Química de los Alimentos 122 (2010) 980-986

Composición química, antocianinas, compuestos fenólicos no antocianínicos y actividad antioxidante del arándano silvestre (*Vaccinium meridionale* Swartz) de Colombia.

G.A. Garzón[[1]](#footnote-2)a[[2]](#footnote-3)\*, C.E.$Narvaez^{a}$, K.M. $Riedl^{b}$, S.J. Schwartz[[3]](#footnote-4)b

**Resumen:** los arándanos del *Vaccinium meridionale* Swartznativos de colombia (en adelante mortiño), fueron analizados para hallar su composición química, contenido fenólico total, contenido de antocianinas, y actividad antioxidante. Adicionalmente, fueron usadas cromatografía líquida de alto rendimiento con detección de matriz de fotodiodos (HPLC-DAD—CLAR-DMF) y cromatografía de alto rendimiento o CLAR con ionización electrónica de rocío trabajando al tiempo con espectrometría de masa (ESI-MS/MS) para determinar la composición de antocianinas y la composición fenólica. El contenido de antocianinas fue de 329,0$\pm 28,0mg$ de Cianidina 3-glucosido equivalentes/100 g (Peso Fresco) PF y el contenido fenólico total fue 758.6 $\pm 62.3mg$ de ácido gálico equivalente/100 g PF. La Cianidina 3-galactósido fue la mayor antocianina, mientras que el principal componente fenólico no-antocianinico fue el ácido clorogénico.

La actividad de barrido del radical ABTS[[4]](#footnote-5) fue de 45,5$\pm 2,3μmol$ Equivalentes Trolox[[5]](#footnote-6)/g PF y el valor del potencial antioxidante de reducción férrica (PARF o FRAP en inglés) fue 87,0 $\pm 17,8μmol$ ET[[6]](#footnote-7)/g PF o 116,0$\pm 23,7μmol$ de hierro férrico reducido/g PF.

La composición de antocianina, única en ésta fruta, tal como se identifica por las técnicas clásicas y por ESI-MS/MS, se puede diferenciar de la de otros arándanos y quizás ser útil en procesos de autenticación[[7]](#footnote-8). En general, los resultados de este estudio muestran que el mortiño tiene una alta actividad antioxidante y aplicaciones potenciales como fuente de fitoquímicos en el mercado de alimentos nutracéuticos y funcionales[[8]](#footnote-9).

**1. Introducción**

Hay una fuerte evidencia científica sobre los efectos positivos de la ingesta en la dieta de frutas de bayas para la salud humana, el rendimiento físico e intelectual y la superación de las afecciones de salud. Entre las bayas, los arándanos (*Vaccinium myrtillus l.*) han recibido una atención especial debido a su larga historia en las aplicaciones de la medicina popular. El fruto se hizo ampliamente conocido por los herbolarios en el siglo XVI, cuando fue utilizado para el tratamiento de cálculos en la vejiga, trastornos biliares, escorbuto, tos y tuberculosis pulmonar (Valentová, Ulrichová, Cvak, & Simánek, 2007). Más tarde, los ensayos clínicos demostraron los beneficios de arándanos en la inhibición del crecimiento de células de cáncer (Zhao, Giusti, Malik, Moyer, y Magnuson, 2004) y el tratamiento de trastornos visuales (Canter & Ernst, 2004). Bao et al. (2008) reportaron que el consumo de arándano desencadena la señalización genética en la prevención de enfermedades y promueve la salud humana debido a las actividades biomédicas en condiciones como trastornos cardiovasculares, estrés oxidativo inducido por edades avanzadas, respuestas inflamatorias, y diversas enfermedades degenerativas.

La investigación fitoquímica de los extractos de arándano también ha mostrado que éstos previenen o controlan la formación de líquido intersticial, contribuyendo al control de la distribución del flujo sanguíneo en el trabajo en red microvascular, modulando la permeabilidad y la resistencia capilar, y mejorando la función visual (Morazzoni y Bombardelli, 1996). Adicionalmente, Martín-Aragón, Basabé, Benedi, & Villar (1998) y Valentová y otros (2007) reportaron actividad antioxidativa y efectos citoprotectores contra el daño oxidativo en varios modelos in vitro.

El mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz*)* es un arbusto silvestre de los andes de sur américa, que crece en las laderas de las montañas abiertas entre 2200 y 3400 metros sobre el nivel del mar. El fruto es una baya de diámetro entre 5-10 mm, rojizo oscura, con carácter ácido y agrio. En Colombia, el arándano silvestre o mortiño, se vende en los mercados locales y se come fresco, seco y cocinado en salsas, jaleas y mermeladas.

Aunque han sido ampliamente investigadas la composición de antocianina y fenólica así como la actividad antioxidante de los arándanos de Europa y América del norte (Mazza y Miniati, 1993; Moyer, Hummer, Finn, Frei, y Wrolsad, 2002; Prior y otros, 1998), no hay informes que documenten la composición, perfil de antocianinas, perfil fenólico o actividad antioxidante del arándano colombiano, mortiño.

Éste es el interés para caracterizar las especies silvestres *Vaccinium* que crecen en Colombia, teniendo en cuenta la información de apoyo sobre el potencial de las propiedades nutracéuticas del arándano. Por consiguiente, los objetivos de este estudio fueron determinar la composición química, contenido total de antocianinas y componentes fenólicos, el perfil de antocianinas, el perfíl fenólico de no-antocianinas, y la actividad antioxidante de arándano de los andes (*V. meridionale*) y compararlos con las composiciones reportadas para otras bien caracterizadas especies de *Vaccinium*, especialmente (*V. myrtillus* L.).

**2. Materiales y métodos**

*2.1 Material Vegetal*

Bayas frescas y maduras de *V. meridionale* fueron cosechadas en Colombia en el hábitat natural de la especie. El mortiño fue recogido al azar de diferentes partes de arbustos silvestres no administrados, ubicados en las inclinaciones montañosas a una altitud de entre 2800 y 3000m sobre el nivel del mar.

*2.2 Reactivos y Patrones*

Se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania) Reactivos de rutina y Folinciocaleau, el ácido clorogénico (3-ácido cafeoiloquínico), quercetina, ácido cafeico, ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiaoline-6-ácido sulfónico), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), carbonato de sodio, persulfato de potasio. De Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) se obtuvieron el ácido gálico, 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) sal de diamonio (ABTS) y TPTZ (2,4,6-tripyr-Idyl-S-triazina). De Fisher Scientific Co (Fair Lawn, Nueva Jersey, EE.UU.), fueron obtenidos L-ácido ascórbico, DTT (1,4-ditiotreitol) y $FeCl\_{3}6H\_{2}O$. El metanol y los líquidos fueron comprados en Fisher Scientific. (Fair Lawn, Nueva Jersey, USA.). Se adquirieron de Indofine Chemical Co., Inc. (Somerville, Nueva Jersey, EE.UU) Cianidina 3-glucósido, cianidina 3-galactósido y cianidina 3 arabinósido. El jugo de uva Concord (Welch Foods Inc., Concord, MA, EE.UU.) se adquirió de un supermercado local.

*2.3 Determinación de la Acidez Varolable (AV), el pH y Brix[[9]](#footnote-10).*

Las muestras de mortiño fueron seleccionadas de acuerdo con el color y homogeneizadas en un mortero para la determinación de la acidez valorable, el pH y el contenido total de sólidos solubles (TSS). La acidez valorable se determinó triturando la muestra (2 g del homogeneizado + 50ml de agua destilada excenta de $CO\_{2}$), normalizándola con 0.1 N NaOH para lograr un pH de 8.2 usando un medidor de pH Schott Gerate modelo CG820 (Mainz, Alemania). La Acidez Valorable fue expresada en términos de ácido cítrico en gramos por 100 g de fruta. La medida del pH se realizó con 2 g del preparado homogéneo y el contenido TSS Brix fue determinado usando un refractómero digital Abbe II (Reichert-Jung, Leica Inc., Buffalo, NY, USA) en el sobrenadante, después de centrifugación de 4000g del preparado homogéneo. Las mediciones se repitieron cuatro veces.

*2.4 Análisis del ácido ascórbico.*

Para la determinación del contenido de ácido ascórbico, 10 g de la muestra de la fruta fueron procesados en una licuadora con 8 ml de agua desionizada. Después de la centrifugación de 1500 g de muestra a 4 grados centrígrados por 10 minutos, el extracto fue recogido y su pH ajustado a entre 5-5.2 con 0.1 M NaOH[[10]](#footnote-11). El ácido ascorbico se mantuvo en forma reducida mediante la adición de 0.1% de 1,4-ditiotreitol (DTT). Después de 2 h de reacción con DTT, se filtró la muestra a través de un filtro con miliporo de 0.45 µm (tipo HA) y se analizó por HPLC[[11]](#footnote-12).

El análisis de ácido ascórbico total por HPLC, se llevó a cabo usando un Shimadzu LC-20AD/THPLC equipado con detector SPD-6AUV (Kyoto, Japón) y una columna LiChrosorb RP 18 $\left(5μm\right)250×4.6mm$(E. Merck Inc. Darmstadt, Germany). La fase móbil consistió de 2% de $KH\_{2}PO\_{4}$, pH 2,5 con 0.1% DTT y las condiciones de funcionamiento fueron: programa isocrático por 15 minutos, elución a 0.5 ml/min, inyección de un volumen de $20μl$ con detección a 254nm.

Para la cuantificación del ácido ascorbico en las muestras, fue desarrollada una curva patrón del ácido ascorbico (10-50 ppm[[12]](#footnote-13)). El análisis de la regresión lineal se aplicó para determinar la concentración de ácido ascorbico en el extracto.

*2.5 Extracción de antocianinas y fenoles no-antocianinicos*

El mortiño fresco fue pulverizado en una licuadora de seguridad con nitrógeno líquido y congelado a $−70℃$ hasta su posterior análisis. El polvo se extrajo con metanol al 100%, seguido de tres reextracciones con el mismo solvente hasta que la solución se volvió incolora. El metanol se evaporó con un Rotavapor Buchi a 40°C y el extracto se resolubilizó en una solución acuosa de metanol al 50% para los análisis subsecuentes.

*2.6 Determinación del contenido de antocianinas monoméricas y fenólico total*

El contenido del pigmento de antocianinas monomérico fue determinado en el extracto con el método de pH diferencial como ha sido descrito por Giusti y Wrolstad (2001). Las absorbencias fueron leídas a 510 y 700 nm. Para propósitos de comparación, el contenido de pigmentos se calculó como cianidina 3-glucoside usando un coeficiente de extinción $\left(ϵ\right)$de 26900L $cm^{−1}mol^{−1}$ y peso molecular de 449.2. Las mediciones fueron repetidas cuatro veces, mismas que han sido reportadas.

Los fenoles totales fueron determinados como equivalentes de ácido gálico (EAG)/100g PF usando el método descrito por Waterhouse (2001). Una muestra alícuota de 20-$μl$ del extracto o patrón de ácido gálico (50-500mg/L) se mezcló con 1.58 ml de agua seguida por 100 $μl$ de reagente Folin-Ciocalteau's. Después de centrifugar e incubar a temperatura ambiente durante 8 minutos, se adicionaron 300 $μl$ de 20% de solución acuosa de carbonato de sodio. Las muestras fueron centrifucadas y retenidas a temperatura ambiente por 2 horas. La absorbancia de la solución coloreada azul fue grabada a 765nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-visible, modelo UV 160 U (Kyoto, Japan), usando 1-cm de células desechables. Todas las mediciones fueron repetidas cuatro veces.

*2.7 La hidrólisis ácida de antocianinas y su extracción en fase sólida (EFS)*

Para la determinación de antocianidinas, la hidrólisis ácida de antocianinas se realizó de acuerdo al método descrito por Durst y Wrolstad (2001). Se mezcló aproximadamente 1mg del pigmento con 15 ml de 2M HCl en un tubo de ensayo con tapa de rosca. La mezcla se lavó abundantemente con nitrógeno, se tapó e hidrolizó por 45 min a 100°C, luego se enfrió mediante un baño de hielo.

La limpieza del hidrolizado que contiene las antocianidinas fue realizada con un cartucho C-18 (tubo de alta carga C-18), con una capacidad de 20 ml (Akktecg Assicuatuibm Ubc,m Deerfield, IL, USA). La minicolumna se acondicionó con metanol y al cargar con el extracto, se lavó con 0.01% de HCl para eliminar azúcares, ácidos y otros compuestos solubles en agua. Las antocianidinas fueron separadas posteriormente con metanol acidificado, el cual fue removido de la fracción con el rotoevaporador a 40°C.

*2.8 Determinación de Antocianidinas, antocianinas y fenólica no-antocianina por HPLC-DAD*

El análisis de antocianidinas, antocianinas y otros compuestos fenólicos mediente cromatografía líquida de alto rendimiento con detección de matriz de fotodiodos, se llevó a cabo en un módulo de separación de HPLC (Waters Corporation, Midford, MA, USA) equipado con un autoinyector y un detector de matriz de 996 fotodiodos (DMF o PDA en inglés). Las separaciones cromatográficas se realizaron en dos columnas Symmetry C18, conectadas en serie (cada una de $75×46mmi.d.,3.5μm$) (Waters Corporation, Mildford, MA, USA). La fase móbil consistió en 5% (v/v) de ácido fórmico en agua (solvente A) y 5% (v/v) de ácido fórmico en acetonitrilo (solvente B), a una velocidad de flujo de 1.0 ml/min. La condición del gradiente fue 0-20 min 20% B y 20-30 min 20-58%B. El espectro de Absorbancia se grabó cada 1.2 nm desde 200 a 700 nm.

Los tiempos de retención y el espectro UV-Vis de las antocianidinas fueron comparados con los estándares conocidos. El jugo de uvas de Concord fue usado como fuente de las antocianidinas: cianidina, delfinidina, petunidina, peonidina y malvidina, mientras que el jugo de fresa fue usado como fuente de pelargonidina (Durst & Wrolstad, 2001). La técnica de co-cromatografía se usó cuando fue necesaria para identificación.

La identificación de los picos de antocianinas basadas en cianidina, se realizó comparando los tiempos de retención y las características espectrales de matriz de diodos con los patrones existentes. Debido a la falta de patrones para la delfinidina, las antocianinas delfinidinas sólo se identificaron tentativamente por un análisis adicionales de HPLC-ESI/MS-MS. Todos los análisis se realizaron en triplicado.

Los componentes fenólicos no-antocianinas se identificaron por su espectro UV-Vis, espectro MS/MS y comparaciones del tiempo de retención cromatográfica (cuando esté disponible) y con la literatura. El ácido clorogénico se adoptó como el patrón para la identificación y cuantificación de ácidos hidroxicinámicos a 320 nm, mientras que la rutina se usó como el estándar para la identificación y cuantificación de flavonoles a 355nm. Los resultados se expresan en términos de mg/g PF.

*2.9 HPLC-DAD/MS/MS de antocianinas y componentes polifenolicos*

La separación de los compuestos se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. La detección se realizó usando un espectrómetro de masas de polo cuádruple/ tiempo de vuelo (Qtof Premier, Micromass Limited, Manchester, UK) equipado con una fuente de ionización por electrorocío (ESI o en español IER) operada en ambos modos de la polaridad, tanto positivo, como negativo. Las condiciones de ESI incluyeron un voltaje de capilaridad de 3.2 kV para el modo positivo, 2.8 kV para el negativo, voltaje del cono de 35 V, la guía de iones a 1V, la fuente de temperatura de 100°C, y la temperatura del gas de desolvatación de nitrógeno de 400°C que fluye a 600L/h. Durante los experimentos se emplea la técnicas de disociación inducida por colisión (CID o en español DIC), reteniendo argón a una presión de $3.0×10^{−3}$mbar.

Para la pantalla de relaciones potenciales de iónicas $primaria>hija$, se llevaron a cabo dos recorridos TOF-MS, en ionización por electrorocío (IER o en inglés ESI) en modo positivo y negativo, respectivamente. Dentro de cada recorrido, dos funciones se ejecutan simultáneamente. Al principio, una baja energía de colisión (CE) se aplicó para permitir la transmisión iónica primaria intacta, mientras que en la segunda vuelta se aplicó alta energía de colisión para proporcionar datos de fragmentación. Para un pico DMF[[13]](#footnote-14) (PDA en inglés) dado (320,355,512nm), el espectro por espectroscopía de masas (EM o en inglés MS) coincidente, fue inspeccionado para primaria e hija iónica posibles. Las presuntas componentes iónicas primaria/hija se extrajeron para arrojar los cromatogramas por espectroscopía de masas. Si coincidía el pico de (EM o MS) con el pico de DMF, se infería el partido, es decir, si correspondía a primaria o hija. Posteriormente, se realizó EM (ME/ME) para confirmar esa relación del modo adecuado (positivo o negativo).

*2.10 Determinación de la actividad antioxidantes*

La actividad antioxidante se determinó por ensayos ABTS y FRAP. La actividad captadora del radical catión ABTS se determinó de acuerdo al método descrito por Re y otros (1999). El $\begin{array}{c}\\\begin{array}{c}ABTS^{+}\end{array}\end{array}$ fue producido por la mezcla de una solución madre de ABTS (7mL en agua) con 2.45 mM de persulfato de potasio (concentración final). La solución se preparó a temperatura ambiente en la obscuridad por 16 h después de usada. Una vez que el radical se formó, la absorbancia a 734 nm se ajustó a 0.7 mediante dilución con etanol al 95%. Se preparó solución de $\begin{array}{c}\\\begin{array}{c}ABTS^{+}\end{array}\end{array}$ fresco para cada análisis. Se adicionó $\begin{array}{c}\\\begin{array}{c}ABTS^{+}\end{array}\end{array}$ (1 ml) a $10μl$ de la muestra y la mezcla de reacción se dejó en reposo a 30°C por 6 min y fue grabada inmediatamente la absorbancia a 734 nm. El porcentaje de disminución de la absorbancia a 734 nm se calculó con la fórmula $I=\left[{\left(AB−AA\right)}/{AB}\right]×100$; donde, $\begin{array}{c}\\\begin{array}{c}I=inhibiciónABTS^{+}\end{array}\end{array}$; $AB=absorbanciadelamuestrapatrón$(T=0 min); AA= absorbancia de la solución de extracto analizada al final de la reacción.

Las curvas de calibración usando Trolox (0-0.25 mM) se llevaron a cabo en cada uno de los conjuntos de extractos. La reacción de las muestras se siguió hasta que alcanzaron la meseta. Los valores ABTS se expresaron como $μmol$de equivalentes de Trolox/g PF.

El ensayo de potencial antioxidante de reducción férrica se realizó de acuerdo a Benzie y Strain (1999). El reactivo de PARF[[14]](#footnote-15) fue preparado mediante la mezcla de 2.5 ml de solución de TPTZ[[15]](#footnote-16) (10nM en 40mM HCl), 25 ml del buffer de acetato (300mM, pH 3.6), y 2.5 ml de solución de $FeCl\_{3}6H\_{2}O$(20mM). Después de incubar durante 4 minutos a una temperatura de 37°C, el reactivo se usó como patrón para determinar la absorbancia a 593 nm. La solución FRAP (900 $μL$) se añadió a 90 $μl$de agua destilada y 30$μl$de patrones o extractos. La reacción de las muestras se siguió hasta que alcanzó la meseta. Los resultados finales se expresaron como l mol de hierro férrico reducido / 100 g de PF. Todas las mediciones se repitieron cuatro veces.

**3. Análisis estadístico**

Los datos cuantitativos se presentan como valores medios con la desviación estándar correspondiente.

**4. Resultados y Discusión**

4.1 A*cidez valorable, pH, Brix[[16]](#footnote-17)*

El pH promedio de las frutas de *V. meridionale* fue 2.85$\pm 0.16$mientras que la acidez valorable fue de 1.35 $\pm 0.20$. El valor de la acidez valorable está cerca al de una de *V. myrtillus* (1.52) encontrado por Prior et al. (1998).

El contenido total de sólidos solubles (TSS) fue 7.00 $\pm 0.01$. Éste valor se ajusta a uno reportado del Ecuador (7.00) por Vasco, Riihinen, Ruales, y Kamal-Eldin (2009) y es menor que el valor para *V. myrtillus* (10.00) (Prior y otros, 1998). La alta acidez valorable del *V. meridionale* junto a su bajo contenido total de sólidos solubles, parece ser la explicación a la baja relación azúcar/ácido (5,27 ± 0,70) de ésta fruta, que es menor que el de uno de los *V. floribundum* (9.00 mg/100g PF) como fue reportado por Vasco y otros (2009).

El contenido de ácido ascórbico del *V. meridionale* fue 8.10$\pm 1.50$mg/100g (PF). Este contenido es ocho veces mayor que el reportado por Prior y otros (1998) para el *V. myrtillus* (1.30), pero se encuentra en el rango de algunos cultivados como el *Vaccinium corymbosum* y *Vaccinium ashei* (6.20-14.60 mg/100g) reportados por el mismo autor y cercanos al contenido en *V. floribundum* (9.00 mg/100g PF) como reportó Vasco y otros (2009).

4.2 *Contenido total de antocianinas y fenólico total*

El contenido de antocianina monomérica total en los arándanos colombianos (mortiño) fue 329 ± 28 mg cianidina 3-glucósido / 100 g de peso fresco. Este valor están dentro del intervalo (300 a 698mg/100g) reportado para el *V. myrtillus* nativo de partes de Europa y regiones del norte de Asia (Mazza & Miniati, 1993), comparable con la concentración de antocianina (300 mg / 100 g) encontrado por Prior et al. (1998) para el arándano del norte de Estados Unidos y por Vasco et al. (2009) para la forma *V. floribundum* Ecuador (345 mg / 100 g).

El *V. meridionale* posee un contenido fenólico total de 758,6 ± 62,3 mg EAG[[17]](#footnote-18) / 100 g PF, el cual es menor que uno de los *V. floribundum* del ecuador (882mg GAE/100mg PF) (Vasco et al. 2009) y más alto comparado con una de las otras especies *Vaccinium*. Prior y otros (1998) reportaron 525 mg EAG/100g PF para el *V. myrtillus* de Norte América y un rango entre 190 y 473 mg EAG/100g PF para varias cultivadas como *V. corymbosum, V. ashei* y *Vaccinium angustiofolium.*

Se ha reportado que los fenoles vegetales muestran una variación cualitativa y cuantitativa a diferentes niveles genéticos (entre y en especies y clones) (Hakulinen, Julkunen-Titto, & Tahvanainen, 1995) y entre diferentes estados fisiológicos y de desarrollo (Kause y otros, 1999). Los fenoles también varían en respuesta a factores ambientales, como la intensidad lumínica y la disponibilidad de nutrientes (Herms & Mattson, 1992 y referencias en ella). Todos estos factores pueden contribuir a las diferencias en el contenido de antocianinas y fenoles entre *V. meridionale* y otras especies de *Vaccinium* estudiadas previamente.

4.3 *Identificación y cuantificación de antocianidinas, antocianinas y no-antocianinas fenólicas*

La hidrólisis ácida reveló la presencia de dos antocianidinas, cuya identidad se confirmó mediante la comparación de los tiempos de retención de datos UV/Vis con uva de Concord y antociaanidinas de fresa. Las uvas de Concord contienen cinco de las seis antocianidinas más comunes, mientras que la fresa contiene la restante, la cual es llamada pelargonidin (Durst & Wrolstad, 2001). Al comparar el perfil de HPLC y los espectros de las angliconas de la uva, las fresas y *V. meridionale*, hubo coincidencia en tiempos de retención y$λ\_{max}$para cianidina, y delfinidina. Además, el aumento de antocianinas del extracto de mortiño con el de la uva de Concord resultó en coelución. La cianidina representa el 85% de área total del pico.

La Fig. 1 y la Tabla 1, muestran que se encontraron cinco antocianinas. La información estructural se obtuvo de datos espectroscópicos para las antocianinas. El ${E\_{440}}/{E}λ\_{max}$calculado para cada antocianina osciló del 29.7% al 31.6%. Éstos valores son típicos de un enlace glicosídico en la posición C-3 de la antocianidina (Hong y Wrolstad, 1990). La baja absorbancia observada a 310-320 nm para todos los picos indicó que las antocianinas no fueron aciladas con ácidos aromáticos hidroxilados (Hong y Wrolstad, 1990). Los picos, 1, 2, 3 y 5 representaron el 99% de la superficie total, mientras que el pico 4 representó el 1%. Las antocianinas basadas en cianidinas representaron el 77% del contenido total de antocianinas, que es menor que el contenido encontrado en *V. floribundum* del Ecuador (88% del contenido total de antocianinas) (Vasco y otros, 2009). Una comparación de los tiempos de retención y los datos UV/Vis con patrones conocidos, reveló la presencia de cianidina 3-galactósido como la principal antocianina, representando el 43% del área total del pico, mientras que también se encontraron cianidina 3-glucoside y cianidina 3-arabinoside; los picos restantes fueron de antocianinas basadas en definidinas, de acuerdo a datos UV/Vis y MS/MS.

Los datos del espectro de masas de las antocianinas en el mortiño o arándano colombiano (Tabla 1) mostraron que el pico 1 reveló un ión molecular en el m/z 465 y un fragmento mayor en el m/z 303, indicando que se trata de un derivado de la delfinidina. La pérdida neutral de 162 unidades de masa corresponde a una molécula de hexosa. Como resultado, el pico 1 fué identificado tentativamente como delfinidina 3-hexoside.

Los picos 2 y 4 revelaron un ion molecular a m/z 449 y un fragmento iónico en el m/z 287 producido por la pérdida de una unidad de hexosa. Ésto, junto a patrones auténticos, confirma la identificación mediante HPLC-DAD de esos picos como cianidina 3-galactosido y cianidina 3-glucosido, respectivamente.

Los picos 3 y 5 son producto de iones moleculares en el m/z 435 y 419 y mayores fragmentos en el m/z 303 y 287, los cuales corresponden a las antocianidinas delfinidina y cianidina, respectivamente, después de la pérdida del pentoside. El patrón de fragmentación, el tiempo de retención y el espectro UV-Vis del pico 5, igualaron el estándar de la cianidina 3-arabinósido. En consecuencia, el pico 3 se identificó tentativamente como una delfinidina 3-pentoside y el pico 5 fue alineado como cianidina 3-arabinósido. Encontramos que coinciden los patrones de fragmentación de antocianinas de iones moleculares con los de los estudios previos realizados para los arándanos de los Andes (Vasco y otros, 2009). Sin embargo, estos autores informaron la presencia de agliconas de delfinidina y cianidina, que podrían estar presentes debido a la hidrólisis de la aglicona dadas las condiciones de alta acidez que se utilizaron para la extracción de antocianidinas.



**Fig. 1.** Perfil por cromatografía líquida de alto rendimiento de antocianinas en los arándanos colombianos (*V. meridionale)*-mortiño detectadas a 512 nm. (1) Delphinidina 3-hexoside; (2) cianidina 3-galactósido; (3) delfinidina 3-pentosido; (4) cianidina 3-glucósido; (5) cianidina 3-arabinósido.

|  |
| --- |
| **Tabla 1** |
| Características cromatográficas y espectroscópicas de las antocianinas detectadas en *V. meridionale* Swartz |
|  Número del pico | Área del pico (%) HPLC-DAD | Máximo | Tiempo de Retención (min) | Ion Molecular $\begin{array}{c}\\\begin{array}{c}M^{+}\end{array}\end{array}$m/z | Fragmentos iónicos en MS/MS m/z | Asignación tentativa del pico |
| 1 | 12 | 523 | 11.5 | 465 | 303 | Delfidina 3-hexoside |
| 2 | 43 | 518 | 12.8 | 449 | 287 | Cianidina 3-galactósido |
| 3 | 11 | 525 | 13.0 | 435 | 303 | Delfinidina 3-pentoside |
| 4 | 1 | 512 | 13.6 | 449 | 287 | Cianidina 3-glucosido |
| 5 | 33 | 518 | 14.3 | 419 | 287 | Cianidina 3-arabinosido |

En general, los arándanos han sido reportados como una fuente de cianidina, delfinidina, peonidina, pentunidina y galactósidos de malvidina, con glucósidos de cianidina y delfinidina y arabinósidos, como las antocianinas más abundantes (Määttä-Riihinen, Kamal-Eldin, Mattila, González-Paramás y Törrönen, 2004; Lätti, Riihinen, y Kainulainen, 2008). En contraste, los arándanos Colombianos, contienen solamente glicosidos de cianidina y delfinidina, lo cual es acorde a la composición de antocianinas encontrada en los arándanos de los Andes provenientes del Ecuador (Vasco y otros, 2009).

Los componentes fenólicos no-antocianinicos encontrados en el *V. meridionale,* incluyen ácidos hidroxicinámicos y flavonoles (Tabla 2A). Fueron detectados seis ácidos hidroxicinámicos (Fig. 2) y se cuantificaron en equivalentes de ácido clorogénico a 320 nm. Todos los picos presentaron una absorción máxima a 326-328 nm y 242 nm, y un hombro a 290-300 nm, típico de los ácidos hidroxicinámicos como el caféico o el ferúlico (Sánchez-Rabaneda y otros, 2003). Los picos 1, 2 y 3 representan el 73.8% del total del área de pico de los componentes fenólicos-noantocininas y fueron identificados tentativamente como miembros de la familia del ácido clorogénico (esteres de ácidos trans-cinámicos y ácido quínico).

Los picos 1 y 2 tienen espectro UV idéntico y fragmentación de espectro de masa MS/MS como el estándar del ácido 3-cafeoilquínico, pero el pico 2 se separa 0.5 min después. El HPLC-MS/MS en modo negativo, reveló un ion molecular a m/z 353 para ambos picos correspondiente a la fórmula molecular $C\_{16}H\_{18}O\_{9}$. Los iones moleculares se fragmentaron dentro de cuatro fragmentos mayores en unos m/z de 191, 135, 161 y 179. Publicaciones previas reportaron que el fragmento en el m/z 191 corresponde a la pérdida de un hidrógeno del ácido quínico, el fragmento en el m/z 179 corresponde al ión $\begin{array}{c}+\\cafeoilo−H^{}\\\\−\\\\\end{array}$ y el ión en el m/z 135 corresponde a su producto de descarboxilación $\begin{array}{c}+\\cafeoilo−CO\_{2}−H^{}\\\\−\\\\\end{array}$ (Clifford, Johnston, Knight, & Kuhnert, 2003). El fragmento en el m/z 161 probablemente revela el producto $\begin{array}{c}+\\cafeoilo−H\_{2}O−H^{}\\\\−\\\\\end{array}$. En consecuencia, los picos 1 y 2 fueron identificados como isómeros de ácido quínico cafeoílo.

El pico 3 representa el 2.9% del total del área de pico de los componentes fenólicos no-antocianinas. Ésto produce un ion molecular en el m/z 367 de acuerdo con $C\_{17}H\_{20}O\_{9}$ y cuatro fragmentos mayores en el m/z 135, 179, 161 y 191. Shakya y Navarre (2006) encontraron el mismo patrón de fragmentación en compuestos fenólicos de papa. La masa primaria corresponde al cafeoilo metil quinato con los fragmentos en el m/z 135, 179 y 191 que son derivados del ácido cafeico según lo informado por Clifford y otros.

Los picos 4,5 y 6 fueron identificados tentativamente como derivados de ácido cafeico ya que sus iones moleculares tenían los mismos espectos UV-Vis y espectrometría de masas de fragmentación tal como en el estándar del ácido cafeico ( en el m/z 161, 135 y 179). Sin embargo, mientras que el pico 4 produjo un ión molecular en el m/z 433, los picos 5 y 6 mostraron un ión molecular en el m/z 475, lo que sugiere que los compuestos eran isómeros.

La cantidad total de ácidos hidroxinámicos detectada en *V. meridionale* fue de $99.2\pm 6.7{mg}/{100}gPF$ (Tabla 3), que es comparable a la cantidad de este compuesto en los arándanos europeos (113-231 mg/100g) (Kähkönen, Hopla, y Heinonen, 2001) y más alta que la cantidad hallada en arándanos de la forma ecuatoriana de los andes (33.7 mg/100g PF) (Vasco y otros 2009). El ácido clorogénico representó 86.1 mg del total de ácidos hidroxinámicos. Ésta cantidad fue 5 veces mayor que la de *V. floribundum* (17 mg/100g PF) como ha sido reportado por los mismos autores.



**Fig. 2.** Perfil por cromatografía líquida de alto rendimiento de los componentes fenólicos no-antocianinicos en mortiño o arándano silvestre (*V. meridionale)* a 320 nm (A) y 355 nm (B). (1) isómero ácido cafeoilquínico 1; (2) isómero ácido cafeoilquínico 2; (3) cafeoilo metil quinato; (4) derivado de ácido caféico; (5) derivado de ácido caféico; (6) derivado de ácido caféico; (7) hexosido de quercetina; (8) pentósido de quercetina; (9) pentosido de quercetina; (10) pentósido de quercetina; (11) ramnósido de quercetina; (12) quercetina hidroxilmetilglutarilo-$α$- ramnosido. Los picos no marcados son antocianinas.

|  |
| --- |
| **Tabla 2** |
| Características cromatográficas y espectroscópicas de los componentes fenólicos noantocianínicos detectadas en *V. meridionale* Swartz |
|  Número del pico | Área del pico (%) HPLC-DAD | Máximo | Tiempo de Retención (min) | Ion Molecular $\begin{array}{c}+M^{}\end{array}$m/z | Fragmentos iónicos en MS/MS m/z | Asignación tentativa del pico |
| 1 | 67.9 | 326, 242, 290 | 9.8 | 353 | 191, 135, 161, 179 | isómero ácido cafeoilquínico 1 |
| 2 | 3.0 | 326, 242, 290 | 10.3 | 353 | 191, 135, 161, 179 | isómero ácido cafeoilquínico 2 |
| 3 | 2.9 | 328, 242, 290 | 16.2 | 367 | 135, 179, 161, 191 | Cafeoilo metil quinato |
| 4 | 5.6 | 328, 242, 290 | 17.4 | 433 | 161,135,179 | Derivado de ácido cafeico |
| 5 | 0.5 | 328, 242, 290 | 22.4 | 475 | 161, 135, 179 | Isómero Derivado de ácido cafeico 1 |
| 6 | 1.9 | 328, 242, 290 | 23.1 | 475 | 161, 135, 179 | Isómero Derivado de ácido cafeico 2 |
| 7 | 3.9 | 345, 255 | 18.4 | 463 | 300/301, 271, 255, 179, 151 | Hexosido de Quercetina |
| 8 | 0.7 | 345, 256 | 19.7 | 433 | 257, 300/301, 271 | Pentósido de Quercetina |
| 9 | 0.8 | 357, 256 | 20.1 | 433 | 300/301, 271, 255 | Pentosido de Quercetina |
| 10 | 2.2 | 353, 255 | 20.6 | 433 | 300/301, 271, 255 | Pentosido de Quercetina |
| 11 | 4.5 | 345, 255 | 21.0 | 447 | 300/301, 271, 255 | Ramnosido de Quercetina |
| 12 | 6.1 | 349, 256 | 24.1 | 591 | 300/301, 447, 489, 529 | Quercetina hidroxilmetilglutarilo-α-ramnosido |

|  |
| --- |
| **Tabla 3** |
| Contenido de fenólicos no-antocianinicos en *V. meridionale* $Swartz^{a}$ |
| Componentes fenólicos | Contenido (mg/100 g PF) |
| Acidos hidroxicinámicos | Equivalentes de ácido clorogénico |
| Isómero Clorogénico 1 | $82.4\pm 3.2$ |
| Isómero Clorogénico 2 | $3.7\pm 0.5$ |
| Cafeoilo metil quinato | $3.4\pm 2.4$ |
| Derivado de ácido caféico | $6.7\pm 1.1$ |
| Isómero derivado de ácido caféico 1 | $0.7\pm 0.1$ |
| Isómero derivado de ácido caféico 2 | $2.3\pm 0.4$ |
| Total | $99.2\pm 6.7$ |
| Flavonoles | Equivalentes de rutina |
| Hexosido de quercetina | $9.0\pm 0.2$ |
| Pentósido de Quercetina | $1.5\pm 0.3$ |
| Pentósido de Quercetina | $1.5\pm 0.3$ |
| Pentósido de Quercetina | $5.2\pm 1.1$ |
| Pentósido de Quercetina | $1.9\pm 0.1$ |
| Ramnosido de Quercetina | $10.0\pm 2.6$ |
| Hidroxilmetilglutarilo-alfa-ramnosido de Quercetina  | $14.0\pm 2.7$ |
| Total | $41.9\pm 4.9$ |
| Componentes fenólicos noantocininas totales | $141.2\pm 11.9$ |
| $$ $\pm SD\left(n=3\right)$ |

Había seis flavonoles principales en el modo negativo, identificados por LC-DAD (Fig. 2B), LC-MS y LC-MS/MS. Todos los picos y las patrones para quercetina 3-ramnoglucosido o para el reactivo de rutina, generaron la quercetina aglicona como fragmento en el m/z 300 (ruptura homolítica) y m/z 301 (escisión heterolítica; Hokkanen, Mattila, Jaakola, Pirttila, & Tolonen, 2009).

Los picos 7, 8, 11, y 12, presentaron su absorbancia máxima a 345-349 nm, cualidad característica de los glicosidos de quercetina (Määttä, Kamal-Eldin, & Riitta-Törrönen, 2003), mientras que los picos 9 y 10 mostraron un alfa máxima en la región que está entre 353-357 nm. Un cambio a longitudes de onda inferiores es indicación adicional de metilación, glicosilación o acilación de los grupos hidroxilo de los derivados de quercetina (Markham, 1982).

El pico 7 revela un ión molecular en el m/z 463 correspondiente a C 21H20O12, fórmula del hexósido de quercetina. La fragmentación del ión molecular provee seis fragmentos de iones en el m/z 300, 301, 271, 255, 179, y 151, que coincidía con el patrón de fragmentación del blanco de rutina. El ion en el m/z 301, es típico de la aglicona de quercetina después de la pérdida neutral de 162 amu correspondientes a una hexosa.

Los picos 8, 9 y 10 produjeron un ión molecular en el m/z 433, de acuerdo con el peso de quercetina-pentosidos. El ión molecular del pico 8, fragmentado dentro de tres iones en el m/z 301, corresponde a la pérdida de 132 amu de un residuo de pentosilo, en el m/z 257 y m/z 271. Los picos 9 y 10 fueron considerados isómeros como lo revela su espectro UV idéntico y los fragmentos de iones en el m/z 301,271 y 255.

Los picos 11 y 12 se identificaron tentativamente como ramnosidos de quercetina e hidroxilometiloglutarilo-α-ramnósido de quercetina respectivamente. Esta identificación se realizó basandose en la comparación del espectro de fragmentación idéntico para *Vaccinium vitis-idaea* L. reportado por Hokkanen y otros (2009). El pico 11 reveló un ión molecular en el m/z 447 y MS/MS para iones en el m/z 301, debido a la pérdida neutral de 146 amu, la cual indica un residuo de deoxihesosilo (como una ramnosa), así como de productos de iones del m/z 271 y 255. El pico 12 presenta un ion molecular en el m/z 591 y fragmentos de iones en el m/z 300/301, 447, 489, y 529.

Los glicósidos de quercetina representan el 100% de los flavonoides totales en *V. meridionale* (41,9 ± 4,9 mg / 100 g de peso fresco). Los arándanos de Finlandia contienen una cantidad inferior de flavonoides (11.2 mg flavonoides/100g PF) y sólo el 72% u 8.1 mg/100g de este total corresponde a Quercetina. La cantidad restante está representada por miricetina (Määttä-Riihinen et al., 2004). Del mismo modo, el *V. floribundum* del Ecuador contiene menor cantidad de flavonoides en comparación con *V. meridionale.* En este caso, el 93% de los flavonoides totales (37,5 mg/100 g PF) son representados por la Quercetina y 7% por la miricetina.

En general, la familia *Vaccinium* está caracterizada por la presencia de glicósidos de quercetina y ácidos hidroxicinámicos. El *V. myrtillus* contiene específicamente ácidos caféico/ferúlico, hexosas, desoxihexosas y pentosas de quercetina como los favonoles más abundantes, junto con glicósidos de miricetina (Määttä-Riihinen et al., 2004).

La variación en el contenido y la composición de compuestos fenólicos dentro de las variedades *Vaccinium* usadas en comparación, puede ser dependiente del ambiente de crecimiento y el genotipo (Lätti et al., 2008). Se ha reportado que la Quercetina, la cianidina 3-glucosidos y los ácidos hidroxinámicos son metabolizados como respuesta de defensa contra la radiación solar intensa (Jaakola, Määttä-Riihinen, Karen-Lampi, y Hohtola, 2004), lo cual es común en lugares tropicales como Colombia. Esto puede explicar la diferencia del contenido fenólico y el perfil de composición entre el arándano de las latitudes del norte y el colombiano.

*4.4 Actividad Antioxidante*

Los arándanos Colombianos mostraron una alta actividad antioxidante como indican los ensayos ABTS y FRAP. La captación de radicales ABTS fue de 45,5 ± 2,3 l mol TE / g PF. Esta captación de la actividad de radicales es similar a la del *V. floribundum* del Ecuador (47,9 l mol TE / g FW) (Vasco et al., 2009) y comparable a la de los arándanos azúles (45.9 µmol ET/g), que constituye uno de los antioxidantes más ricos reportados hasta el momento (Kaur y Kapoor, 2001). Nuestro valor está también muy por encima del valor rango para especies Rubus (0-25.3 mmol TE/100 g PF) recomendada para la mejora del valor nutricional debido a sus actividades antioxidantes altas (Deighton, Brennan, Finn, y Davies, 2000).

La contribución del ácido ascórbico a la capacidad antioxidante total de mezclas complejas de antioxidantes, puede calcularse a partir del ensayo ABTS (Deighton y otros, 2000). El ácido ascórbico tiene una actividad molar igual a la del Trolox; por lo tanto, ya que el contenido del ácido ascórbico del arándano de Colombia corresponde a una concentración de 0.94 µmol Trolox/g PF, podemos considerar que representa sólo el 2.1% del total observado de ETAC (Equivalentes de Trolox de Ácido Ascórbico) observado (45.5 µmol TEAC/g).

Aunque la antocianina y los contenidos fenólicos no-antocianínicos y la composición del *V. meridionale* fue algo diferente de la del *V. myrtillus* del norte de Estados Unidos, el *V. meridionale* ha proporcionado una capacidad similar de reducción de hierro. El valor para FRAP fue de 87.0 ± 17.8 µmol ET/g PF o 116,0 ± 23,7 µmol hierro férrico reducido/g PF. Moyer y otros (2002) encontraron 94.9 µmol de hierro férrico reducido/g PF para el *V. myrtillus* cosechado en el Noroeste del Pacífico de Estados Unidos.

La alta concentración y la estructura química de los compuestos fenólicos en el *V. meridionale* podría ser la explicación para su alta actividad antioxidante. Se ha demostrado que los monoglucósidos de cianidina y delfinidina, así como el ácido clorogénico y la quercetina, poseen una alta actividad antioxidante y una actividad de captación de radicales y que estas se comparan bien con los bien conocidos antioxidantes α-tocopherol y Trolox (Kähkönen & Heinonen, 2003).

El método ABTS mide la capacidad del antioxidante para saciar los radicales $\begin{array}{c}+\\ABTS^{}\end{array}$ (probablemente por una reacción de tranferencia de electrones), mientras que el ensayo FRAP mide el potencial de un antioxidante para reducir el complejo férrico TPTZ amarillo a un complejo férrico TPTZ azul, mediante sustancias donantes de electrones en condiciones ácidas. De acuerdo con nuestros resultados, el mortiño o arándano colombiano, es un buen donante de electrones, pues su extracto fue capaz de saciar los radicales $\begin{array}{c}+\\ABTS^{}\end{array}$ y reducir el complejo férrico en un complejo ferroso. Los altos valores de ABTS y FRAP del extracto *V. meridionale*, junto a su bajo contenido de ácido ascórbico, sugieren que los compuestos fenólicos son los principales contribuyentes de la alta actividad antioxidante de ésta fruta.

En conclusión, este estudio demuestra por primera vez que las bayas de *V. meridionale* pueden diferenciarse de otros arándanos por su patrón único de antocianinas, por ejemplo, por las altas proporciones tanto de delfinidina y cianidina. Esta información puede ser útil en la identificación adecuada y la autenticación de productos derivados de esta fruta. Además, las bayas de *V. meridionale* son una excelente fuente de fitoquímicos dietarios tales como las antocianinas y los polifenólicos, siendo comparable con la *V. myrtillus*. El uso de *V. meridionale* como fuente de antioxidantes naturales, colorantes naturales, y como un ingrediente de comidas funcionales, parece ser prometedor.

**Referencias**

Bao, L., Yao, X.-S., Yau, C.-C., Tsi, D., Chia, C.-S., Nagai, H., et al. (2008). Protective effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) extract on restraint stress-induced liver damage in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56, 7803–7807.*

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration*. Methods of Enzymology*, 299, 15–27.

Canter, P. H., & Ernst, E. (2004). Anthocyanosides of *Vacinnium myrtillus* (bilberry) for night visions a systematic review of placebo controlled trials. *Survey of Ophthalmology*, 49, 38–50.

Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., & Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2900–2911.

Deighton, N., Brennan, R., Finn, C., & Davies, H. V. (2000). Antioxidant properties of domesticated and wild Rubus species. *Journal of the Science of Food and Chemistry*, 80, 1307–1313.

Durst, R., & Wrolstad, R. E. (2001). Separation and characterization of anthocyanins by HPLC. In *Handbook of food analytical chemistry* (pp. 33–45). New Jersey: John Wiley and Sons.

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV–visible spectroscopy. In *Handbook of food analytical chemistry* (pp. 19–31). New Jersey: John Wiley and Sons.

Hakulinen, J., Julkunen-Titto, R., & Tahvanainen, J. (1995). Does nitrogen fertilization have an impact on the trade-off between willow growth and defensive secondary metabolism? *Trees – Structure and Function*, 9, 235–240.

Herms, D. A., & Mattson, W. J. (1992). The dilemma of plants: To grow or defend. *Quarterly Review of Biology*, 67, 283–335.

Hokkanen, J., Mattila, S., Jaakola, L. J., Pirttila, A. M., & Tolonen, A. (2009). Identification of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea L.*), bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) and hybrid bilberry (*Vaccinium* $×$ *intermedium Ruthe L.*) leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 9437–9447.

Hong, V., & Wrolstad, R. E. (1990). Characterization of anthocyanin-containing colorants and fruit juices by HPLC/photodiode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 698–708.

Jaakola, L., Määttä-Riihinen, K. S., Karenlampi, S., & Hohtola, A. (2004). Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) leaves. Planta, 218, 721–728.

Kähkönen, M. P., & Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 628–633.

Kähkönen, M. P., Hopla, A. I., & Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4076–4082.

Kaur, C. K., & Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium’s health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703–725.

Kause, A., Ossipov, V., Haukioja, E., Lempa, K., Hanhimäki, S., & Ossipova, S. (1999). Multiplicity of biochemical factors determining quality of growing leaves. *Oecologia*, 120, 102–112.

Lätti, A. K., Riihinen, K. R., & Kainulainen, P. S. (2008). Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 190–196.

Määttä, K. R., Kamal-Eldin, A., & Riitta-Törrönen, A. (2003). High performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization mass spectrometric (MS) detection: Ribes species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6736–6744.

Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., Mattila, P. H., González-Paramás, A. M., & Törrönen, R. (2004). Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4477–4486.

Markham, K. R. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. New York: Academic Press. pp. 36–39.

Martín-Arago ́n, S., Basabe, B., Benedi, J. M., & Villar, A. M. (1998). Antioxidant action of Vaccinium myrtillus L. Phytotherapy Research, 12, S104–S106.

Mazza, G., & Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.

Morazzoni, P., & Bombardelli, E. (1996). *Vaccinium myrtillus L. Fitoterapia*, 67, 3–29.

Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus and Ribes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 519–525.

Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O’Brien, C., 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, 2686–2693.

Re, R., Pellegrinni, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical in Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.

Sánchez-Rabaneda, F., Ja ́uregui, O., Casals, I., Andre ́s-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., & Lamuela-Ravento ́s, R. M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*, 38, 35–42.

Shakya, R., & Navarre, D. A. (2006). Rapid screening of ascorbic acid, glycoalkaloids, and phenolics in potato using high-performance liquid chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5253–5260.

Valentová, K., Ulrichová, J., Cvak, L., & Šimánek, V. (2007). Cytoprotective effect of a bilberry extract against oxidative damage of rat hepatocytes. *Food Chemistry*, 101, 912–917.

Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8274–8281.

Waterhouse, L. (2001). Determination of total phenolics. In *Handbook of food analytical chemistry* (pp. 463–470). New Jersey: John Wiley and Sons.

Zhao, C., Giusti, M. M., Malik, M., Moyer, M. P., & Magnuson, B. A. (2004). Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6122–6128.

1. a. Departamento de química, universidad nacional de colombia, aa 14490 bogotá, colombia. [↑](#footnote-ref-2)
2. Correspondencia de la autora. Tel: +571 3165220. dirección electrónica: agarzonmo@unal.edu.co (g.a. garzón) [↑](#footnote-ref-3)
3. b. Departamento de ciencia de los alimentos. 2015 *fyffe road, edificio parker de ciancia de los alimentos, universidad del estado de ohio, columbus, oh 432010, usa* [↑](#footnote-ref-4)
4. mediador químico (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etillbenzotiazolin-6-sulfonico)) [↑](#footnote-ref-5)
5. Trolox es un análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol. En virtud de su alta solubilidad en agua y su amplia disponibilidad comercial, el trolox es universalmente empleado como estándar en las (curvas de comparación de) diversos ensayos de actividad antioxidante (como ORAC, TEAC). En el caso del ensayo ORAC, la actividad antioxidantes se expresa como micromoles de Equivalentes Trolox (ET) por unidad de peso o de volumen de la muestra analizada (generalmente, por 100 g de peso fresco o 100 ml). Sacado de: <http://www.portalantioxidantes.com/faq/%C2%BFque-es-el-trolox/> revisado por última vez el 13 de agosto de 2015. [↑](#footnote-ref-6)
6. Equivalentes de Trolox. [↑](#footnote-ref-7)
7. Por ejemplo registro invima para nuestro contexto local. [↑](#footnote-ref-8)
8. Para el marco local denominados suplementos dietarios. [↑](#footnote-ref-9)
9. Los grados Brix (símbolo °Bx) miden el cociente total de sacarosa disuelta en un líquido. Sacado de: <http://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=1303> ; última revisión 20/08/2015. [↑](#footnote-ref-10)
10. Hidróxido de sodio [↑](#footnote-ref-11)
11. Cromatografía líquida de alto rendimiento. [↑](#footnote-ref-12)
12. Partes por millón [↑](#footnote-ref-13)
13. Detector de matriz de fotodiodos. [↑](#footnote-ref-14)
14. FRAP en inglés. [↑](#footnote-ref-15)
15. (2,4,6-tripyridyl-S-triazine) [↑](#footnote-ref-16)
16. Es el porcentaje de solidos solubles presentes en alguna sustancia. En alimentos, este valor indica la cantidad de azúcar (sacarosa) presente en el producto [↑](#footnote-ref-17)
17. Equivalentes de ácido gálico [↑](#footnote-ref-18)