



4. PROTOCOLOS ESTANDARIZADOS POR EL PROCISUR PARA LA VALORIZACIÓN DE FRUTOS NATIVOS

4.1 METODOLOGÍA DE ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS PARA EL PROCISUR

Estandarización de protocolos:

Con el propósito de elaborar un protocolo estandarizado para determinar carotenoides, antocianinas y polifenoles se coordinó una colaboración en la que participaron siete laboratorios de cinco países (Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay) con el fin de seleccionar los mejores procedimientos de evaluación y permitir un intercambio fluido de información.

Estos protocolos han sido diseñados para optimizar la probabilidad de que los datos y las muestras biológicas sean sistemáticamente recolectadas y compartidas rápidamente en un formato que puedan ser agregados, tabulados y analizados fácilmente, en los diferentes contextos a nivel regional del PROCISUR.

Los protocolos se estandarizaron en base a la siguiente metodología: a) recolección de la información por parte de las instituciones participantes; b) presentación, análisis, discusión y estandarización de protocolos para carotenoides, antocianinas y compuestos fenólicos totales; c) revisión de los protocolos

consensuados, análisis, discusión y estandarización final de protocolos para carotenoides, antocianinas y compuestos fenólicos totales; d) muestreo y validación de protocolos en cada país para cada fruto escogido; y e) publicación de protocolos estandarizados. Se realizaron diferentes talleres en los cuales se discutieron y estandarizaron los protocolos.

El grupo de trabajo realizó:

- Videoconferencia en marzo de 2017 para acordar recolección de la información por parte de las instituciones participantes y designación de responsables por protocolo para carotenoides, antocianinas y polifenoles totales.
- Reunión de trabajo en mayo de 2017 en Buenos Aires, Argentina, para la presentación de los protocolos por cada responsable. Análisis, discusión y estandarización de los protocolos. Visita a los laboratorios de alimentos de INTA
- Reunión de trabajo en agosto de 2017 en Río de Janeiro, Brasil, en la cual se realizó revisión de los protocolos consensuados, así como análisis, discusión y

estandarización final de los mismos. Visita a los laboratorios de Embrapa Agroindustria de Alimentos. Seminario “Tendencia del uso de compuestos bioactivos procedentes de frutas en la industria de cosméticos” por Daniel Weigard Barreto de Assessa

(assessa.com.br), empresa brasilera especializada en el desarrollo y producción de ingredientes bioactivos de alta eficacia para la industria cosmética.

- Finalmente, los protocolos estandarizados fueron validados en los frutos escogidos por cada país.

4.2 DESCRIPCIÓN DE PROTOCOLOS ESTANDARIZADOS PARA EL PROCISUR

4.2.1 Protocolo para la determinación de carotenoides en frutos nativos.

Facundo Ibáñez, PhD.

Laboratorio Plataforma Agroalimentos y Poscosecha Fruticultural de INIA Uruguay,

El protocolo estandarizado se basa en los protocolos y recomendaciones de Biehler et al. (2010); Lichtenthaler and Buschmann (2001); Rodríguez-Amaya (2015); Rodríguez-Amaya et al. (2001) y Scott (2001).

Preparación de las muestras

- a. Seleccionar en forma aleatoria y representativa 100 g de frutos aprox. (10 frutos pequeños o 4-5 grandes)
- b. Colocar las muestras en bolsas identificadas y congelar en ultrafreezer a -70/-80°C
- c. Liofilizar las muestras y pulverizar el tejido. Pesar las muestras antes y después del liofilizado para calcular materia seca. Guardar en un contenedor seco y protegido de la luz.

Extracción de pigmentos carotenoides

- a. Pesar 0.2 g aproximados en balanza analítica del fruto pulverizado y liofilizado en un tubo Falcon de 15 mL.
- b. Mezclar con 5-7 mL de solución de extracción (0.1 % de BHT en acetona) y agitar en vortex por 30 segundos.
- c. Llevar a baño de ultrasonidos por 10 min y luego centrifugar a 10.000 rpm por 10 min.
- d. Transferir el sobrenadante a un matraz aforado de 25ml. Si es necesario filtrar previamente.
- e. Repetir b, c y d hasta decoloración de la matriz (entre 3 y 5 veces aprox.)
- f. Enrasar el matraz con solución de extracción y medir carotenoides totales o beta caroteno/

licopeno según el caso. En el caso de no analizar en el momento, transferir a un recipiente para guardar en freezer a -18 °C (max. 1 semana).

Estimación de carotenoides totales

- a. Medir la concentración de carotenoides totales en espectrofotómetro fijado a 450 nm, usando como blanco la solución de extracción.
- b. Calcular la concentración de caroteno (*c*) en $\mu\text{g/ml}$ por medio de la ecuación siguiente:

$$c = A_{\text{max}} \times M \times 1000 / \epsilon \times \delta$$

En la cual:

A_{max} = Absorción determinada a la longitud de onda de 450nm

M = masa molecular de β -caroteno = 537 g/mol

ϵ = coeficiente de extinción molar del β -caroteno en acetona (140663 l/mol cm) de acuerdo con Biehler et al. (2010)

δ = camino óptico (cm)

Determinación de betacaroteno y/o licopeno por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

- a. *Eluyente*: Preparar la fase móvil mezclando 900 ml de metanol grado HPLC, 100 ml de acetoni-trilo grado HPLC, y 1 ml de tretilamina (TEA).

b. Condiciones de HPLC:

Columna: polimérica C18 5 μm x 250-mm x 4,6-mm

Flujo: 1ml/min isocrático

Temperatura: ambiente regulada o fijada en el horno de columnas (25°C)

Detección: UV-vis 450 nm (470 para licopeno)

Volumen de Inyección: 20 µl de la muestra o estándares en solvente miscible con la fase móvil (etanol, metanol, acetonitrilo) previamente filtrada en filtro de membrana de 0.45 µm.

$$\text{Cálculos: } (\mu\text{g/g}) = \frac{A_x \times C_s (\mu\text{g/ml}) \times \text{total vol extrac (ml)}}{A_s \times \text{peso muestra (g)}}$$

Cs = concentración del estándar
As = Área del pico del estándar

Donde:

C_x = concentración del carotenoide X.

A_x = Área del pico del carotenoide.

Preparación curva patrón.

Pesar 10 mg de β-caroteno y/o licopeno disolver en acetona y llevar a volumen en matraz aforado de 25 mL.

Para determinar la concentración exacta, registrar el espectro de absorción de la solución entre 400 y 500 nm en una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico utilizando acetona como blanco. Identificar el máximo de absorción y calcular la concentración del caroteno (c) en µg/ml por medio de la ecuación siguiente:

$$c = A_{\max} \times M \times 1000 / \varepsilon \times \delta$$

En la cual:

A_{max} = Absorción determinada a la longitud de onda máxima (alrededor de 450 para β-caroteno y 470 nm para licopeno)

M = masa molecular de β-caroteno/licopeno = 537 g/mol

ε = coeficiente de extinción molar de licopeno en acetona (β-caroteno 140663 L/mol cm; licopeno 120600 L/mol/cm), de acuerdo con Biehler et al. (2010).

δ = camino óptico (cm)

Esta solución es estable a -18°C por lo menos durante 3 semanas.

REFERENCIAS

Abadía, J., Abadía, A. (1993). *Iron and plant pigments - Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms*. L. Burton & B. Hemming (eds). Academic Press, 327–343.

Biehler E, Mayer F, Hoffmann L, Krause E, Bohn T (2010) *Comparison of spectrophotometric methods for carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables*. Journal of food science 75 (1):C55-61. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01417.

Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001) *Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS*

Spectroscopy. In: Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/0471142913.faf0403s01

Rodriguez-Amaya D (2015) *Food Carotenoids: Chemistry, Biology and Technology*. Wiley, Rodriguez-Amaya DB, Institute ILS, OMNI (2001) *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. ILSI Press, Scott KJ (2001) *Detection and Measurement of Carotenoids by UV/VIS Spectrophotometry*. In: Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/0471142913.faf0202s00