

EVALUACIÓN DE CRIOCONCENTRACIONES SUCESIVAS EN COMPUESTOS SOLUBLES DE MORA (*Rubus glaucus*)

Danilo Andrés Revelo Vargas¹, Jonathan Pérez Barón¹, Juan Miguel Eraso Cano^{1,2}, Nicolás Alejandro Pérez Benavides^{1,3}

1. *Tecnoacademia – Centro Sur Colombiano de Logística Internacional*; 2. *Institución Educativa San Luis Gonzaga, Túquerres, Nariño*; 3. *Institución Educativa El Espino, Sapuyes, Nariño*.

RESUMEN

La mora (*Rubus glaucus*) es una planta frutal andina muy apetecida por sus características sensoriales y nutricionales aportadas por antocianinas totales, polifenoles y ácidos orgánicos; sin embargo, a pesar de que la región de Nariño (Colombia) presenta las condiciones climáticas y agrícolas adecuadas, no se aprovecha al máximo este cultivo por problemas de transformación y conservación diferentes a los tratamientos térmicos que afectan su composición. Por lo cual, se evaluó el proceso de crioconcentración como alternativa de concentración y conservación sin adición de calor. Las moras utilizadas se colectaron en los municipios de interés, posteriormente se sometió al proceso de extracción del zumo y crioconcentración a una temperatura optimizada de -10° C durante cinco ciclos consecutivos de concentración. Como resultado se encontró que la velocidad de congelamiento afecta de forma significativa la transferencia de antocianinas durante la formación de los cristales de hielo, que incrementa hasta 1080% en los cinco ciclos con una reducción superior al 80% del volumen respecto al zumo original; lo cual, en forma conjunta al incremento del contenido de ácido málico superior a 350%, intensificó la presión osmótica y protegió al producto resultante del ataque microbiológico, extendiendo su vida útil a un periodo superior a tres meses.

Palabras Claves: Crioconcentración, cianidina, *Rubus glaucus*.

ABSTRACT

The blackberry (*Rubus glaucus*) is an andean fruit plant desirable for its sensory and nutritional characteristics contributed by total anthocyanins content, polyphenols and organic acids; However, although the region of Nariño (Colombia) presents adequate climatic and agricultural conditions, this crop is not maximized because of transformation and conservation problems with thermal treatments than affects its composition. Therefore, the cryoconcentration process was evaluated as an alternative of concentration and conservation without heat addition. The fruits used were collected in the municipalities of interest, later underwent the process of juice extraction and cryoconcentration at an optimized temperature of -10° C during five consecutive concentration cycles. As a result, it was found that the freezing speed significantly affects anthocyanin transfer during the ice crystals formation, which increases up to 1080% in the five cycles with an 80% reduction in volume compared to the original juice, which in jointly with an increase in the malic acid content higher than 350%, intensified the osmotic pressure and protected the product resulting from the microbiological attack, extending its useful life to a period exceeding three months..

Keywords: Cryoconcentration, cyanidin, *Rubus glaucus*.

1. INTRODUCCIÓN

La mora (*Rubus glaucus*) es una planta originaria de los Andes, y Colombia cuenta con 7.007 hectáreas plantadas, de las cuales 4.922 están en edad productiva con rendimientos promedio de 15 ton/ha, sin

embargo, Nariño sólo alcanza 7 ton/ha [1] debido al bajo nivel de tecnificación y a pocas alternativas de transformación. Por esta razón el Gobierno Nacional ha impulsado su cultivo junto a otras frutas tradicionales de Colombia, tanto en producción, comercialización y mejoramiento de la cadena productiva y la

competitividad [2]; aunque la limitante sigue centrándose en el uso de tratamientos térmicos que afectan significativamente los compuestos de la mora, específicamente el contenido de antocianinas totales y ácidos orgánicos como el ácido málico y ascórbico [3]. Es por esto, que se genera un problema de elección a la hora de procesar la fruta: un tratamiento térmico alarga de la vida útil del producto, pero conlleva una significativa pérdida de los compuestos de interés como polifenoles, ácidos orgánicos y antocianinas [3,6], y si no se aplica ningún tratamiento, el producto no tendrá la vida útil suficiente para ser comercializado, a pesar de tener alta concentración de compuestos funcionales. Es así como surge la alternativa de crioconzentración, que puede aplicarse en equipos de refrigeración o neveras con los que ya cuentan las comunidades en la zona, de modo que se puede reducir el contenido de agua y concentrar antocianinas, ácidos orgánicos y compuestos de sabor y aroma teniendo una mínima pérdida por daño estructural de las moléculas [12].

El principio de esta técnica se basa en que teóricamente, a medida que se congela una solución, se forman cristales de hielo de agua relativamente pura [4], de modo que la materia disuelta se concentra luego en una solución madre que tiene un punto de congelación menor que el del agua pura, haciendo que la crioconzentración sea una tecnología con gran potencial para ahorrar energía y preservar compuestos termolábiles [10, 13]. La crioconzentración contiene pasos de refrigeración, cristalización y separación de estos cristales de hielo de la solución madre concentrada que se enriquece en los sólidos. Sin embargo, para aplicar esta tecnología, las soluciones acuosas deben refrigerarse de manera eficiente y económica, y deben obtenerse cristales de hielo grandes y uniformes, que se separen fácilmente de la solución [5]. Por lo cual, el objetivo del presente trabajo se centró en evaluar las mejores condiciones operativas y de transferencia de masa para obtener un producto estable de mora enriquecido en antocianinas para incentivar el cultivo y la producción de la mora en la región.

2. METODOLOGÍA

2.1. Material biológico

La mora (*Rubus glaucus*) fue colectada en fincas del sector rural del municipio de Túquerres (Nariño, Colombia) y clasificadas según Norma Técnica Colombiana NTC 4106 para determinar las mejores características fisicoquímicas según el nivel de madurez y así poder determinar la condición más adecuada para ser procesada con base en el contenido de antocianinas totales como principal parámetro representativo por cada nivel de madurez en este tipo de frutales [3]. Las frutas seleccionadas fueron higienizadas por lavado con una solución desinfectante de Dextran al 5% (% p/v) para remover la carga microbiológica de campo y separadas del contenido de semillas y fibra para lograr recuperar el máximo contenido de zumo para procesar.

2.2. Determinaciones fisicoquímicas

El contenido de antocianinas monoméricas totales (AMT) se cuantificó mediante el método de pH diferencial [3], empleando longitudes de onda máxima y mínima de 700 nm para la antocianina mayoritaria identificada como Cianidiano 3- glucosido [2, 16, 17] con absorbabilidad molar $\epsilon = 26900/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ y así obtener el contenido de antocianinas totales, según las ecuaciones (1) y (2).

$$\text{Abs} = \frac{[(A_{\text{max}}) - A_{700\text{nm}}](\text{pH } 1.0) - [(A_{\text{max}}) - A_{700\text{nm}}](\text{pH } 4.5)}{(1)}$$

$$\text{AMT} = \frac{(\text{Abs} \cdot \text{PM} \cdot \text{FD} \cdot 1000)}{(\epsilon \cdot l)} \quad (2)$$

Donde:

Abs = Absorbancia resultante

A_{max} = Absorbancia máxima para antocianina mayoritaria

$A_{700\text{nm}}$ = Absorbancia mínima obtenida a 700 nm.

PM = Peso molecular de la antocianina mayoritaria.

FD = Factor de dilución empleado.

ϵ = Absorbididad molar.

l = Grosor del paso de luz sobre la muestra.

AMT = Contenido de Antocianinas monoméricas totales.

Para el caso de la determinación de la absorbancia máxima para la muestra, se efectuó el proceso de barrido espectroscópico

usando un espectrofotómetro Jenway 7305 UV/visible, entre longitudes de onda de 420 nm a 720. Las determinaciones fisicoquímicas se efectuaron para lograr estandarizar el proceso de extracción y producción en cada ciclo de crioconcentración. Para esto se cuantificó el contenido de sólidos solubles mediante el método refractométrico NTC 4624; acidez titulable mediante el método NTC 4623, empleando como ácido predominante el ácido málico; y pH mediante el método potenciométrico NTC 4592 [8].

2.3. Proceso de crioconcentración

La crioconcentración se evaluó en el zumo de mora a una temperatura optimizada de -10°C aprovechando el punto de congelamiento parcial de las muestras y la separación de solutos ocasionada durante el equilibrio entre las fases líquida y sólida, empleando muestras de 250 ml en envases de vidrio transparente de 500 ml en posición inclinada para maximizar el contacto del envase con el líquido, y poder determinar el punto de equilibrio para posterior separación por gravedad. Cada fracción concentrada y colectada se sometió nuevamente al proceso de concentración para proceder con una nueva etapa o ciclo consecutivo hasta llegar a un punto de no diferenciación estadística. En cada ciclo se evaluó y cuantificó el contenido de antocianinas totales como principal variable relacionada a las propiedades de pigmentación, nutricional y antioxidante [9], para determinar la cantidad de ciclos máximos que se pueden aplicar al zumo de la fruta..

2.4. Análisis estadístico

Los datos experimentales del contenido de antocianinas monoméricas totales obtenidos para las frutas en sus diferentes grados de madurez, así como del proceso de crioconcentración en cada ciclo efectuado se analizaron utilizando un diseño estadístico univariable donde las muestras fueron evaluadas por triplicado mediante el análisis de varianza (ANOVA) por comparación de medias empleando la prueba de Duncan con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Para el caso de la posible interacción de los parámetros de sólidos solubles y contenido de antocianinas se aplicó un diseño de

covarianza, ambos diseños empleando el paquete estadístico SAS 9.4 (SAS, 2012).n Drafting (Dassault Systemes-2, 2011).

3. RESULTADOS.

Inicialmente la mora colectada y empleada en este estudio se separó bajo el criterio visual de la Norma Técnica Colombiana 4106, tal como se muestra en la figura 1, de la cual se encontró que el contenido de antocianinas totales es la principal variable que cambia debido al aporte de color que otorga a la fruta entre los diferentes niveles de madurez; diferenciándola de las otras variables como contenido de sólidos solubles y acidez total.



Figura 1. Niveles de madurez definidos para la mora (*Rubus glaucos*) cultivada en Colombia.

El punto de absorbancia máximo para las muestras de mora se encontró en 512 nm por medio del barrido espectrofotométrico ilustrado en la figura 2, debido a la presencia mayoritaria de la antocianina cianidina y la mezcla con la antocianina delphinidina en menor concentración [3, 16].

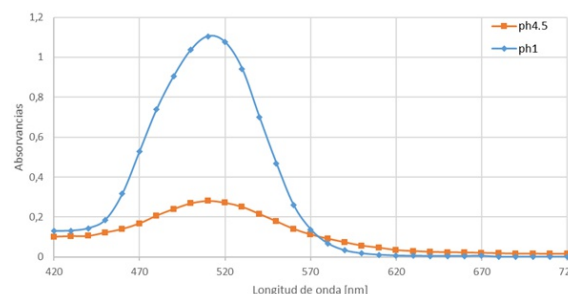


Figura 2. Curva de absorbancia a diferentes longitudes de onda para extractos de mora.

El contenido de antocianinas totales determinado para cada nivel de madurez se muestra en la tabla 1, donde el nivel de diferencia es estadísticamente diferente ($p < 0.01$) entre todas las muestras. Además, a medida que el nivel de madurez y el contenido de antocianinas totales incrementó, se facilitó la obtención del zumo de fruta debido al ablandamiento de los tejidos

fibrosos de la fruta. Por lo cual se optó por seleccionar los frutos en Nivel 6 de madurez para la extracción del zumo de mora y posterior crioconcentraciones.

MADUREZ	ANTOCIANINAS	Incremento
#	mg cianidina/100 fruta	%
1	0,075	0,00
2	3,501	45,59
3	26,786	355,52
4	42,638	566,51
5	54,151	719,76
6	63,621	845,81

Tabla 1. Niveles de madurez definidos para la mora (*Rubus glaucos*) cultivada en Colombia.

En el proceso de crioconcentración se encontró que la velocidad de congelamiento afecta de forma significativa la transferencia de antocianinas durante la formación de los cristales de hielo y su correspondiente separación; en donde se obtuvo que la concentración ciclo a ciclo de las antocianinas totales incrementó en mayor proporción a una temperatura de almacenamiento -10°C en un 215% en el primer ciclo, 108% en el segundo ciclo, 39% en el tercer ciclo, 23% en el cuarto ciclo y 5% en el quinto ciclo de crioconcentración; temperatura en la cual además se logró preservar y concentrar las características de sabor y aroma procedentes de la fruta debido a la preservación de compuestos volátiles y termolábiles. Además, se observó que el incremento parcial del contenido de antocianinas totales entre cada ciclo de crioconcentración va reduciendo significativamente como se nombró anteriormente; esto debido a que en los ciclos iniciales existe una mayor proporción de agua libre para iniciar la formación de cristales de hielo con una baja concentración de sólidos solubles, y a medida que el contenido de agua se reduce, se incrementa la concentración e interacción de los sólidos solubles que interfieren con la formación de cristales de agua [12], lo cual reduce la cantidad de hielo formado con bajo contenido de sólidos solubles. Sin embargo, cuando se realiza la cuantificación del contenido de antocianinas totales de forma acumulativa respecto al contenido de antocianinas presente en la fruta se observó que, si existe un incremento sustancial de esta variable, tal como se observa en la figura 3.

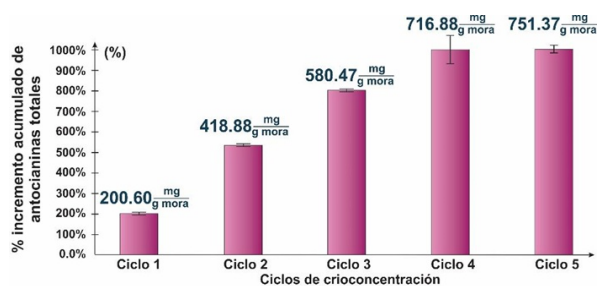


Figura 4. Micro-Servomotor utilizado GS9018. Fuente. GDTECK COMPANY.

Así mismo, se observó que existe una alta remoción de los cristales de agua que incrementan significativamente el contenido de antocianinas en los primeros cuatro ciclos de concentración ($p < 0,05$), hasta llegar a un contenido de 716.88 mg cianidina/g mora (1026.8% de concentración) con una reducción de hasta un 80% del volumen original de la muestra; sin embargo, para el quinto ciclo de concentración no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre muestras ($p > 0.05$), debido al bajo contenido de agua remanente en relación al contenido de sólidos, obteniéndose una concentración de 751.37 mg cianidina/ g mora (1081% de concentración), razón por lo cual se optó como límite de proceso un máximo de cuatro ciclos consecutivos aplicados a una sola muestra; aunque a nivel industrial que se ha probado la combinación con el centrifugación como tecnología combinada para mantener el contenido de sólidos extraídos en varios ciclos de crioconcentración [11], que facilitaría el proceso de separación y extracción a un nivel superior de concentración final, pero se tendría la dificultad en el proceso de implementación en campo en futuras etapas de aplicación.

En cuanto al resto de los parámetros fisicoquímicos se encontró que las variaciones en el contenido de sólidos solubles fue ocasionado por el incremento de antocianinas totales y no necesariamente por la transferencia de azúcares desde la muestra inicial (8.10 Brix) hasta el contenido de concentrado final (23.5° Brix) debido a la alta covarianza presente entre estas dos variables ($p < 0.001$), razón por la cual no se tomó el contenido de sólidos solubles totales como un parámetro determinante en la decisión de la cantidad de ciclos máximos que se puede aplicar, pero puede servir como

un parámetro indirecto en la decisión de uso si el proceso se aplica en campo. Mientras que para el caso del contenido de acidez total se obtuvo un incremento relativo de hasta el 350% respecto al contenido de acidez inicial de las muestras de 2.5% ácido málico; lo cual demuestra que este tipo de proceso puede aplicarse también para concentrar compuestos químicos que aportan la característica sensorial de acidez al producto final.

Una vez terminado el proceso de crioconcentración se observó que las muestras concernientes al cuarto y quinto ciclo lograron tener una alta estabilidad microbiológica y no presentaron problemas de fermentación o degradación en sus características sensoriales durante un periodo máximo de almacenamiento de tres meses a pesar de no realizarse un proceso de pasteurización durante ninguna de las etapas de la investigación. Este fenómeno puede atribuirse a la alta presión osmótica que ejerció el incremento de solutos en combinación con el incremento de los ácidos orgánicos de la fruta que actúan como conservantes naturales [3].

4. CONCLUSIONES

El proceso de crioconcentración efectuado a una temperatura de -10°C permitió obtener un protocolo de concentración y conservación de los compuestos de mora, enriquecido en antocianinas, compuestos de sabor y aroma, que puede fácilmente aplicarse hasta en cuatro ciclos consecutivos con un incremento de hasta 716.88 mg de cianidina / g mora y una remoción cercana al 80% del volumen inicial, para generar un nuevo producto con una mejor vida útil, un bajo costo de producción y una reducción significativa de su volumen para almacenar y/o comercializar.

5. REFERENCIAS

[1] Minagricultura (2010). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Database. < http://www.minagricultura.gov.co/06docypresent/06_agenda_inves.aspx.> (Consultado en junio, 2017).
[2] Consejo Nacional de Política Económica y Social República de Colombia

Departamento Nacional de Planeación – CONPES 3514. Política nacional fitosanitaria y de inocuidad para las cadenas de frutas y de otros vegetales. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2008
[3] Rawson A., Patras A., Tiwari B. K., Noci F., Koutchma T., Brunton N. 2011. Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*. 44: 1875–1887
[4] Deshpande, S. S., Cheryan, M., Sathe, S. K., & Salunkhe, D. K. 1984. Freeze concentration of fruit juices. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 20 (3): 173–248.
[5] Hernández E., Raventós M., Auleda J. M., Ibarz A. 2010. Freeze concentration of must in a pilot plant falling film cryoconcentrator. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11: 130–136
[6] Hurtado N., Morales A., González L., Escudero L., Heredia F. 2009. Colour, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutinosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry* 117: 88–93
[7] Icontec-Instituto Colombiano De Normas Técnicas. NTC 4106. Frutas frescas. Mora de castilla. Especificaciones. Bogotá, D.C. 1997.
[8] Icontec-Instituto Colombiano De Normas Técnicas. NTC 4592, Productos de frutos y verduras. Determinación del pH; NTC 4623, Productos de frutos y verduras. Determinación de la acidez titulable; NTC 4624, Jugos de frutas y hortalizas. Determinación del contenido de Sólidos Solubles. Método refractométrico. Bogotá D.C. ICONTC. 1999.
[9] Kong J. M., Chia L. S., Goh N. K., Chia T. F., Brouillard R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 64: 923–933
[10] Kyuya Nakagawa, Hiroyuki Nagahama, Shohei Maebashi, Koji Maeda. 2010. Usefulness of solute elution from frozen matrix for freeze-concentration technique. *Chemical engineering research and design*. 88: 718–724
[11] Luo C. S., Chen W. W., Han W. F. 2010. Experimental study on factors affecting the quality of ice crystal during the freezing concentration for the brackish water. *Desalination*. 260: 231–238

- [12] Aider M. & Halleux D. 2009. Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. *LWT - Food Science and Technology*. 42: 679–685
- [13] Moreno F. L., Raventós M., Hernández E., Ruiz Y. Block freeze-concentration of coffee extract: Effect of freezing and thawing stages on solute recovery and bioactive compounds. *Journal of Food Engineering*. 120: 158–166
- [14] Castañeda A., Pacheco M. L., Páez M. E., Rodríguez J. A., Galán C. A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113 (4) 859–871
- [15] Tiwari B. K., O'Donnell C. P., Cullen P. J. 2009. Effect of non-thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science & Technology*. 20: 137–145
- [16] Villacrez, J. L., Carriazo, J. G., and Osorio, C. 2014. Microencapsulation of Andes berry (*Rubus glaucus*) aqueous extract by spray drying. *Food and Bioprocess Technology*. 7 (5): 1445-1456
- [17] Wrolstad R. E., Giusti M. M. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*. 1: 34: 217–225.