

Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz) en la zona altoandina de Colombia



© © Gustavo Adolfo Ligarreto M. © © Editor



Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz)



Coloración de los frutos de agraz o mortiño durante la maduración en una rama productiva, Alto de Daza, Pasto, Nariño.

Carlos Andrés Gaviria¹
Clara Inés Ochoa¹
Nelly Yolima Sánchez¹
Clara Inés Medina²
Mario Lobo²
Paula Liliana Galeano¹
Ana Juleza Mosquera¹
Angélica Tamayo¹
Yazmín Eliana Lopera¹
Benjamín Alberto Rojano^{1*}

Resumen

El agraz o mortiño se puede considerar como una fruta rica en compuestos polifenólicos que tienen la propiedad de ser colorantes y antioxidantes y que además son estructuras protectoras de la salud. En este trabajo se determinó el contenido de antocianinas y fenoles con valores de 201 ± 10 mg eq/100 g de fruta y 609 ± 39 mg eq/100 g de fruta respectivamente; la actividad antioxidante se estudió por las metodologías DPPH ($2\ 404 \pm 120$ valores de TEAC), ABTS ($8\ 694 \pm 435$ valores de TEAC) y FRAP (581 ± 29 valores de AEAC), todos estos resultados son comparables o superiores a los *Vaccinium* reportados en otras investigaciones. Además, se estudiaron los efectos de los extractos antocianínicos del agraz o mortiño sobre la peroxidación lipídica de aceite de maíz, analizando la evolución de dienos conjugados, el valor de peróxidos y la formación de sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico, como indicadores de la oxidación, expresados como el inverso de la tasa de deterioro (Φ) con valores de $0,0003 \pm 0,00000889119$, $0,0008 \pm 0,0000610995$ y $0,0004 \pm 0,0001$, respectivamente.

Palabras clave:

Compuestos polifenólicos, antocianinas.

¹ Investigadores del Laboratorio de Ciencia de Alimentos. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. <carloandres.gaviria@gmail.com>, <claraochoa99@gmail.com>, <nysanchez@gmail.com>, <pauyltasan@gmail.com>, <ajmosque@gmail.com>, <atamayo516@gmail.com>, <yaslope@gmail.com>

² Investigadores del C.I. "La Selva", Corpoica, Rionegro, Antioquia. <clara.medina@gmail.com>, <pnrgvlobo@gmail.com>

^{1*} Ingeniero Químico, Dr.Sc. Profesor Asociado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. brojano@gmail.com



Abstract

Antioxidant properties of Colombian blueberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) fruits

Colombian blueberry is considered a crop with fruits rich in polyphenolic compounds that have colorant and antioxidant properties; additionally these compounds are health protectors. In this study, phenol and anthocyanin contents were determined having values of 201 ± 10 mg eq/100 g fruit fresh weight and 609 ± 39 mg eq/100 g fruit fresh weight, respectively. Antioxidant activity was studied using the methods DPPH ($2\ 404 \pm 120$ TEAC values), ABTS ($8\ 694 \pm 435$ TEAC values) and FRAP (581 ± 29 AEAC values), and all values were comparable to or higher than those reported for *Vaccinium* in other studies. The effects of anthocyanic extracts of Colombian blueberry were also studied over the lipid peroxidation of corn oil, analyzing the evolution of conjugated diene (CD), value of peroxides (PV) and formation of reactive substances with 2-thiobarbituric acid as indicators of oxidation that were expressed as inverted of the oxidation rate (Φ) with values of 0.0003 ± 0.00000889119 , 0.0008 ± 0.0000610995 and 0.0004 ± 0.0001 , respectively.

Key words:

Polyphenolic compounds, anthocyanins.

●○ Introducción

En los seres vivos aerobios se generan continuamente radicales libres y especies reactivas de oxígeno tales como el anión superóxido, el radical hidróxilo y oxígeno singlete, derivados de procesos fisiológicos normales, como la fosforilación oxidativa y de la exposición diaria a la radiación ionizante, la contaminación atmosférica y el humo del cigarrillo, entre otros (Halliwell, 2000). Los radicales libres son especies muy reactivas que pueden dañar biomoléculas como carbohidratos, proteínas, lípidos y ADN, y por consiguiente, afectar la membrana plasmática y orgánulos como la mitocondria y el núcleo celular (Choksi *et al.*, 2004). La célula se protege de los radicales libres mediante la acción de sistemas enzimáticos antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la lactoferrina, la catalasa y la glutatión peroxidasa y de sistemas no enzimáticos donde se incluyen antioxidantes como las vitaminas E y C, flavonoides y carotenoides provenientes de la dieta (Yilmaz *et al.*, 2003; Szeto, 2002). Sin embargo, cuando los radicales libres producidos en el organismo sobrepasan la capacidad de la célula para protegerse o repararse por sí misma,



conducen al estrés oxidativo, el cual está asociado a enfermedades degenerativas o crónicas como el cáncer, la arterioesclerosis, la artritis reumatoidea, el mal de Parkinson, la diabetes mellitus, el envejecimiento y la infertilidad masculina (Mark y McCalland, 1999 y Fuchs, 1998).

La acción oxidativa causada por los radicales libres puede ser neutralizada mediante el uso de antioxidantes naturales o sintéticos. Los antioxidantes son sustancias que disminuyen o retardan las reacciones de oxidación sobre diferentes sustratos. El butilhidroxianisol (BHA), y el butilhidroxitolueno (BHT) son los antioxidantes sintéticos de mayor uso en la industria farmacéutica y de alimentos; sin embargo, se han encontrado efectos secundarios en humanos, como el aumento del colesterol, hepatomegalia e inducción de cáncer hepático, entre otras (Fuchs, 1998; Bush y Taylor, 1998, y Ito, 1983). Debido a estos efectos y a la creciente importancia de los antioxidantes en la industria farmacéutica y alimenticia es necesaria la búsqueda de moléculas alternativas de origen natural con gran actividad y que no tengan efectos citotóxicos ni genotóxicos (López *et al.*, 2008).

Los productos vegetales, son entonces una alternativa, ya que poseen una variedad de compuestos químicos como mono y polifenoles, antocianos, flavonoides, carotenoides y ácido ascórbico, entre otros, que pueden ser inocuos para la salud y que actúan como agentes antioxidantes a bajas concentraciones. Muchos antioxidantes son usados en la industria de alimentos por su capacidad conservadora; además, retardan el desarrollo del olor rancio, disminuyen la posibilidad de generación de compuestos tóxicos, evitan la decoloración de los pigmentos, no permiten los cambios en la textura, disminuyen la pérdida de valor nutricional causada por la degradación de los ácidos grasos esenciales y por la destrucción de las vitaminas A, E y D (Bush y Taylor, 1998, Rojano *et al.*, 2008a), y muchos de estos compuestos o sus fuentes naturales se consideran como nutraceuticos.

Los alimentos nutraceuticos contienen sustancias o agentes bioactivos de efectos farmacológicos sobre la salud científicamente comprobados, y pueden ser presentados en otra forma distinta a la del alimento. Los nutraceuticos pueden definirse como alimentos que deben ser consumidos bajo la supervisión médica y para tratamientos específicos de enfermedades con requerimientos nutricionales particulares. Por ejemplo, los productos marinos de cartilago de tiburón se recetan para enfermedades articulares. Los extractos de Ginko biloba ayudan a la circulación sanguínea y reducen el riesgo del mal



de Alzheimer. La hierba de San Juan ayuda a la recuperación de los pacientes con depresiones moderadas y los extractos de Ginseng y Guaraná reducen fatiga y estrés. La valeriana promueve el sueño. Las isoflavonas de la soya son fitoestrógenos ideales para la prevención de osteoporosis. Los ácidos grasos omega 3 reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares; en Estados Unidos y en Europa se ha incrementado el consumo de los alimentos sanos, naturales y con un mínimo procesamiento; en contraposición a los platos preparados listos para cocinar, pero con alguna pérdida del valor nutritivo (Rojano *et al.*, 2008b).

Las industrias farmacéuticas y de alimentos consideran que el crecimiento del mercado de los antioxidantes requiere de la educación apropiada del consumidor y de investigaciones científicas en el área. Los estudios deben estar dirigidos a la búsqueda de compuestos puros o extractos activos como nuevas fuentes de antioxidantes; y a su vez, deben focalizarse hacia los beneficios que producen los antioxidantes en la salud de modo preventivo (Rojano *et al.*, 2008b y Cornelli, 2009).

El género *Vaccinium* (ericaceae) tiene cerca de 400 especies y los frutos han atraído el interés de muchos investigadores alrededor del mundo, debido al alto contenido de compuestos polifenólicos, tales como ácido cinámico, flavonoles, antocianinas y antocianidinas (Parr y Bolwell, 2008; Kahkonen *et al.*, 2001 y Prior *et al.*, 1998).

La actividad antioxidante de las bayas del género *Vaccinium*, en especies cultivadas comercialmente como arándano (blueberry) y arándano rojo (lingonberry), así como de otras especies que son recolectadas de los bosques, se ha encontrado que es altamente influenciada por el contenido de antocianinas y fenoles totales, los genotipos, la variación en las condiciones ambientales, el estado de madurez de las frutas y de las condiciones de almacenamiento en poscosecha (Beccaro *et al.*, 2006; Çelik *et al.*, 2008; Conner *et al.*, 2002, y Kalt *et al.*, 1999).

Teniendo en cuenta el creciente interés en las propiedades nutraceuticas de los frutos del genero *Vaccinium* y la gran demanda de aditivos naturales en los mercados internacionales, en este trabajo se estudian las propiedades antioxidantes del agraz o mortiño (*V. meridionale* Swartz), y se determina el contenido de compuestos polifenólicos como una forma de iniciar el proceso de selección de germoplasma, para la selección de poblaciones con viabilidad



para ser domesticadas. Además, se evalúan los efectos de los extractos antociánicos sobre la conservación a la peroxidación lipídica de aceite de maíz; analizando la evolución de dienos conjugados, valor de peróxidos y la determinación del contenido de sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico como indicadores de la oxidación.

◎ ○ Material vegetal

Los frutos evaluados fueron obtenidos de la colección de germoplasma de *Vaccinium*, ubicada en el Centro de Investigaciones “La Selva” de Corpoica, localizado en el municipio de Rionegro, Antioquia, a 2 120 msnm, temperatura promedio de 17 °C y una humedad relativa media del 78%. El lugar experimental pertenece a la zona de vida bosque húmedo montano bajo (bh-MB) y está ubicado a 06° 08′ 06″ de latitud norte y 75° 25′ 03″ de longitud oeste.

◎ ○ Reactivos

El radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil), fosfato ácido de sodio, MeOH, ácido acético, tricloruro de hierro, 2,4,6-tri (2-piridil) triazina (TPTZ) fueron comprados a Aldrich Chem. Co (Millw WI); los 2,2-Azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), ácido tiobarbitúrico (TBA), Butilhidroxitolueno (BHT), 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO); los ciclohexano, ácido clorhídrico, n-hexano, 2-propanol, 1-butanol, sulfato de hierro, cloruro de bario, tiosulfato de amonio y sulfato de bario fueron obtenidos de Merck (Alemania). El agua usada en los experimentos fue de grado HPLC.

◎ ○ Preparación de extractos para medir la actividad antioxidante

Los extractos se obtuvieron de la siguiente forma: 20 g de cada una de las muestras fueron homogenizadas, usando como solvente de extracción metanol-HCl 1% en una relación (6:1 p/v). Este procedimiento se repitió hasta agotar la muestra. Los extractos fueron filtrados en papel Whatman 4 y concentrados en un rotaevaporador a 40 °C. Los extractos se almacenaron a -20 °C durante el periodo de estudio.



⊙⊙ Preparación de las muestras para la peroxidación lipídica

A 50 g de aceite de maíz se adiciona el extracto antociánico mezclado con el agente emulsificante NP₁₀, hasta obtener concentraciones finales de 250, 500 y 750 $\mu\text{g/ml}$. Como patrón se utilizó BHT a una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ y como blanco testigo se preparó una muestra de aceite sin antioxidantes. Se almacenaron en recipientes de vidrio a una temperatura de 30 °C por 10 días. Los productos de oxidación se midieron por los métodos dienos conjugados (DC), valor de peróxido (PV) y sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS).

⊙⊙ Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del DPPH

Se empleó el método de Brand-Williams, Cuvelier y Berset (1995) con algunas modificaciones (Rojano *et al.*, 2008c). Se evaluó la capacidad de las muestras para atrapar el radical DPPH, por medio de la disminución en la absorbancia leída, luego de 30 min de reacción a una longitud de onda de 517 nm. Para cada muestra estudiada se calculó el porcentaje de inhibición del radical y los resultados se expresaron como valores TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*) mediante la construcción de una curva patrón usando como antioxidante Trolox® (Gelareh *et al.*, 2009).

⊙⊙ Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical catiónico ABTS⁺

El radical se genera por una reacción de oxidación del ABTS con persulfato de potasio. Se evaluó la capacidad de las muestras para atrapar el radical ABTS, por medio de la disminución en la absorbancia leída, luego de 30 min de reacción, a una longitud de onda de 732 nm (Re *et al.*, 1999). Los resultados se expresaron como valores TEAC mediante la construcción de una curva patrón usando como antioxidante Trolox® (Arts *et al.*, 2004).



⊙⊙ Evaluación de la capacidad reductora FRAP

Este método se evaluó según la metodología de Benzie y Strain (1996). Para ello se utilizaron 900 μl de una solución de TPTZ, 50 μl de muestra y 50 μl de agua destilada. Luego de 7 min se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm. Se construyó la curva de referencia usando ácido ascórbico. Las actividades de las muestras se expresaron como AEAC (*ascorbic acid equivalent antioxidant capacity*: mg de ácido ascórbico/100 g de fruta fresca).

⊙⊙ Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles se realizó por el método colorimétrico de folin-ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Se construyó una curva patrón usando como estándar ácido gálico. Se diluyó el extracto a una concentración en la cual el contenido de fenoles se encontró dentro del intervalo de la curva patrón. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/100 g de fruta fresca. Las lecturas se realizaron a 760 nm.

⊙⊙ Determinación de antocianinas totales

Las antocianinas totales se determinaron mediante el método diferencial de pH (Gaviria *et al.*, 2007). Las absorbancias son medidas a 530 nm y 700 nm en *buffers* de pH 1,0 y 4,5; usando la expresión $A = [(A_{530} - A_{700})_{\text{pH}1,0} - (A_{530} - A_{700})_{\text{pH}4,5}]$, y el cianidin-3-glucósido con un coeficiente de extinción molar de 26 900. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de cianidin-3-glucósido por 100 g de fruta fresca.

⊙⊙ Determinación de dienos conjugados (DC)

El contenido de DC se determinó por el procedimiento descrito por Siriwardhanan y Jeon (2004), con algunas modificaciones: 10 μl de muestra se mezclan con 2 990 μl de ciclohexano y se agita en un vortex por 10 s, luego se toman 500 μl de la mezcla y se le adicionan 1 500 μl de ciclohexano. La absorbancia de la solución se mide a 234 nm. Los resultados se expresaron como valores de dienos conjugados (DC).



⊙⊙ **Determinación del valor de peróxidos (PV)**

El valor de peróxidos se determinó mediante el método descrito por Shanta y Decaer (1994), con algunas modificaciones realizadas por Rojano *et al.* (2008). Este método se fundamenta en la capacidad de los peróxidos lipídicos de oxidar el Fe^{2+} hasta Fe^{3+} . A 300 μ l de muestra, se adicionan 20 ml de hexano-2-propanol (3:2) y se agita por 10 segundos, luego se toma 1,5 ml de la mezcla y se adiciona 2,8 ml de una solución de metanol-1-butanol (2:1). De esta mezcla se toman 100 μ l y se adiciona 900 μ l de la solución estándar, preparada mediante la adición de NH_4SCN 0,44 M al sobrenadante formado por la mezcla $FeSO_4$ 0,144 M y $BaCl_2$ en HCl 0,4 M, se agita y se incuba por un periodo de 20 minutos en la oscuridad. Se lee la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm. Los resultados se expresaron como meq de peróxido/kg de muestra, mediante el uso de una curva estándar construida usando peróxido de cumeno como patrón.

⊙⊙ **Determinación del contenido de sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)**

La determinación del contenido de sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) se realizó mediante el procedimiento de Guzmán-Chozas *et al.* (1997), con algunas modificaciones realizadas por Rojano *et al.* (2008a). En un tubo de ensayo se colocan 5 ml del reactivo de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico 0,7% en ácido acético glacial al 99,9%), y 0,4 g de muestra y se agita por 10 segundos y son llevados a un baño de agua a 90° C por 1 hora. Los tubos son enfriados en agua, se centrifugan a 5 000 rpm por 20 min y se elimina el sobrenadante. Una porción de la muestra se lleva a una cubeta de vidrio y su absorbancia es leída a 532 nm. Los resultados se expresan como mg de malonaldehído/kg de muestra usando una curva estándar. La curva estándar fue construida realizando diluciones apropiadas de una solución acuosa de 1,1,3,3 tetraetoxipropano $1,0 \times 10^{-3}$ M. Estas soluciones fueron tratadas con el reactivo de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico 0,02 M en ácido acético glacial al 90%) y la absorbancia fue medida a 532 nm.

Todos los experimentos se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Jenway 6405. Las regresiones fueron calculadas con un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$), usando el programa Statgraphics Plus, versión 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD).



◎◎ Características de los frutos y actividad antioxidante

Los frutos del *Vaccinium meridionale* Swartz en estado de madurez presentan un alto contenido de sólidos totales medidos en grados brix entre 12,6 y 15,2, pH bajo, entre 2,2 y 2,7 y un contenido de humedad del 77-83%. La coloración de la piel de los frutos varía entre azul a rojo o azul intenso. Las antocianinas, compuestos fenólicos pertenecientes a la familia de los flavonoides, son las responsables de su coloración; éstas se encuentran principalmente en su piel (Prior, *et al.*, 1998).

Existen algunos reportes donde se señala la relación directa entre el contenido de antocianinas totales y el área/peso de los frutos del género *Vaccinium*, debido a que la mayor cantidad de antocianatos se ubican en la piel; sin embargo, algunas variedades como el arándano (bilberry) presentan una distribución abundante de antocianatos en todo el cuerpo del fruto. Otra variable que puede afectar el contenido de antocianinas es el grado de madurez del fruto (Prior, *et al.*, 1998; Guzmán-Chozas *et al.*, 1997, y Capocasa *et al.*, 2008).

El contenido de antocianinas totales expresados como mg eq de cianidin-3-glicosido/100 g de fruta fresca (tabla 1), encontradas en los frutos del agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz), es alto (201 ± 10), comparado con los reportados para los frutos de otras especies. Prior *et al.* (1998) encontró que el contenido de antocianinas totales valores de 92-235 para el Northern Highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*), 60-187 para el Rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) y 290-300 para Lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*); Wang y Ballington (2007) encontraron para el deerberry (*Vaccinium stamineum* L) un contenido de 371-630 (Prior, *et al.*, 1998; Guzmán-Chozas *et al.*, 1997, y Shiow *et al.*, 2007).

En los frutos del agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz), el contenido de fenoles totales (mg eq de ácido gálico/100 g de fruta fresca) y de las antocianinas totales es bastante alto, comparado con los frutos de otros *Vaccinium* e incluso de otras especies. El mortiño presenta un contenido de fenoles totales de 609 ± 39 , comparable con el presentado por el Northern Highbush blueberry, Rabbiteye blueberry, Lowbush blueberry, los cuales son de 181-473, 230-457, 290-495 respectivamente y 151-246 para la uva (*Vitis vinifera* L.) (Halliwell, 2000; Bush y Taylor, 1998; Prior, *et al.*, 1998; Guzmán-Chozas *et al.*, 1997, y Shiow *et al.*, 2007).



Tabla 1 Contenido de antocianinas, fenoles totales, porcentaje de sólidos extraíbles y actividad antioxidante					
Antocianinas totales*	±	Fenoles totales**	±	% de extracto*	±
200,6	10,2	609	31	13,26%	0,34%
* mg eq de cianidin-3-glicósido/100 g de fruta fresca; **mg eq ácido gálico/100 g de fruta fresca; + base húmeda					
TEAC - DPPH *	±	TEAC - ABTS*	±	FRAP**	±
2 404	120	8 694	435	581	29
* μ M de Trolox®/100 g de fruta fresca; ** mg de ac. Asc/100 g de fruta fresca					

Los métodos DPPH y ABTS evalúan la capacidad de los extractos de mortiño para atrapar radicales libres en medios orgánicos y acuosos, respectivamente. La actividad antioxidante del mortiño, expresada por la metodología del radical DPPH, fue significativa; sin embargo, en comparación con la expresada con el radical ABTS, es mucho menor. Esto no es extraño debido a que la fracción evaluada del fruto es un extracto metanólico acidificado, con una alta concentración de compuestos polares que presentan un mejor comportamiento en medios acuosos, donde se realiza el ensayo con el radical ABTS.

Los frutos del género *Vaccinium* se caracterizan por poseer una gran cantidad de diferentes compuestos con actividad antioxidante (Netzel *et al.*, 2006). La actividad antioxidante evaluada con el radical DPPH• de los frutos *Vaccinium meridionale* Swartz, presenta un valor de 2 404 TEAC, ligeramente mayores a los reportados para arándanos (1 035) y menores que los encontrados en moras andinas (4 100 TEAC) (Netzel *et al.*, 2006; Vasco, 2008).

La actividad antioxidante evaluada con el radical ABTS⁺• de los frutos del agraz presenta un valor de 8 694 TEAC; mucho mayor que los reportados para blueberry (*Vaccinium* spp. cv. Biloxi) 3 945 TEAC, Rabbiteye (*Vaccinium ashei*) 1 973-3 829 TEAC, Southern highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L. Hybrids) 811-2 645 TEAC y blackberries (*Rubus* L.) con un valor de 1 804-2 650 TEAC (Netzel, *et al.*, 2007; Sellappan *et al.*, 2002).



Son pocos los reportes sobre el valor FRAP expresado como AEAC para el género *Vaccinium*; sin embargo, los extractos de mortiño con un valor de 581 mg de ácido ascórbico por cada 100 g de fruta fresca son mejores reductores que la mayoría de las frutas reportadas, excepto la curuba y la mora (Botero *et al.*, 2007).

◎○ Peroxidación lipídica de aceite de maíz

En los alimentos con alto contenido de lípidos la etapa más importante de la peroxidación es la formación y descomposición de los hidroperóxidos, que generan una serie de compuestos oxidados como cetonas, aldehídos, alcanos y alquenos de bajo peso molecular y de alta volatilidad, que determinan el valor sensorial del alimento; proceso denominado rancidez oxidativa. Los antioxidantes pueden retardar la rancidez, pero nunca la detienen, porque la oxidación ocurre a bajas presiones de oxígeno y se hace inevitable, a pesar del uso de todas las metodologías de conservación, como frío, escaldado y empaque (Rodríguez *et al.*, 2007, y Aubourg, 2004).

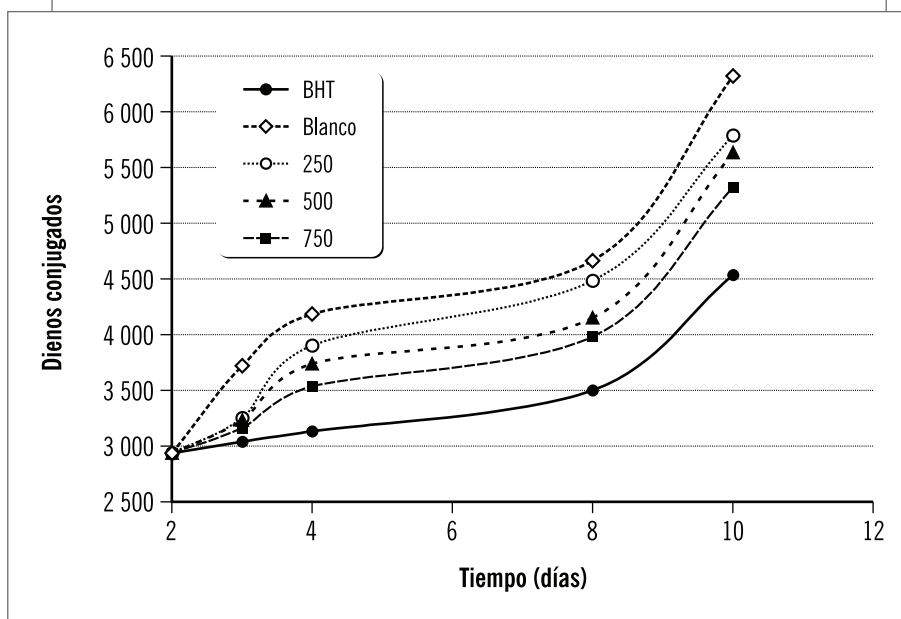
Las muestras de aceite de maíz se monitorearon por un periodo de 10 días midiendo los niveles de DC, PV expresado como meq de peróxido/kg de muestra (meq/kg) y TBARS expresados como miligramos de malonaldehído/kg de muestra (mg MA/kg de muestra). El proceso de oxidación se inhibió usando antocianinas como antioxidante a diferentes concentraciones metanólicas (250, 500, y 750 $\mu\text{g/ml}$), y BHT a 500 $\mu\text{g/ml}$, que es la concentración máxima permisible en alimentos.

◎○ Dienos conjugados (DC)

La formación de dienos conjugados (DC) ocurre durante las primeras fases de la oxidación lipídica. La evaluación del contenido de DC es un buen parámetro para la valoración del deterioro oxidativo de aceites, a la vez que indica la efectividad del antioxidante (Gaviria y Cifuentes, 2003). La figura 1 muestra el incremento relativo del contenido de DC en las muestras de aceite de maíz con extracto antociánico, BHT y blanco a una temperatura constante de almacenamiento de 30 °C, como una función del tiempo. Se observó un patrón regular de incremento para todas las muestras durante el tiempo de experimentación; hasta el día tres el incremento de DC en las muestras con



Figura 1 Efecto del extracto antocianico a diferentes concentraciones y BHT en la formación de DC en aceite de maíz durante diez días de almacenamiento a 30 °C



antioxidante no fue apreciable, mientras que el blanco aumentó considerablemente hasta el día cuatro. Las muestras con antocianinas presentaron un incremento entre el día tres y el día cuatro y a partir de allí todas ellas exhibieron un comportamiento relativamente constante. En el día ocho todas las muestras presentaron un incremento grande en el contenido de DC hasta el día 10. Los valores DC de todas las muestras estabilizadas fueron mucho más bajos que el blanco, indicando una buena actividad antioxidante de los extractos. Se observaron altos contenidos de DC para el blanco, indicando una intensidad considerable de la oxidación, seguido por las muestras con extractos a las concentraciones de 250, 500, 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y BHT, respectivamente. El contenido de DC de la muestra a la concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fue el más alto de las muestras evaluadas, con valores significativamente menores que el blanco durante todo el periodo de almacenamiento.

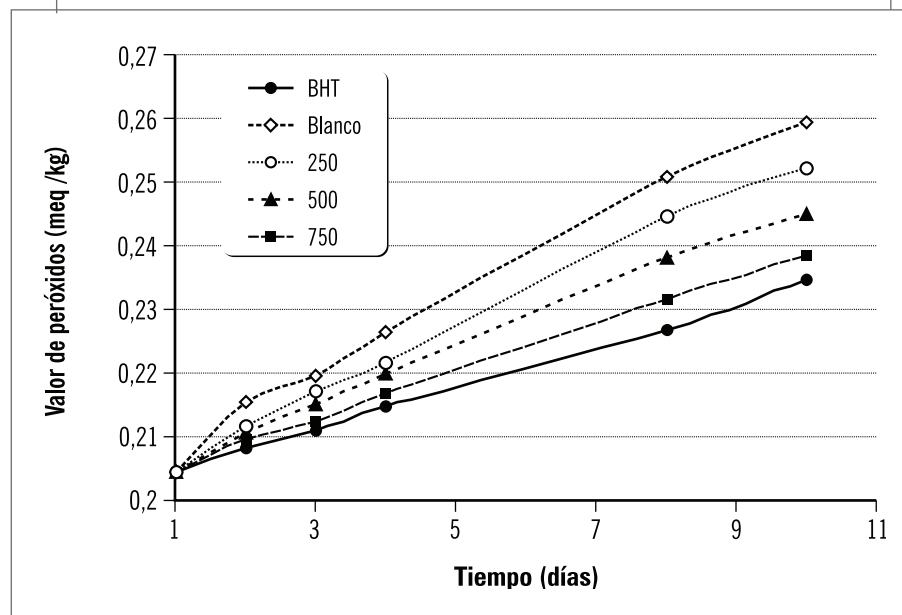


●○ Valor de peróxido (PV)

El valor de peróxido es un buen indicador del grado de oxidación inicial en aceites. La figura 2 muestra el incremento de VP para todas las muestras durante el tiempo de almacenamiento. El incremento del VP es debido a la formación de hidroperóxidos, productos de la oxidación primaria (Abdulkarim *et al.*, 2007). El incremento del VP fue de tendencia constante durante los cuatro primeros días de experimentación, pero a diferentes gradientes según la concentración de extracto o BHT. A partir del día cuatro el incremento en el VP del blanco y la concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de extracto fue mayor que el obtenido con las otras muestras. Los valores de peróxido estuvieron en el rango de 0,238 a 0,252 meq/kg para las muestras que contenían el extracto antociánico, mientras que para el BHT, fue de 0,235 meq/kg y 0,259 meq/kg para el blanco en el décimo día. El blanco presentó el contenido más alto de VP, seguido de 250, 500, 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y BHT, respectivamente. La velocidad de incremento de VP permaneció uniforme para 500 y 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante todo el periodo de almacenamiento, sugiriendo una buena eficiencia de los extractos a 500 y 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para la estabilización del aceite de maíz (Abdulkarim *et al.*, 2007).

Figura 2

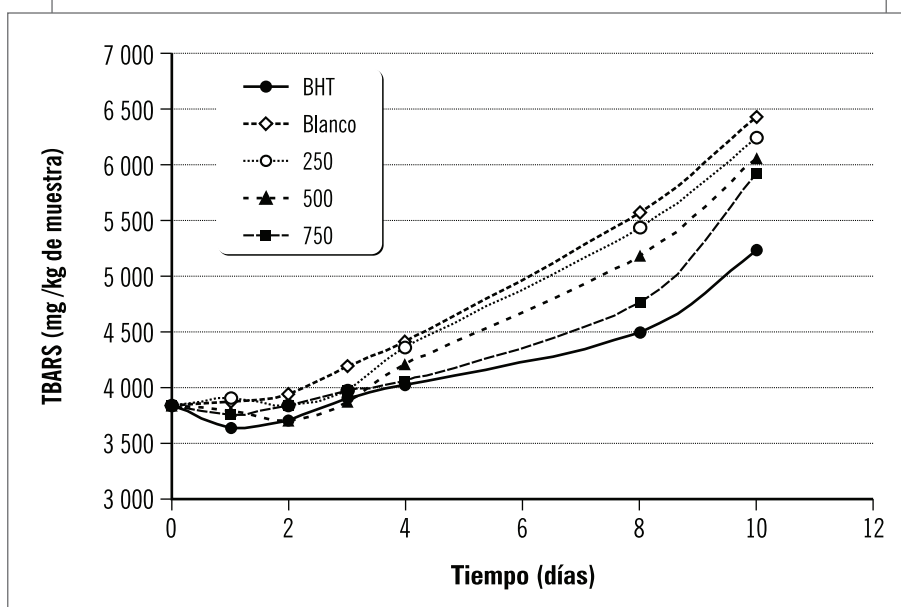
Efecto del extracto antociánico a diferentes concentraciones y BHT en la formación de PV en aceite de maíz durante 10 días de almacenamiento a 30 °C





⊙⊙ Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La figura 3 muestra el efecto de las diferentes concentraciones del extracto antociánico, BHT y el blanco sobre la formación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en las muestras de aceite de maíz en el tiempo. Un incremento continuo de TBARS fue observado en todas las muestras durante el tiempo de almacenamiento. El blanco exhibió los valores más altos de TBARS en todas las etapas de análisis durante el almacenamiento. El aumento en la concentración de TBARS fue lento y similar para todas las muestras hasta el día tres, a partir del cual se aceleró la formación en el blanco y las concentraciones de 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$ hasta el último día. El incremento en el contenido de TBARS fue más intenso y de comportamiento lineal para el blanco y las muestras con 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$ de extracto antociánico. Las muestras de 750 $\mu\text{g/ml}$ y BHT se comportaron igual entre el día 3 y el día 4, a partir del cual mostraron un comportamiento exponencial, exhibiendo un mayor contenido de TBARS la muestra de 750 $\mu\text{g/ml}$, en especial entre los días 8 y 10 donde el incremento fue más pronunciado. El efecto antioxidante debido al extracto y BHT fue similar al presentado en DC.

Figura 3**Efecto del extracto antociánico a diferentes concentraciones y BHT en la formación de TBARS en aceite de maíz durante diez días de almacenamiento a 30 °C**



El comportamiento de la formación de DC, PV y TBARS en el tiempo puede modelarse mediante regresiones exponenciales, cuyas pendientes dependen de la concentración y de la naturaleza del antioxidante. Por esto, se hace necesario obtener un parámetro (Φ) que determine la acción antioxidante de cualquier compuesto en un proceso oxidativo en particular.

Para calcular la constante (Φ) del compuesto en los ensayos DC, se realizó el siguiente procedimiento descrito por Rojano *et al.* (2008a): se determinó ϕ_i , que es la pendiente de la regresión exponencial de los DC contra el tiempo, para cada concentración. Con los valores de ϕ_i , se calculó la relación ϕ_0/ϕ_i ; donde ϕ_0 es la pendiente del blanco. El valor de la pendiente de la regresión lineal de ϕ_0/ϕ_i contra la concentración es el valor de la constante Φ , que en este caso particular refleja el efecto total de las antocianinas como antioxidante, con respecto a la inhibición del proceso de oxidación del aceite de maíz, en la formación de DC. El cálculo de Φ , se hizo a partir de la siguiente ecuación:

$$\phi_0/\phi_i = 0,0003(\text{mg/kg de muestra}) + 0,9413$$

La constante global para inhibir la formación de DC para el extracto antocianínico es:

$$\Phi = 0,0003 \pm 0,00000889119, \text{ con una } r^2 = 99,93\%, r = 0,999, F = 1342,71 \text{ y } p = 0,0174.$$

De otro lado, a partir de los valores de ϕ_0/ϕ_i se pudo calcular el porcentaje de inhibición para cada concentración de antioxidante, expresado como:

$$\% \text{ de inhibición} = [1 - \phi_0/\phi_i] \times 100 \quad (1)$$

El BHT presentó mayor capacidad para inhibir los procesos oxidativos acelerados a 30 °C en aceite, en comparación con los extractos de antocianinas, porque a la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ inhibió un 37,7 %, mientras que las antocianinas a 750 $\mu\text{g/ml}$ inhibieron solamente el 15,7%; estos resultados están acordes con diversos reportes bibliográficos (Wanasundara y Shahidi, 1998).

Para calcular la constante (Φ) en los ensayos PV, se procede como en el caso anterior; se calculan los valores de ϕ_0 , ϕ_i y las relaciones de ϕ_0/ϕ_i ; se calcula el



valor de la constante global Φ para la inhibición de formación de hidroperóxidos en el proceso de oxidación de aceite a 30 °C. El valor resultante es:

$$\Phi = 0,0008 \pm 0,0000610995$$

Con una $r^2 = 99,45\%$, $r = 0,995$, $F = 181,8$ y $p = 0,0471$.

A partir de los valores de ϕ_0/ϕ_i , aplicando la ecuación (1) se calculó el porcentaje de inhibición para cada concentración de antioxidante. Al comparar los resultados obtenidos para las muestras con contenido de antocianato y BHT se pudo observar una mayor capacidad de inhibición del proceso oxidativo para el BHT, porque la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ inhibió un 41,4%, en comparación con un 34,1% obtenido con las antocianinas a 750 $\mu\text{g/ml}$; resultados que concuerdan con diversos reportes bibliográficos (Wanasundara y Shahidi, 1998).

El resultado de la prueba de TBA usando las diferentes concentraciones de extracto, en general, presentó mayor actividad antioxidante, en comparación con el blanco. Los tratamientos con el extracto antociánico de mortiño o agraz redujeron la oxidación del aceite de maíz durante la incubación a 30 °C, demostrando un efecto inhibitorio en la formación de TBARS e indicando una protección potencial de la oxidación para el aceite (Madsen y Bertelsen, 1995). Con los datos de la figura 3 se calcularon los valores de ϕ_0 , ϕ_i y las relaciones de ϕ_0/ϕ_i . De igual manera que en el caso anterior, se calculó el valor de la constante global Φ para inhibir la formación de TBARS en el proceso de oxidación de aceite a 30 °C. El valor resultante fue $\Phi = 0,0004 \pm 0,0001$, con una $r^2 = 91,52\%$, $r = 0,915$, $F = 10,80$ y $p = 0,1881$.

El BHT presentó mayor capacidad para inhibir el proceso oxidativo a 30 °C en aceite de maíz, en comparación con los extractos antocianinos, porque la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ inhibió un 37,2%, mientras que las antocianinas a 750 $\mu\text{g/ml}$ inhibieron solamente el 19,6%; estos resultados están acordes con diversos reportes bibliográficos para otras frutas (Siriwardhana y Jeon, 2004 y Rojano *et al.*, 2008a).



◎◎ Conclusiones

El mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz) es una fruta con alto contenido de compuestos polifenólicos, que se expresan a través de una alta capacidad antioxidante, con valores comparables o superiores a los diversos *Vaccinium* encontrados en diferentes latitudes, los cuales poseen gran potencial de comercialización, como alimentos nutraceuticos o como fruta fresca.

El extracto antocianico, en las concentraciones estudiadas, es capaz de proteger el aceite de maíz contra la oxidación y se puede recomendar como una buena fuente de antioxidantes naturales para la estabilización de sistemas alimenticios, especialmente los aceites vegetales.

El agraz o mortiño es una fruta con capacidad antioxidante para ser usada como nutraceutico o como aditivo alimentario para inhibir la oxidación de grasas y aceites. Este es el primer reporte de estudios sobre la capacidad antioxidante del mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz) y su acción preservadora de aceites vegetales.

◎◎ Bibliografía

- Abdulkarim, S.M., K. Long, O.M. Lai, S.K.S. Muhammad y H.M. Ghazali. 2007. Frying quality and stability of high-oleic *Moringa oleifera* seed oil in comparison with other vegetable oils. *Food Chemistry*, 105:1382-1389.
- Aubourg, S.P., C. Piñeiro y M.J. González. 2004. Quality loss related to rancidity development during frozen storage of horse (*Trachurus trachurus*). *JAOCs*, 81(7): 671-678.
- Arts, M., S. Dallinga, H.P. Voss, G. Haenen y A. Bast. 2004. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry*, 88: 567-570.
- Beccaro, G., M.G. Mellano, R. Botta, V. Chiabrando y G. Bounous. 2006. Phenolic and anthocyanin content and antioxidant activity in fruits of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and of highbush blueberry (*V. corymbosum* L.) cultivars in north western Italy. *Acta Horticulturae*, 715: 553-558.
- Benzie, I.F.F. y J.J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.*, 239:70-76.
- Botero, M.L., S. Ricaurte, C. Monsalve y B. Rojano. 2007. Capacidad reductora de 15 frutas tropicales. *Scientia et Technica*, 33: 295-296.
- Bush, R.K. y S.L. Taylor. 1998. Adverse reactions to food and drug additives, in allergy. *Principles and Practice*, 5th ed. Mosby, St. Louis, 1183 p.



- Capocasa, F., J. Scalzo, B. Mezzetti y M. Battino. 2008. Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: The role of genotype. *Food Chemistry*, 111: 872-878.
- Çelik, H., M. Özgen, S. Serçe y C. Kaya. 2008. Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. *Scientia Horticulturae*, 117: 345-348.
- Choksi, R.B., W.H. Boylston, J.P. Rabek, W.R. Widger y J. Papaconstantinou. 2004. Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes. *Biochim Biophys Acta*, 1688 (2): 95-101.
- Conner, A.M., J.J. Luby, J.F. Hancock, S. Berkheimer y E.J. Hanson. 2002. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4): 893-898.
- Cornelli, U. 2009. Antioxidant use in Nutraceuticals. *Clinics in Dermatology*. 27: 175-194.
- Fuchs, J. 1998. Potentials and limitations of the natural antioxidants alpha-Tocopherol, L-ascorbic acid and beta-caroteno in cutaneous photoprotection. *Free Radic. Biol. Med*, 25(7): 848-873.
- Gaviria, C. y O. Cifuentes. 2003. Evaluación de la capacidad antioxidante y del poder de tinción de extractos metanólicos de algunas frutas tropicales. Trabajo de grado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 80 p.
- Gaviria, C., O. Cifuentes, C. Monsalve, B. Rojano. 2007. Actividad antioxidante de extractos metanólicos de *Attalea butyracea*. *Scientia et Technica*, 33.
- Gelareh, G., E.D. Zahra, R. Karamatollah y H. Mohammad. 2009. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry* (In press).
- Guzmán-Chozas, M., I. Vicario y R. Guillén-Sans. 1997. Spectrophotometric profiles of off-flavor aldehydes by using their reactions with 2-thiobarbituric acid. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 2452-2457.
- Halliwell, B. 2000. The antioxidant paradox. *Lancet*, 355: 1179-1180.
- Ito, N., S. Fukushima, A. Hasegawa, M. Shibata y T. Ogiso. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 70: 343-347.
- Kahkonen, M.P., A.I. Hopia y M. Heimonen. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 4076-4082.
- Kalt, W. y D. Dufour. 1997. Health functionality of blueberries. *Hortotechnology*, 7: 216-221.
- Kalt, W., J.E. McDonald, R.D. Ricker y X. Lu. 1999. Anthocyanin content and profile within and among blueberry species. *Canadian Journal of Plant Science*, 79(4): 617-623.
- López, J.B., B. Rojano, C. Lasso e I. Sánchez. 2008. Evaluación genotóxica y citotóxica del isoespintanol en cultivos de linfocitos humanos. Tercer congreso colombiano de biotecnología y Segundo seminario internacional de bionegocios, Cartagena.
- Madsen, H.L. y G. Bertelsen. 1995. Spices as antioxidants. *Trends Food Sci Tech.*, 6:271-277.



- Mark, R. y B. McCalland. 1999. Can antioxidants vitamins materially reduce oxidative damage in humans. *Free Radic. Biol. Med.*, 26(7/8): 1034-1053.
- Netzel, M., G. Netzel, Q. Tian, S. Schwartz e I. Konczak. 2006. Sources of antioxidant activity in Australian native fruits. Identification and quantification of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26): 9820-9826.
- Netzel, M., G. Netzel, Q. Tian, S. Schwartz e I. Konczak. 2007. Native Australian fruits: a novel source of antioxidants for food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8:339-346.
- Parr, A.J. y G.P. Bolwell. 2008. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.*, 80: 985-1012.
- Prior, R.L., G. Cao, A. Martin, E. Sofic, J. McEwen, C. O'Brien, et al. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7): 2686-2693.
- Re, P.N., A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang y C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26:1231-1237.
- Rodríguez, A., V. Lozada, M.A. Larraín, V. Quiral, J. Vinagre y P. Aubourg. 2007. Development of lipid changes related to quality loss during the frozen storage of farmed coho salmon. *JAOCS*, 84: 727-734.
- Rojano, B., C. Gaviria y J. Saez. 2008a. Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Vita*. 15(2): 1-9.
- Rojano, B., J. Saez, G. Schinella, J. Quijano, E. Vélez y A. Gil. 2008b. Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-Isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol). *J. Mol. Struct.*, 877: 1-6.
- Rojano, B., C. Gaviria, M. Gil, J. Saez, G. Schinella y H. Tournier. 2008c. Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae*, 15(1):173-181.
- Sellappan, S., C. Akoh y G. Krewer. 2002. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8): 2432-2438.
- Shanta y Decker. 1994. Rapid, Sensitive, Iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J. AOAC*, 77: 421-424.
- Shiow, Y., J. Wang y R. Ballington. 2007. Free radical scavenging capacity and antioxidant enzyme activity in deerberry (*Vaccinium stamineum* L.) LWT. *Food Science and Technology*, 40(8):1352-1361.
- Singleton, V.L. y J.A. Rossi. 1965 Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Siriwardhana, N. y Y. Jeon. 2004. Antioxidative effect of cactus pear fruit (*Opuntia ficus-indica*) extract on lipid



- peroxidation inhibition in oils and emulsion model systems. *Eur. Food Res. Technol.*, 219: 369-376
- Szeto, Y.T., A.R. Collins y L.F.F. Benzie. 2002. Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure. *Mutat. Re.*, 500: 31-38.
- Vasco, C., J. Ruales y A. Kamal-Eldin. 2008. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111: 816-823.
- Yilmaz, S., S. Ozan, F. Benzer y H. Canatan. 2003. Oxidative damage and antioxidant enzyme activities in experimental hypothyroidism. *Cell Biochem. Function*, 21: 325-340.
- Wanasundara, U.N. y F. Shahidi. 1998. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chem.*, 63(3):342-355.