

Estabilidad de antocianinas en jugos pasteurizados de mora (*Rubus glaucus* Benth)

Mario José Moreno-Alvarez, Alfredo Vilorio Matos, Eliezer López, Douglas Belén C.

Laboratorio de Biomoléculas. Ingeniería de Alimentos, Universidad Simón Rodríguez- Estado Carabobo, Venezuela

RESUMEN. En esta investigación se evalúa la estabilidad química de antocianinas totales mediante la determinación de los espectros de absorción en el rango visible (400-580 nm) en tres jugos pasteurizados en presencia de diferentes proporciones de ácido ascórbico (Formulación A: 0,1%, Formulación B: 0,05% y Formulación C: 0,01%), elaborados a partir de 12% de pulpa de mora (*Rubus glaucus* Benth). Los parámetros fisicoquímicos analizados fueron: acidez titulable, sólidos solubles (°Brix) y pH. Se realizaron recuentos de hongos, levaduras, organismos aeróbicos mesófilos, coliformes totales (NMP/mL) y presencia de *Escherichia coli*. Los parámetros sensoriales (color, olor, sabor) se investigaron mediante escala hedónica a través de un panel no entrenado (Fridman, $P < 0,05$). Las evaluaciones se efectuaron durante un período de almacenamiento de 9 días. El contenido de antocianinas totales expresado como g de pelargonidina-3-glicosido/L no varió significativamente en ninguno de los tratamientos ($P > 0,05$). No se determinó desplazamiento bacterocrómico asociado a efectos oxidativos. Los valores de pH (3,4), acidez titulable (6,0 - 7,2 mL NaOH 0,079 N) y sólidos solubles (9,0 - 9,8 °Brix) no presentaron diferencias significativas durante las evaluaciones ($P > 0,05$). Los parámetros microbiológicos evaluados presentaron valores mínimos establecidos para productos pasteurizados (Hongos UFC/mL < 10 , Levaduras UFC/mL < 10 , NMP/mL coliformes UFC/mL < 10 y organismos mesófilos UFC/mL entre 120-140 para el primer día de pasteurización). No se detectaron diferencias significativas en las evaluaciones sensoriales (Fridman, $P > 0,05$).

Palabras clave: *Rubus glaucus*, pelargonidina-3-glucósido, pasteurización, estabilidad, antocianinas, mora.

SUMMARY. Stability of anthocyanins in pasteurized juice of blackberry (*Rubus glaucus* Benth). In this research the chemical stability of total anthocyanins in three pasteurized juices elaborated from 12% of blackberry (*Rubus glaucus* Benth) pulp, and addition of ascorbic acid (Formulation A: 0.1%, Formulation B: 0.05% and Formulation C: 0.01%), was evaluated by means of absorption visible spectra (400-580 nm). Physico-chemical characterization (acidity, soluble solids content in °Brix, pH), and count of mesophilic microorganism, fungi, yeasts, fecal coliforms (PMN/mL) and *Escherichia coli*, were evaluated. Sensorial parameters (color, smell, flavor) were investigated by means of un-trained panel using a hedonic scale (Fridman, $P < 0.05$). The study was performed during storage for 9 days. The total anthocyanins were reported as pelargonidin-3-glycoside g/L, and no significant differences were founded among the evaluated in each formulation during storage ($P > 0.05$). Bacterochromic effect due to oxidation as not observed. Acidity (6.0 - 7.2 mL NaOH 0.079 N), soluble solids content (9.0 - 9.8 °Brix) and pH (3.4) did not show significant differences ($P > 0.05$). The microbiological evaluation showed minimum values for pasteurized products (fungi CFU/mL < 10 , yeast CFU/mL < 10 , fecal coliforms CFU/mL < 10 and mesophilic microorganism CFU/mL between 120-140 on first day in storage). Sensorial analysis did not show significant differences (Fridman, $P > 0.05$).

Key word: *Rubus glaucus*, pelargonidin-3-glycoside, pasteurization, stability, anthocyanins, blackberry.

INTRODUCCION

Estudios epidemiológicos efectuados en varios países evidencian que el consumo de frutos y vegetales reducen enfermedades coronarias además de minimizar los riesgos de cáncer (1,2). Se ha descrito que algunos compuestos fenólicos de origen vegetal presentan dentro de la célula actividad antioxidante, reduciendo la concentración de radicales libres, y en algunos casos logran establecer grupos de quelación con iones metálicos (1-3). Los mecanismos involucrados de los agentes antioxidantes establecen donación de electrones o átomos de hidrógeno a los radicales libres. Los agentes antioxidantes presentes en alimentos pueden

reducir trombosis, activar macrófagos e inhibir la tendencia a la peroxidación (1). Entre los compuestos que han merecido dichos estudios se encuentran las antocianinas, debido a la presencia de sustituyentes -OH, los cuales son moléculas con poder antioxidante (5).

Las especies del género *Rubus* se han descrito como fuentes naturales de antocianinas, glucósidos de cianidinas y en algunos casos glucósidos de pelargonidina (6). La mayor concentración de los pigmentos se encuentran en los frutos, los cuales se comercializan para el consumo directo. En Venezuela se utilizan para la confección de mermeladas, la elaboración de licores o jugos en expendios comerciales en forma netamente artesanal (7). Debido a inadecuados manejos

postcosecha los frutos sufren deterioro acelerado minimizando los márgenes de comercialización.

Esta investigación tiene como objetivo central la formulación de tres jugos pasteurizados a partir de frutos de mora (*Rubus glaucus* Benth) condicionados en diferentes proporciones con ácido ascórbico. Se evaluaron algunos parámetros físico-químicos y microbiológicos que pueden estar asociados a eventos degradativos de las antocianinas. Debido a que en el mercado nacional no existen productos con estas características, esta investigación permitió evaluar la factibilidad técnica de la confección de un nuevo producto con potencial antioxidante natural y la utilización de un rubro marginal en el país.

MATERIALES Y METODOS

Selección de los frutos

Frutos de mora (*Rubus glaucus* Benth), con un peso promedio $6,56 \pm 1,62$ g fueron cosechados (Abril 2001) en la Colonia Tovar (500 msnm), el transporte se efectuó en cajas de cartón acondicionadas para tal fin. Los criterios de selección fueron: grado de madurez adecuado para consumo, color rojo homogéneo y sin daño físico aparente. El peso del lote fue de 8 kg. Se procesaron 24 h después de ser cosechados y mantenidos bajo refrigeración constante a $7,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Se sometieron a lavado con agua corriente seguido de un proceso de escaldado a una temperatura de $75 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 2 min. La pulpa fue extraída mediante equipo de extractor de jugo (EASTEM ELECTRICÒ, Modelo JX5000) para obtener un producto parcialmente libre de semillas.

Caracterización fisicoquímica de la pulpa

La acidez titulable se determinó mediante metodología AOAC (8). Los sólidos solubles se expresaron como °Brix y se evaluaron mediante refractómetro Baush & Lomb modelo ABBE-3L. El pH se determinó mediante potenciómetro HANNA Instruments, modelo pHep® 1. Todos los parámetros evaluados se analizaron por triplicado.

Evaluación del contenido de antocianinas totales en pulpa de mora (*Rubus glaucus* Benth)

Para determinar el contenido de antocianinas totales se peso 1 g de pulpa y se extrajo en 100 mL de MeOH acidificado con HCL al 1% v/v por triplicado. Los extractos se filtraron al vacío en embudos de porcelana (PYREX® USA, No. 36060, 15 mL, ASTM 10-15M) en completa oscuridad. El filtrado obtenido se enrasó a un volumen final de 100 mL en un balón aforado. Se midió la absorbancia en el espectro visible (400-580 nm) mediante spectronic 21 (Baush & Lomb). El contenido de antocianinas totales se determinó a 520 nm según procedimiento descrito por Díaz et al (9), expresados como g de pelargonidina-3-glucósido ($E^{1\text{cm}} 1\%$:

$31.600 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ y $\text{PM}: 433,2 \text{ g mol}^{-1}$) / kg de pulpa. Con la finalidad de investigar la presencia de compuestos antocianínicos con grupos hidróxilos en posición orto en el anillo B, se determinaron los espectros de absorción en presencia de AlCl_3 a muestras de los extractos.

Formulaciones de los jugos

Se elaboraron tres formulaciones de jugos de mora (*Rubus glaucus* Benth), adicionándoles diferentes proporciones de ácido ascórbico: 0,1% (A); 0,05% (B) y 0,01% (C). El contenido de pulpa fue de 12% p/v para cada tratamiento. La cantidad de sacarosa comercial añadida fue de 420 g para un volumen final de 4,2 L.

Proceso de pasteurización

Las diferentes formulaciones se pasteurizaron mediante equipo piloto Marca DOVER, Modelo TDB/7-20 de 18 L de capacidad a una temperatura de $60,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ durante 30 min. Las muestras se envasaron en recipientes de vidrio con capacidad de 250 mL previamente esterilizados y tapados herméticamente. Se codificaron y mantuvieron en refrigeración durante 9 días a una temperatura de $7,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Evaluaciones fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales a los jugos pasteurizados.

Las muestras se evaluaron después del proceso de pasteurización y consecutivamente al tercer y noveno día. La acidez titulable se determinó mediante metodología AOAC (8). Los sólidos solubles se expresaron como °Brix y se evaluaron en un refractómetro Baush & Lomb modelo ABBE-3L. El pH se determinó en un potenciómetro HANNA instruments, modelo pHep® 1.

Se realizaron recuentos de hongos, levaduras y organismos aeróbicos mesófilos según procedimiento descritos por COVENIN (10,11). Coliformes totales (NMP/mL) e investigación de presencia de *Escherichia coli* (12).

La evaluación sensorial se efectuó siguiendo la escala hedónica propuesta por el CIEPE (13). El número de panelistas no entrenado fue de cuarenta. Los atributos evaluados fueron: color, sabor y olor.

Evaluación del contenido de antocianinas totales en el jugo pasteurizado

Muestras de jugo de un volumen de 4 mL se concentraron mediante rota evaporador marca HEIDOLPH modelo VV2011 a presión reducida hasta la sequedad en total oscuridad a una temperatura de $40,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Se resuspendió en 20 mL de MeOH acidificado con HCL al 1% v/v. Se tomó 4 mL y se diluyó con 8 mL del mismo solvente. Este procedimiento se efectuó por triplicado. El contenido de antocianinas se determinó por el método propuesto por Díaz et al (9). Con la finalidad de detectar efecto degradativo

asociado a la oxidación se determinaron espectros de absorción en el rango visible (400-580 nm). Este procedimiento se efectuó paralelamente a las evaluaciones fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales.

Análisis estadísticos

Los resultados de cada uno de los tratamientos se evaluaron mediante análisis de varianza ($P < 0,05$), utilizando el paquete estadístico SAS (14). El análisis sensorial se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Friedman ($P < 0,05$) (15).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de la evaluación de la materia prima se presentan en la Tabla 1. Los valores de pH, sólidos soluble y acidez titulable son similares a los señalados por García-Viguera (16). Con relación al contenido de antocianinas totales en frutos de *Rubus glaucus* Benth, se encontró en 1,10 g pelargonidina-3-glucósido/ kg de pulpa. Al comparar estos valores con los señalados por Deighton et al (6) para 18 cultivares, se puede constatar que solo la especie *Rubus niveus* (1,186 g /kg de pulpa) presenta valores superiores que a los determinados en este estudio. En un estudio efectuado por Torre y Barriti (17), en los cuales analizaron 43 clones de *Rubus*, ninguna de las muestras presentaron valores superiores a los determinados para frutos de *R. glaucus* de origen venezolano, lo cual permite inferir que estos frutos presentan una importante capacidad antioxidativa.

TABLA 1
Caracterización de la materia prima

| pH | Sólidos solubles* | Acidez titulable* | Antocianinas totales # |
|-----|-------------------|-------------------|------------------------|
| 3,1 | 7,5 | 13,05 | 1,10 |

* expresados como °Brix

* mL de NaOH 0.076 N

g pelargonidina-3-glicósido/kg de pulpa

En la Figura 1 se representan el espectro de absorción visible del extracto metanólico de pulpa antes del proceso de pasteurización en MeOH + HCl al 1%. Se determinó un valor máximo de absorbancia a 520 nm (Tabla 3). Valor establecido con anterioridad por otros autores que sitúan las absorbancias máximas en un rango de 510 a 540 nm, característicos de estructuras antocianicas (9, 17- 20).

Según datos establecidos por Harborne (21), la relación entre la absorbancia a 440 nm y la absorbancia máxima logra establecer algunos índices que permiten la identificación de antocianinas. Según este criterio la pelargonidina presenta un pico máximo a 520 nm y un coeficiente de 39, ambos

valores muy semejantes a los determinados en esta investigación (520 nm y 35 respectivamente). El espectro de absorción obtenido, determinó la inexistencia de desplazamiento bacterocrómico (Tabla 2). Estos resultados permiten inferir la ausencia de cianidina, que en algunas especies de *Rubus* se ha descrito como mayoritaria (6), ya que esta estructura presenta grupos -OH en posición orto y se caracteriza por presentar desplazamiento bacterocrómico. Estos resultados permitieron expresar el contenido de antocianinas totales en función de la pelargonidina-3-glucósido.

FIGURA 1

Espectro de absorción del extracto de pulpa antes del proceso de pasteurización en MeOH+ HCl al 1%

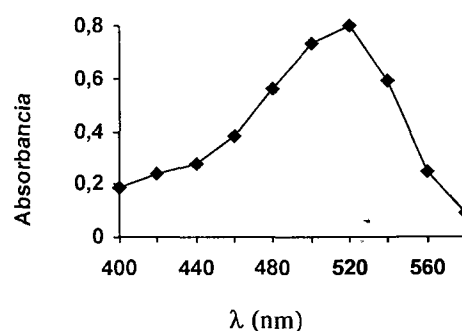


TABLA 2
Características espectrales de los pigmentos antocianos del fruto *Rubus glaucus* Benth

| λ máxima | DO ₄₄₀ / DO _{máxima} X 100 | AlCl ₃ * |
|----------|--|---------------------|
| 520 | 35 | 0 |

0 indica que no hubo desplazamiento bacterocrómico

En las Figuras 2, 3 y 4 se representan los espectros de absorción de los jugos pasteurizados para las tres formulaciones. La tendencia generalizada es una alta estabilidad química de las antocianinas presentes, ya que no se encontró ningún desplazamiento bacterocrómico por efectos oxidativos o deterioro asociado a la pasteurización y/o almacenamiento. Todos los gráficos presentaron máximas absorbancias a 520 nm, valor similar al obtenido para la Figura 1 (sin pasteurizar).

En la Tabla 3 se presenta la concentración de antocianinas totales evaluadas en los diferentes tiempos. No se detectó diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$), lo cual corrobora el hecho ya establecido que durante los 9 días de evaluaciones estos compuestos no presentaron degradación alguna ya que en los diferentes tratamientos la concentración no experimenta descenso.

FIGURA 2

Espectro de absorción del jugo pasteurizado de *Rubus glaucus* Benth (0,1% de ácido ascórbico)

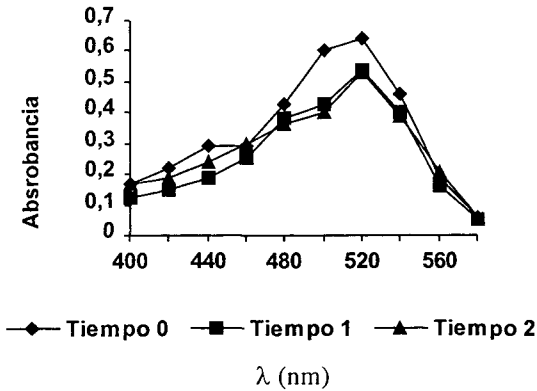


FIGURA 3

Espectro de absorción del jugo pasteurizado de *Rubus glaucus* Benth (0,05% de ácido ascórbico).

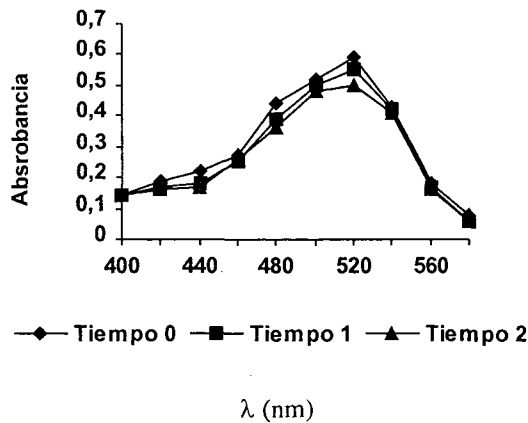


FIGURA 4

Espectro de absorción del jugo pasteurizado de *Rubus glaucus* Benth (0,01% de ácido ascórbico).

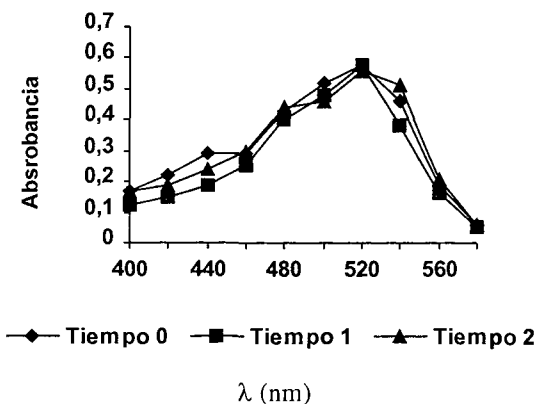


TABLA 3

Contenido de antocianinas totales * en jugos pasteurizados de *Rubus glaucus* Benth

| Jugo | To | T1 | T2 |
|------|---------------------|---------------------|---------------------|
| A | 0,0041 ^a | 0,0040 ^a | 0,0039 ^a |
| B | 0,0039 ^a | 0,0038 ^a | 0,0038 ^a |
| C | 0,0040 ^a | 0,0040 ^a | 0,0038 ^a |

Medias con diferentes letras en el super índice, dentro de una misma fila, indican diferencias significativas (P<0,05)

*g de pelargonidina-3-glicósido/L

En la Tabla 4 se representan los valores de pH, sólidos solubles y °Brix. La tendencia observada certifica que los productos pasteurizados no sufrieron cambios físico-químicos estadísticamente significativos (P>0,05).

TABLA 4

Evaluación de pH, sólidos solubles* y acidez titulable** de jugos pasteurizados de *Rubus glaucus* Benth

| Jugo | pH | | | SS | | | AT | | |
|------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | To | T1 | T2 | To | T1 | T2 | To | T1 | T2 |
| A | 3,4 ^a | 3,4 ^a | 3,4 ^a | 9,8 ^a | 9,5 ^a | 9,5 ^a | 6,0 ^a | 6,2 ^a | 7,2 ^a |
| B | 3,4 ^a | 3,4 ^a | 3,4 ^a | 9,2 ^a | 9,2 ^a | 9,0 ^a | 6,8 ^a | 6,8 ^a | 6,8 ^a |
| C | 3,4 ^a | 3,4 ^a | 3,4 ^a | 9,4 ^a | 9,0 ^a | 9,0 ^a | 6,2 ^a | 6,5 ^a | 6,0 ^a |

pH: acidez ionica

SS: sólidos solubles (°Brix)

AT: acidez titulable (mL de NaOH 0,079 N)

Medias con diferentes letras en el super índice, dentro de una misma fila, indican diferencias significativas para un mismo parámetro (P<0,05).

Las evaluaciones microbiológicas de los productos pasteurizados se representan en las Tablas 5, 6 y 7. Los parámetros evaluados cumplieron con la Norma 1699 COVENIN (22). La norma establece valores máximos de 200 UFC/mL para organismos mesófilos en el primer día de pasteurización. En todos los casos los valores estuvieron comprendidos entre 120-140 UFC/mL. El resto de los microorganismos presentaron valores óptimos, asegurando que el proceso de pasteurización fue eficiente.

Las evaluaciones sensoriales efectuadas con el panel no entrenado, indicaron que no existieron diferencias significativas entre las formulaciones para los atributos color, olor y sabor. Lo cual indica que las concentraciones de ácido ascórbico ensayadas no fueron discriminadas por los panelistas (Friedman, P>0,05).

TABLA 5
Evaluación microbiológica de la formulación "A" del jugo pasteurizado de *Rubus glaucus*

| Microorganismo | Tiempo 0 | Tiempo 1 | Tiempo 2 |
|---------------------------|----------|----------|----------|
| Aerobios mesófilos UFC/mL | 140 | 160 | 200 |
| Hongos UFC/mL | <10 | <10 | <10 |
| Levaduras UFC/mL | <10 | <10 | <10 |
| NMP/mL coliformes | <3 | <3 | <3 |
| <i>Escherichia coli</i> | ND | ND | ND |

ND: valores no detectados

TABLA 6
Evaluación microbiológica de la formulación "B" del jugo pasteurizado de *Rubus glaucus*

| Microorganismo | Tiempo 0 | Tiempo 1 | Tiempo 2 |
|---------------------------|----------|----------|----------|
| Aerobios mesófilos UFC/mL | 140 | 150 | 230 |
| Hongos UFC/mL | <10 | <10 | <10 |
| Levaduras UFC/mL | <10 | <10 | <10 |
| NMP/mL coliformes | <3 | <3 | <3 |
| <i>Escherichia coli</i> | ND | ND | ND |

ND: valores no detectados

TABLA 7
Evaluación microbiológica de la formulación "C" del jugo pasteurizado de *Rubus glaucus*

| Microorganismo | Tiempo 0 | Tiempo 1 | Tiempo 2 |
|---------------------------|----------|----------|----------|
| Aerobios mesófilos UFC/mL | 120 | 140 | 300 |
| Hongos UFC/mL | <10 | <10 | <10 |
| Levaduras UFC/mL | <10 | <10 | <10 |
| NMP/mL coliformes | <3 | <3 | <3 |
| <i>Escherichia coli</i> | - | - | - |

ND: valores no detectados

CONCLUSIONES

Los jugos elaborados a partir de pulpa de mora (*Rubus glaucus*) condicionados con ácido ascórbico como único preservativo presentaron una estabilidad química mínima de nueve días a una temperatura de 7°C. La concentración de antocianinas totales expresados como g de pelargonidina-3-glicosido/L se mantuvo constante. Las variables fisicoquímicas evaluadas indican que el producto no sufrió

modificaciones de pH, sólidos solubles y acidez titulable ($p > 0,05$) lo cual evidencia que el proceso de pasteurización fue eficiente (corroborado con los análisis microbiológicos, los cuales fueron óptimos). Se concluye que existe factibilidad técnica para elaborar en el ámbito industrial bebidas pasteurizadas utilizando como materia prima un cultivo de casi nula explotación industrial, el cual presenta valores altos de compuestos potencialmente antioxidante, los cuales serían beneficiosos para la población venezolana.

REFERENCIAS

1. Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Tech.* 1993; 85-89.
2. Langley-Evans SC. Consumption of black tea elicits an increase in plasma antioxidant potential humans. *International J Food Sci Nutr.* 2000; 51:309-315.
3. Martínez-Valverde I, Periago M, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch Latinoamer Nutr.* 2000; 50: 5-17.
4. Parr A, Bolweel P. 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.* 2000; 80: 985-1012.
5. Rodríguez-Saona L, Giusti M, Wrolstad R. Anthocyanin pigment composition of red-fleshed potatoes. *J Food Sci.* 1998; 63:458-465.
6. Deighton N, Brennan R, Davies H. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *J Sci Food Agric.* 2000; 80:1307-1313.
7. Avilan L, Leal F, Bautista D. Manual de fruticultura. Caracas, Editorial América, 1989: 1123 p.
8. AOAC. Official Methods of Analysis. Ass. Agric. Chem. 15 th. Washington, D.C. 1990.
9. Díaz L, Ureta F, Ruiz M. Estudio sobre los pigmentos antocianínicos y otros compuestos fenólicos en vinos tintos. *Alimentos.* 1985; 10:13-18.
10. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1337. Método para el recuento de hongos y levaduras. 1978: 6 p.
11. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 902. Método para el recuento de microorganismos aeróbicos en placa de petri. 1978: 5 p.
12. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1104. Determinación del número más probable de coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli*. 1984: 21 p.
13. Fundación Centro de Investigación del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE). Evaluación Sensorial de los Alimentos. Serie Manuales No. 2, Segunda edición. CIEPE, San Felipe. 1984.
14. SAS. SAS User's Guide: Statistics. Cary, N.C.: SAS Institute. 1990.
15. De Campos H. Estadística Experimental No-paramétrica. Universidad de Sao Paulo, Piracicaba. 1983: pp 234-249.

16. García-Viguera C, Zafrilla P, Artés F, Romero F. Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam. *J Sci Food Agric.* 1998; 78: 65-573.
17. Torre L, Barritt B. Quantitative evaluation of *Rubus* fruit anthocyanin pigments. *J Food Sci.* 1977; 42:488-490.
18. Baublis A, Spomer A, Berber-Jiménez MD. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *J Food Sci.* 1994; 59:1219-1233.
19. Rommel A, Heatherbell DA, Wrolstad RE. Red raspberry juice and wine: effect of processing and storage on anthocyanin pigment composition, color and appearance. *J Food Sci.* 1990; 55:1011-1017.
20. Zulin, S, Bassa I.A, Gabriel S, Francis FJ. Anthocyanin pigments of sweet potatoes-*Ipomoea batatas*. *J Food Sci.* 1992; 57:755-757.
21. Harborne JB. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem J.* 1958; 70:5-12.
22. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1699 Jugo de naranja pasteurizado. Requisitos. 1981:7 p.

Recibido: 20-06-2001

Aceptado: 21-11-2001