processed Lowbush blueberry products. *Journal of Food Science* 65, 2000. Pág. 390 - 393.
- 53.** Van Boekel, *et al.* A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(9), 2010. Pág. 1215 - 1247.
- 54.** Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(10): 4290-4302.
- 55.** 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. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(9): 3637-3642.
- 56.** Zapata S, Piedrahita AM, Rojano B. Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Rev. Perspectivas en Nutrición Humana* ISSN 0124-4108 Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de Antioquia. Medellin. 2014; 16(1): 25-36.
- 57.** 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.
- 58.** Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.*, 51. 2003. Pág. 3273 - 3279.

- 59.** 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.
- 60.** Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal* 14, 217– 225.
- 61.** Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández ML, Paéz-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry* 113, 2009. Pág. 859 - 871.
- 62.** Pappas E. Schaich KM. Phytochemicals of Cranberries and Cranberry products: Characterization, Potencial Health Effects, and Precessing Stability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49:9. 2009. Pág. 741-781
- 63.** Schwartz SJ, Von Elbe JH, Giusti M. Colorants. In: Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R. (Eds.), *Fennema's Food Chemistry*. 4th ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 2008. Pág. 571 - 638.
- 64.** Gironés Vilaplana A, Mena P, García Viguera C, Moreno D. A novel beverage rich in antioxidant phenolics: Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 2012. Pág. 279 - 286.
- 65.** Strik B, *et al.* Berry fruit: valueadded products for health promotion. 1 ed. Boca Raton (E.E.U.U.): CRC Press, Taylor & Francis Group, 2007. Pág. 444.
- 66.** Gil Izquierdo A, Riquelme MT, Porras I, Ferreres F. Effect of the rootstock and interstock grafted in lemon tree (*Citrus limon* (L.) Burm.) on the flavonoid content of lemon juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2). 2004. Pág. 324 – 331.
- 67.** Seeram, N,P et al. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2006. Pág. 9329 - 9339.

68. Olsson ME, Gustavsson KE, Andersson S, Nilsson A, Duan RD. Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2004. Pág. 7264 - 7271.