



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales y Agrimensura

CARRERA DE POSGRADO
ESPECIALIZACION EN ANALISIS DE LOS ALIMENTOS

INFORME FINAL

**“ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN FÍSICO
QUÍMICA DEL FRUTO DE *Berberis microphylla*
G. Forst, DE INTERÉS ECONÓMICO PARA LA
CIUDAD DE EL CALAFATE”**

Alumno: Lic. Claudio Gustavo Blanco

Director: Dr. Gonzalo Ojeda

CORRIENTES

- 2019 -

Agradecimientos

A mi familia, por su entrega y su compañía constante, a mis hijos, Bastián y Aluen por esperarme y darme fuerzas en cada desafío. Los amo.

A la compañera Anita Ianni por confiar y colaborar en este desafío.

A la Dra. Sonia C. Sgroppo, por su entrega, comprensión y profesionalismo, pero fundamentalmente por su generosidad; sin ella esto no sería posible.

Al Dr. Gonzalo Ojeda, por su paciencia, su sabiduría y sus conocimientos compartidos y a todos los profes del Laboratorio de Tecnología Química de la Facultad.

A mis compañeros de la carrera, sin dudas hicieron que los largos viajes y las estadías fueran más amenas. Sus experiencias, sus opiniones, su sencillez y humildad hicieron de esta etapa algo inolvidable para mí.

A esa persona que alguna vez me dio las razones para poder seguir y nunca bajar los brazos, a esa persona que aún guardo en mi memoria y que con simples conversaciones me hizo comprender la importancia y el poder de las palabras, cuando te muestran el camino y otras marcan el destino.

Especialmente a mi Madre, Matilde Beatriz Blanco (†), por su eterna confianza, su compañía, su amistad y por ser mi guía.

A la vida por permitirme seguir soñando.

A todos GRACIAS

INDICE

1. INTRODUCCION	Pág. 6-17
1.1 Producción	Pág. 6 – 9
1.2 Formas de consumo y Marco Regulatorio	Pág. 10-11
1.3 Información Nutricional	Pág. 11-12
1.4 Compuestos Bioactivos de Berberis <i>Microphylla</i> G.Forst	Pág. 13-15
1.5 Composición Nutricional de Berberis <i>Microphylla</i> G.Forst	Pág. 16
1.6 Fundamentos del Trabajo	Pág. 17
2. OBJETIVO GENERAL	Pág. 18
2.1 Objetivos específicos	Pág. 18
3. MATERIALES Y METODOS	Pág. 19-25
3.1 Material de Trabajo	Pág. 19-20
3.2 Determinaciones	Pág. 21
3.2.1 pH y Acidez	Pág. 21
3.2.2 Cenizas	Pág. 21
3.2.3 Contenido de agua	Pág. 21
3.2.4 Actividad Antioxidante	Pág. 21-22
3.2.5 Antocianinas	Pág. 22
3.2.6 Azucares Totales	Pág. 23
3.2.7 Fenoles Totales	Pág. 23
3.2.8 Flavonoides	Pág. 23
3.2.9 Identificación de Compuestos Fenólicos por HPLC	Pág. 24
3.2.10 Minerales y Proteínas	Pág. 24-25
4. RESULTADOS Y DISCUSION	Pág. 26-30
5. CONCLUSIONES	Pág. 31-32
6. BIBLIOGRAFIA	Pág. 33-37

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo el análisis preliminar de la composición físico química del fruto de *Berberis microphylla* G. Forst, y los componentes de interés para elaboración del cálculo nutricional de los productos que utilizan el fruto de calafate como materia prima.

A partir del análisis proximal, se determinó que el fruto (de acuerdo al estado madurativo del fruto al momento de la cosecha) presentó un pH de $3,33 \pm 0,02$ y una Acidez de $4,86 \pm 0,15$ mmol eq.ac. Cítrico/g Tejido Fresco, Cenizas 3,76 % (referido a 100g TF), Contenido de Agua $70,6 \pm 0,4$ %, la Actividad Antioxidante fue de $171,03 \pm 14,5$ mmol eq. ácido Clorogénico /g TF , el contenido de Antocianinas fue de $260,82 \pm 11,8$ mg/ 100g TF, azúcares totales $3,50 \pm 0,11$ g de glucosa/100 g TF, el contenido de Fenoles Totales fue de $0,20 \pm 0,02$ mg de ácido clorogénico /100g TF y Flavonoides $287,02 \pm 39,86$ mg de catequina/100g TF.

Se determinó además el contenido de Proteínas Totales 13,20 %, Nitrógeno 2,11%, Calcio 1,93 %, Magnesio 0,76 %, Potasio 1,38 %, Fosforo 0,03 %, Sodio 0,01 %, Manganeso 47,48 ppm, Cobre 35,61 ppm, Zinc 18,99 ppm.

Se identificaron por HPLC mayoritariamente la presencia de los Ácidos Fenólicos, Gálico, Clorogénico y el Flavonoide Quercetina.

La información obtenida es de relevancia para la valoración nutricional de los productos alimenticios que utilizan el fruto como materia prima y en consecuencia el cumplimiento con la exigencia normativa por parte de los elaboradores.

1. INTRODUCCION

1.1 Producción

La Ciudad de El Calafate se encuentra ubicada en la Provincia de Santa Cruz, República Argentina, distante a 320 km de la Ciudad de Río Gallegos y sobre la margen sur de la cordillera andina. La ciudad adquiere su dinámica económica fundamentalmente por el Turismo Internacional atraído por el Glaciar Perito Moreno, el cual se encuentra ubicado dentro del Parque Nacional Los Glaciares distante a 80 km del casco urbano. En la localidad se elaboran una gran variedad de productos alimenticios y algunos de tocador a partir de la baya silvestre “calafate”, orientadas al mercado turístico (septiembre a marzo) y con una importante proyección comercial a nivel provincial y regional.

Las frutas finas (denominación que se vincula al aspecto comercial y no al botánico, incluye los subgrupos berries y cherries) como las frutillas, frambuesas y arándanos, en menor escala moras, cassis y grosellas. Los berries silvestres, son productos de interés debido a su gran demanda mundial. Los productos que ofrece el mercado de las frutas finas van desde la elaboración de jugos, refrescos, vinagres, vinos y hasta productos deshidratados, frutas al natural y congeladas (Vendruscolo, 2004).

En Argentina las frutas finas cultivadas son principalmente los berries (arándano, frutilla, frambuesa, zarzamora) y los cherries (cerezas). Otros frutos pequeños de alguna importancia local (en la región de la Patagonia) son las grosellas blancas, rojas y negras.

Los arándanos, son los berries más importantes en términos económicos y sociales. Los arándanos frescos son enviados a 26 mercados internacionales, siendo EE.UU. (65%), Reino Unido (16%) y Europa continental (15%) los principales mercados. Una ventana de oportunidad se abre si se considera que los arándanos son escasamente consumidos en Argentina debido a sus altos precios. (Kirschbaum y Ruiz, 2017).

Argentina es el segundo país productor de arándanos de América del Sur, después de Chile, con 2750 hectáreas de esta fruta. Las regiones de producción en la Argentina son: Nordeste (NEA, 38%), Noroeste (NOA, 48%) y Central (15%). En cuanto a producción de arándano, la región NEA incluye las provincias de Entre Ríos y Corrientes; la región NOA incluye las provincias de Tucumán, Salta y Catamarca; y la región Central está compuesta exclusivamente por la provincia de Buenos Aires (INTA 2017).

En nuestro país se produce aproximadamente 1.500 tn de frambuesa, 350 tn de zarzamora y 180 tn de otros berries. La superficie cultivada para este grupo de frutos es significativamente pequeña (300 ha), en comparación con los arándanos y las frutillas. La producción de frambuesa no cubre la demanda del país, lo que determina que se importen entre 300 - 500 tn de esta fruta, principalmente de Chile, cada año (SENASA, 2017). Más del 70% de la superficie cultivada con frambuesas, moras y berries se concentra en la región de la Patagonia (provincias de Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz). También hay pequeñas fincas de frambuesas y zarzamoras en Tucumán, Santa Fe y Buenos Aires.

Las frutas finas cultivadas, en particular los cassis, frambuesas y corintos, son una excelente fuente de diversos productos naturales como pigmentos (Flores Cantillano, 2004), (Henriques et al. 2004) muchos de ellos con gran capacidad antioxidante (Crozier y Muller, 2002). Dentro de los pigmentos, las antocianinas son un grupo de metabolitos secundarios pertenecientes a la subclase flavonoides, son conocidos por presentar una gran capacidad antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*. En un estudio en el cual se compararon 150 flavonoides, las antocianinas presentaron el mayor poder antioxidante (Elliot, 1992).

En Argentina, el interés por los berries se ha incrementado tanto para el mercado local como para el mercado externo (frutos frescos). La Patagonia Andina es la zona más importante en la producción de frutas finas de los géneros *Ribes* y *Rubus*, particularmente en la zona del paralelo 42. El cultivo de frambuesas (*Rubus idaeus*) es el más antiguo entre las especies de frutas finas de la Patagonia Argentina (Martínez y Riadigos, 1993).

Aproximadamente el 95% de la producción de frambuesas, moras y corinto se vende localmente como fruta congelada. El principal destino de estas bayas es la industria alimentaria, para la producción de mermeladas, salsas, jugos y licores. Otro destino importante es el sector gastronómico, que demanda principalmente frutas congeladas para restaurantes, hoteles, servicios de catering, confitería y heladerías. Un pequeño volumen de fruta se vende fresco, casi exclusivamente en la región andina de la Patagonia. Por otra parte, tanto a nivel mundial como local existe una gran tendencia hacia la producción orgánica de estas frutas (INTA 2017).

En la Patagonia existen especies nativas cuyos pequeños frutos tienen una demanda muy importante para la elaboración de diversos productos, como las especies del género *Berberis*. Se debe tener en cuenta que la fisiología de la fructificación trae

consigo cambios metabólicos a nivel de planta entera que se manifiestan en el crecimiento de los frutos hasta su madurez, y culminación de su ciclo biológico. Las tasas de crecimiento de los frutos varían extremadamente entre especies, según las prácticas culturales, entre los diferentes frutos en la misma copa y son dependientes de las condiciones ambientales, pudiendo además mostrar diferentes patrones de crecimiento (Arena, 2016).

Este género está bien representado en la Patagonia por 16 especies de arbustos nativos cuyos frutos pueden consumirse frescos o en mermeladas (Bottini et al.,1993., Orsi,1984) los frutos también representan una fuente importante de alcaloides del tipo berberinas y antocianinas, con una aplicación medicinal y tintórea (Fajardo Morales et al.,1986; Fajardo Morales,1987; Pomillo,1999; Shaffer,1985). Los Berberis en la Patagonia Argentina tienen una amplia distribución, desde Neuquén hasta Tierra del Fuego (Job, 1942; Orsi,1984). La especie nativa *Berberis microphylla* G. Forst, pertenece a la familia Berberidaceae, es un arbusto perenne de amplia distribución en el ejido municipal y los alrededores.

El arbusto espinoso puede alcanzar una altura de 1 – 1,5 m de altura, crece en la meseta patagónica formando parte de comunidades edáficas sobre cañadones, ríos y arroyos, a las orillas de lagos y pantanos, así como también en los Andes Patagónicos, tiene hojas de borde entero, agrupadas, de forma y tamaño muy variable, generalmente obovada, oblanceolada, a veces elípticas a lineares, lámina de 0,6 - 4 x 0,2-1,4 cm (figuras 1 y 2).



Figura 1: Fruto y hojas de *Berberis Microphylla* G. Forst (calafate).

Fuente: www.portalfruticola.com

En cada grupo de hojas presenta 3 espinas de color amarillento que llegan a medir 3 cm, con flores solitarias de color amarillo de 4-5 mm de largo (figura 3), pedicelo de 0,5 - 2,4 cm de largo. Perianto compuesto de 6 pétalos y 6 sépalos, 6 estambres de 2,5 – 3 mm de largo y pistilo de 3 mm de largo. El fruto es una baya subglobosa de color azul oscuro de 7 - 11 mm de diámetro que contiene 6 - 10 semillas negras de 4 - 6 mm de largo (Landrum, 1999).



Figura 2: Fruto maduro de *Berberis Microphylla* G. Forst (calafate).

Fuente <https://www.laderasur.com.ar>



Figura 3: Flores de *Berberis Microphylla* G. Forst (calafate).

Fuente <https://www.elpatagonico.com>

1.2 Formas de consumo y marco regulatorio

En los últimos años se ha incrementado la demanda de frutos de estos arbustos *Berberis microphylla* G. Forst, para la elaboración de diversos productos como dulces y jaleas, pulpas para la elaboración de helados y bebidas, a la vez se emplean en productos cosméticos como shampoo y cremas capilares. A esto debe sumarse el hecho que se ha incorporado al Código Alimentario Argentino por Resolución Conjunta 22/2006 y 409/2006, la inclusión de frutas originarias de la zona andina como los *Berberis*, autorizando su empleo en productos alimenticios como dulces, mermeladas, licores, helados y confites. En el Artículo N° 888 del Capítulo XI (Resolución Conjunta SPReI N° 169/2013 y SAGyP N° 230/2013), incorpora al *Calafate*: Fruto de *Berberis microphylla* G. Forst, como baya de consumo fresco, considerándola como fruto de origen silvestre.

Sin embargo, el mismo cuerpo normativo, no establece referencias de valores referentes a su composición química y/o física. Además, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United State Departament of Agriculture - USDA) ha aprobado el ingreso el ingreso a los Estados Unidos de frutos de calafate, por lo cual se halla en la lista de frutas y vegetales de dicho organismo.



Figura 4: Mermelada del fruto del calafate

Fuente <https://buonaalmacen.com.ar>

Nuevos productos emergen en el mercado a partir del uso de nuevas tecnologías, tal es el caso de las infusiones a partir de calafate liofilizado o como base de otros productos. Esta tecnología permite conservar las propiedades del fruto sin sufrir pérdidas de nutrientes (proteínas, vitaminas, minerales, etc.) como sucede en los

métodos tradicionales (Ej.: cocción).

En otros países como Chile se comercializa calafate en capsulas y en polvo (lío­filizado) como alimento nutracéutico o productos de herboristería, resaltándose como atributo la capacidad antioxidante del fruto.



Figura 5: Fruto del calafate Liofilizado

Fuente <https://www.wildpatagoniafoods.com>

1.3 Información Nutricional

Desde agosto de 2006, fecha en que ha entrado en vigencia la normativa que regula el rotulado nutricional de los alimentos envasados (Res. Conj. 149/2005 y 150/2005), el consumidor dispone de mayor información sobre las propiedades de dichos productos y puede llevar así una dieta más sana y equilibrada. Para una mayor comprensión del tema, en primer lugar, es necesario tener en cuenta algunas definiciones que se detallan a continuación:

Alimento: Es toda sustancia que se ingiere en estado natural, semielaborada o elaborada, se destina al consumo humano y aporta al organismo los materiales y/o la energía necesarios para el desarrollo de los procesos biológicos. Esta definición incluye a las sustancias o mezclas de sustancias que se ingieren por hábito, costumbres o como coadyuvantes, tengan o no valor nutritivo.

Rótulo: Es toda inscripción, leyenda o imagen adherida al envase del alimento. Su función es brindar al consumidor información sobre las características particulares de los alimentos. Está prohibida toda información o mensaje que aparezca en las etiquetas de los alimentos que no sea adecuada y veraz, o que induzca a engaño o error al consumidor.

Ingrediente: Es toda sustancia, incluidos los aditivos alimentarios, que se emplee en la fabricación o preparación de alimentos y que esté presente en el producto final en su forma original o modificada.

Nutrientes: Son sustancias presentes en un alimento, indispensables para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la salud.

Macronutrientes: hidratos de carbono, proteínas, grasas, agua.

Optativamente se podrán declarar: los minerales (ej. calcio, hierro, sodio, magnesio, potasio, etc.). y las vitaminas (Ej. Vitamina C, A, D, etc.), siempre y cuando se encuentren presentes en cantidad igual o mayor que 5% de la Ingesta Diaria Recomendada (IDR) por porción indicada en el rótulo.

Rotulado nutricional: Se entiende por rotulado nutricional a toda descripción destinada a informar al consumidor sobre las propiedades de un alimento. La información nutricional y la protección al consumidor ha sido en los últimos tiempos el fundamento de las regulaciones en materia de etiquetado de los productos alimenticios. Todas las personas tienen derecho a disponer de alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades nutricionales y sus preferencias alimentarias, con la finalidad de llevar una vida activa y sana. La nutrición y un correcto hábito alimentario constituyen una de las principales fuentes de salud. Cada vez más, los comportamientos nutricionales se están asociando con la seguridad alimentaria. Sin embargo, para poder llevar una dieta sana, es necesario que los rótulos sean claros y contengan todos los datos necesarios, de manera que el consumidor pueda realizar una adecuada elección. En este contexto, la información que acompaña a los alimentos juega un papel fundamental. Por ello, como ya lo mencionáramos, a partir del 1º de agosto de 2006 el rotulado nutricional pasa a ser obligatorio para todos los alimentos envasados, con algunas excepciones especificadas en la legislación. Al definirse la información que debe aparecer en los rótulos de los alimentos, y la forma en que debe estar presentada, el consumidor podrá conocer mejor las propiedades nutricionales del producto, compararlo con otros y realizar una mejor elección de acuerdo a sus necesidades.

En la actualidad las distintas bases de datos que proporcionan información del valor nutricional de los distintos alimentos, sea ARGENFOOD (base de datos de la Universidad Nacional de Luján), INFOOD (Base de datos FAO), BEDCA (Base de datos Española) no poseen la composición físico-química para el fruto de calafate ni para sus productos que resulten de la utilización del mismo como materia prima.

1.4 Compuestos bioactivos de *Berberis microphylla* G. Forst

El término “alimento funcional” propuesto en Japón en el año 1980 para su reglamentación, define a los “alimentos para uso específico en salud”. Dentro de las muchas definiciones existentes, alimento funcional es, según la IFIC (Consejo Internacional de Información sobre Alimentos) “todo aquel alimento semejante en apariencia física al alimento convencional, consumido como parte de la dieta diaria, pero capaz de producir demostrados efectos metabólicos o fisiológicos, útiles en el mantenimiento de una buena salud física y mental, en la reducción del riesgo de enfermedades crónico degenerativas, además de sus funciones nutricionales básicas”.

Para citar un antecedente más, en Estados Unidos no hay legislación que contemple la categoría de alimentos funcionales, solo se permite, desde el año 1993 que se aleguen propiedades "que reducen el riesgo de padecer enfermedades" en ciertos alimentos. Las "alegaciones de salud" están autorizadas por la Administración para Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration - FDA -1993), en cuanto esté comprobado científicamente y mediante evidencia públicamente disponible, como así también la existencia de consenso científico que respalde dichas alegaciones. Según la FDA, las alegaciones pueden basarse también en "declaraciones autorizadas" de Organismos Científicos Federales, como los Institutos Nacionales de la Salud (National Institutes of Health) y los Centros para la Prevención y el Control de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention), así como de la Academia Nacional de las Ciencias (National Academy of Sciences).

En la legislación de la Unión Europea no existen disposiciones legislativas directas sobre los alimentos funcionales. Asimismo, en diciembre de 2006, la UE aprobó el Reglamento (CE) N°1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, que establece las definiciones, criterios específicos y condiciones de uso de estas declaraciones. Luego, a través de reglamentos específicos se publican los listados de declaraciones de propiedades saludables denegadas y/o autorizadas, especificando el nutriente, sustancia, alimento o categoría de alimento, el tipo de declaración, las condiciones y/o restricciones de uso del alimento, o bien una declaración o advertencia complementaria.

En Argentina, a la fecha no contamos con una definición consensuada sobre los

alimentos funcionales. Sin embargo, el Código Alimentario Argentino (CAA) en los artículos 1389 y 1390 definen a los alimentos probióticos y prebióticos, respectivamente.

Las antocianinas, existen en abundancia en el reino vegetal y confieren un color azul, rojo, violeta y morado a las frutas y verduras, incluyendo las bayas (Clifford, 2000)

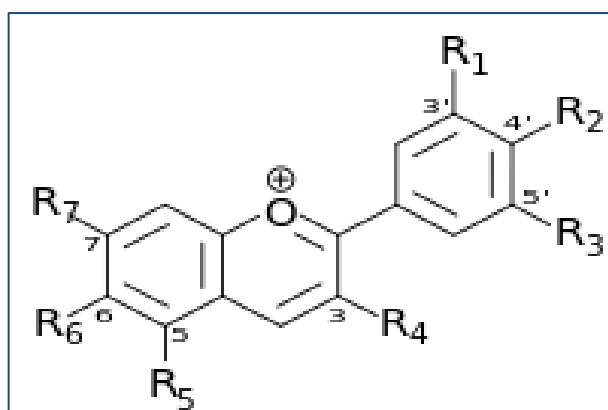


Figura 6: Estructura General de las Antocianinas

Fuente <https://es.wikipedia.org/wiki/Antocianina>

Estudios recientes demuestran que las antocianinas poseen potentes propiedades anticancerígenas, entre ello se demostró que el extracto de mora es rico en antocianinas y puede inhibir la metástasis del melanoma y potencialmente puede inhibir el cáncer gástrico (Huang et al. 2008).

El calafate está citado como fuente de alcaloides del tipo de las berberinas y antocianinas, con una aplicación medicinal y tintórea (Fajardo Morales et al. 1986; Fajardo Morales, 1987; Pomilio, 1973; Shaffer, 1985).

Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos solubles en agua visibles al ojo humano presentes en frutos, pétalos de flores y hojas de plantas (Harborne, 1994). Pertenecen al grupo de los flavonoides, metabolitos secundarios de los vegetales. Los flavonoides presentan actividad antioxidante ya que son excelentes dadores de electrones o hidrogeno con la formación de radicales intermedios relativamente estables (Nawar, 1993).

Las antocianinas muestran isomerización por cambios de pH, variando su color y estructura del anillo central siendo más estable en medio ácido. La coloración varía con el cambio de pH, de rojo en medio ácido, pasando por amarillo, a azul o violeta en medio alcalino, también puede formar una pseudo base incolora a pH 4,5. Debido a

estas características se utilizan las antocianinas en medio ácido o ligeramente neutro en la industria alimenticia como indicadores.

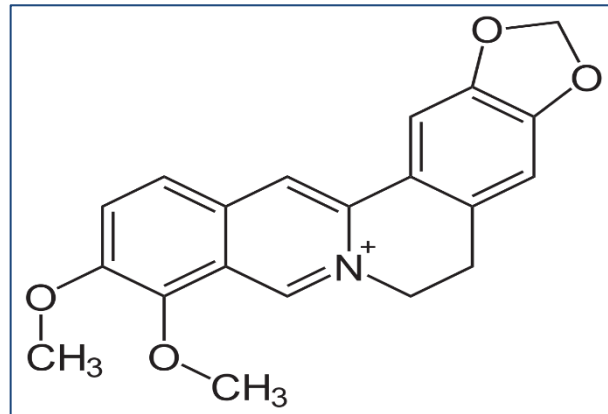


Figura 7: Estructura Química de las Berberinas

Fuente: <https://es.wikipedia.org/wiki/Antocianina>

Las hojas, la corteza y la madera se destacan por sus propiedades astringentes, febrífugas y digestivas, usándose también en afecciones hepáticas, como refrescantes y laxantes (Rapoport et al. 1999). Gracias a estas características, son utilizadas por la cultura mapuche (Muñoz et al. 2001), quienes también emplean los frutos en casos de resfríos y fiebre intermitente (Alonso y Desmarchelier, 2006). Las raíces y cortezas también eran usadas como tónico energizante. Los jugos de los frutos se usaron con fines oftalmológicos (Arena, 2016; Casamiquela, 2001).

La capacidad antioxidante de los frutos de calafate y su aplicación en tratamientos médicos ha sido estudiado, tal es el caso de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, indican que los extractos de calafate previenen la insulina resistencia y la diabetes, en el informe se menciona el estudio comparativo realizado por la Universidad de la Araucanía (Chile), en el mismo se demuestra que el calafate contiene valores superiores de actividad antioxidante y polifenoles totales respecto del arándano y similar al del maqui.

La berberina ha sido probada para determinar su propiedad antimicrobiana ante cepas de *Staphylococcus* spp (salvaje y mutante) a partir de infusiones de brotes de calafate y té comercial, se encontró una eficacia similar a la ampicilina. Esta actividad biológica se le atribuye al alcaloide berberina de isoquinolina (Pitta - Álvarez et al. 2008).

1 5. Composición Nutricional de *Berberis microphylla* G. Forst

La maduración de los frutos está gobernada por un conjunto de procesos físico-químicos y fisiológicos característicos para cada especie. Los atributos sensoriales como el sabor, firmeza, color, textura y aroma son factores determinantes en la calidad de las frutas. El sabor es uno de los aspectos de calidad más exigidos por el consumidor, estando condicionado en parte por el balance azúcar/acidéz del fruto. La pérdida de firmeza durante la maduración es el principal factor que determina la calidad de los frutos y su vida pos cosecha. El color atractivo de los mismos es debido a la presencia de antocianinas. La textura es determinada por la estructura de los polisacáridos (sustancias pécticas). El contenido en ácidos orgánicos determinan el sabor siendo también importantes en el procesamiento, pudiendo afectar la pérdida de sabor y las propiedades de gelificación de las pectinas.

Los atributos descriptos son indicadores de la madurez de los frutos y dependen estrechamente de la variedad y de las características climáticas y edáficas de la región.

Las variaciones ambientales inciden en la composición bioquímica de los frutos como también el momento en el cual se realice la cosecha. El stress abiótico y biótico pueden cambiar dramáticamente la composición química de los extractos de las plantas y su actividad farmacológica (Poulev et al. 2003). Así, la misma especie cosechada en diferentes momentos y de diferentes localidades, al ser analizadas pueden presentar resultados no reproducibles. Estas diferencias pueden aún ser expresadas durante diferentes momentos en el día, dado que la transcripción de al menos algunos genes que están envueltos en el metabolismo secundario de las plantas, como el de los flavonoides, muestran fluctuaciones diurnas (Thain et al. 2002). Particularmente la producción de antocianinas se ve afectada por la luz (intensidad y longitud de onda, siendo la luz azul y ultravioleta la más efectiva), temperatura, agua y niveles de carbohidratos (Arena et al. 2005).

Todos estos factores influyen en la calidad final del fruto, y deben considerarse a la hora de la cosecha y selección de las materias primas.

1.6 Fundamentos del trabajo

El abordaje del presente trabajo se enmarca en la caracterización físico química de la baya silvestre de la especie *Berberis microphylla* G. Forst, oriunda de las estepas patagónicas argentinas, particularmente las que crecen en la ciudad de El Calafate. Se realiza en el marco del trabajo final de la Carrera de Especialización en Análisis de los Alimentos de la FaCENA - UNNE, que tiene como premisa orientadora que lo abordado tenga un impacto positivo en la problemática definida, y en el contexto local.

La necesidad concreta es la falta de información del perfil físico químico del fruto, si bien diferentes trabajos científicos presentan información relacionada con la presencia y/o caracterización de los diferentes pigmentos orgánicos contenidos en el fruto y su capacidad antioxidante, el contenido de azúcar o el pH y minerales, no se encuentra en las bases de datos nutricionales de productos alimenticios información agrupada del fruto referido o sus productos elaborados.

2. OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo es realizar la caracterización físico química del fruto del calafate (*Berberis microphylla* G. Forst).

2.1 Objetivos Específicos

- Determinar el contenido en macronutrientes del fruto maduro de calafate (Proteínas, Agua y Azúcares)
- Cuantificar los Micronutrientes (minerales) presentes en los frutos (Cenizas, Nitrógeno, Calcio, Magnesio, Potasio, Fosforo, Sodio, Manganeseo, Cobre y Zinc)
- Valorar el contenido en compuestos bioactivos (antocianinas, fenoles, capacidad antioxidante utilizando métodos espectrofotométricos y cromatográficos.
- Proponer protocolos para efectuar las principales determinaciones analíticas de caracterización de los frutos de calafate.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Tecnología Química y Bromatología, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, de la Universidad Nacional de Nordeste, Provincia de Corrientes, Argentina; con la colaboración del Laboratorio Provincial de Calidad Agropecuaria de la Ciudad de Corrientes para la determinación de minerales.

3.1 Material de trabajo

Se cosecharon de modo manual frutos del calafate, la misma comprendió el periodo de finales de enero y principio de febrero de 2016, en una parcela ubicada en la Ciudad de El Calafate provincia de Santa Cruz (50.3383421° S, 72.3002689° O), que se encuentra en una zona alejada del casco urbano. En el lugar hay un conjunto de plantas de producción regular de frutos y que mantienen las mismas condiciones de crecimiento de las plantas, desarrollándose de forma silvestre (fig. 8).



Figura 8: (Izq. y Der) Frutos de calafate (*Berberis Microphylla* G. Forst) al momento de la Cosecha. Fuente: fotos propias

Se eligió el método de muestreo, “no probabilístico”, considerando que, si bien el arbusto es propio de la Región Patagónica, presenta el inconveniente que no es abundante y en muchos casos no presenta frutos o los arbustos se encuentran muy distantes entre sí. Para desarrollar el estudio, se recolectaron 4 kg de fruta. La cosecha se realizó cuando los frutos se encontraban con un 80% de madurez

aparente, según criterios descriptos más adelante (fig.9), fueron separados de diferentes elementos como, insectos, frutos dañados, frutas verdes y otros, luego fueron remojados en agua para eliminar demás residuos, el exceso de agua se eliminó por escurrido natural. Los frutos se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Para la selección de los frutos se consideró el estadio madurativo (fig. 9) y los atributos que se mencionan a continuación:

Tamaño: los que representen la media, es decir ni los más grandes ni los más pequeños, sino los que tenían un volumen promedio y cumplieran con los demás atributos de color y aspecto.

Color: se consideró viables a todos aquellos que presenten mayor intensidad en su color púrpura, considerando la referencia del color que presenta el fruto según figura 9.

Aspecto: para este atributo se tomó como premisa que todos los frutos presenten uniformidad en su tamaño, color y que no presenten lesiones en su piel o algún deterioro visible.

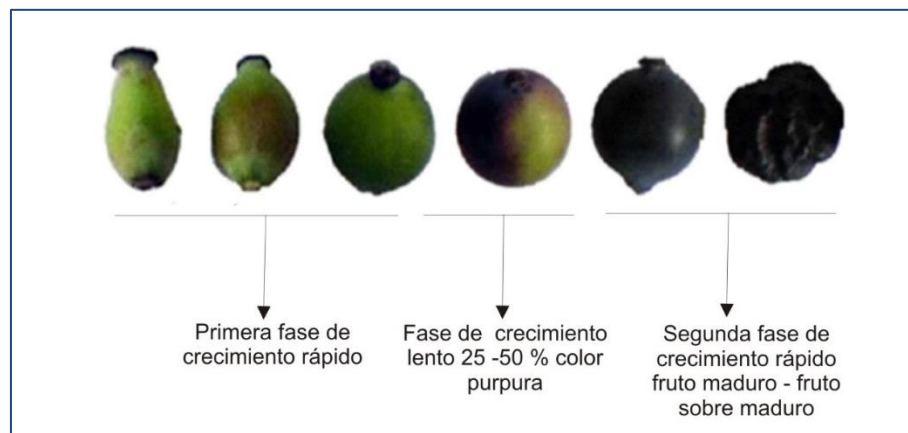


Figura 9: Evolución del crecimiento del fruto *Berberis Microphylla* G. Forst a lo largo de la Ontogenia. Fuente: Arena (2016)

Las muestras de trabajo fueron seleccionadas al azar de distintos puntos del recipiente contenedor, para cada determinación se procesaron 3 muestras diferentes, todas con el mismo criterio.

3.2 Determinaciones

3.2.1 pH Y Acidez

Para la determinación de pH y acidez se trabajó con un pH metro METROHM 692Ph/Ion meter y un agitador magnético METROHM 728 Stirrer. Siguiendo la metodología descrita en AOAC (1980). Una muestra de 200 g de fruto procesado y se fraccionó en 3 muestras de 10 g y se agregaron 100 mL de agua destilada a cada una, luego se sonicaron por 5 minutos, se filtró por papel y sobre el filtrado se midió pH inicial, luego se tituló con NaOH 0,1 N hasta alcanzar pH 8,2. Los valores de Acidez fueron expresados en milimoles equivalentes de ácido cítrico por gramo.

3.2.2 Cenizas

Se pesaron por triplicado en capsulas de porcelana muestra de puré de frutos de calafate, se procedió a su calcinación a la llama, las cápsulas con el residuo fueron colocadas en mufla a 500 °C durante 2 horas. Se dejaron enfriar por 30 minutos y se procedió al pesaje. Se obtuvo el valor por diferencia de pesadas. Los resultados se expresaron en % cenizas /100 g TF.

3.2.3 Contenido de agua

Se pesaron con precisión de 0,1 mg muestras de puré de fruto en placas de Petri (15 x 2 cm) previamente secas y taradas. El ensayo se realizó mediante el método de desecación en estufa de vacío a 66°C. Luego de 24 hs se procedió al pesaje de las cápsulas y se calculó el % de pérdida de masa (agua).

3.2.4 Actividad Antioxidante

Se preparó un extracto con 10 g de muestra y 30 mL de metanol 80% según metodología propuesta por (Padda y Picha; 2008a), esta mezcla se agitó a 4°C durante 10 minutos y luego se filtró por papel de filtro antes de su uso.

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó una solución de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) 0,076 mM en metanol puro. Se mezclaron 6 mL de solución de DPPH con 400 µL del extracto, adecuándose las diluciones para ajustar las lecturas entre las absorbancias 0,200 y 0,800 UA. La mezcla de reacción se dejó reposar en oscuridad por 120 min y finalmente se leyó la absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV -1800.

Se calculó el porcentaje de Inactivación (%): $\%I = (A_0 - A_{120}) / A_0$

Donde A_0 es la absorbancia de un blanco de reacción preparado con 400 μ L de metanol y A_{120} es la lectura de absorbancia de la muestra después de 120 min. Se realizó una curva de calibración utilizando ácido Clorogénico en un rango de concentraciones de 0,91 a 5,96 mg/mL. Se prepararon tres extractos por cada muestra y las determinaciones se realizaron por duplicado. Los resultados se expresaron como mmol eq. ácido Clorogénico /g Tejido Fresco (TF).

3.2.5 Antocianinas

Se colocaron 0,60 g del puré en un tubo de centrifuga al cual se le agregó posteriormente 10 mL de Metanol - HCl 0,01% v/v. El tubo con la muestra y solución metanólica se colocaron en baño sonicador durante 10 min. Se filtró con papel de filtro y el residuo se lavó con 3 fracciones de 2 mL de metanol - HCl, a continuación, se recogió todo el residuo en un tubo de centrifuga y se agregó 10 mL de Metanol - HCl 0,01% v/v, se repitió la operación anterior. Todos los filtrados fueron transvasados a un matraz de 50 mL y se llevó a volumen con metanol - HCl 0,001 % v/v. A continuación, se realizaron las determinaciones espectrofotométricas por medio del método pH Diferencial (Giusti, Ronald; 2001). Para desarrollar el método se prepararon dos soluciones buffer de trabajo, una a pH 4,5 y otra a pH 1,0. Para el buffer pH 4,5 se utilizaron 400 mL de Acetato de sodio 1 M y 240 mL HCl 1N y 360 mL de agua destilada. Para el buffer pH 1,0 se utilizaron 125 mL de KCl 0,2 N y 385 mL de HCl 0,2 N. Se trabajó con muestras triplicadas de 1,1 mL de extracto, cada una se colocó en un matraz de 10 mL, se llevó a volumen con el buffer correspondiente y se midió la absorbancia a 510 nm y 700 nm respectivamente.

Para los cálculos se consideró:

Antocianinas monoméricas: (mg/mL) =	<u>Dónde:</u> PM = 445g/mol	FD = factor de dilución ξ = 29600
Absorbancia = $(A_{510} \text{ pH} = 1 - A_{700} \text{ pH} = 1) - (A_{510} \text{ pH} = 4,5 - A_{700} \text{ pH} = 4,5)$		
Antocianinas totales (mg/g de fruta) =	$\frac{\text{Ant. Monoméricas (mg/mL)} \times \text{Vol. Final} \times \text{Vol. del extracto metanólico}}{\text{Peso de la muestra (g)} \times \text{Volumen de la alícuota (mL)}}$	

3.2.6 Azúcares Totales

Se prepararon extractos con 5 g de frutos y 30 mL de etanol 96° a 4°C utilizando un procesador manual. Concluida la operación se filtró utilizando filtro de papel por un embudo Büchner y sobre el filtrado se llevó a cabo la determinación espectrofotométrica. Para la determinación de Azúcares totales, se siguió la metodología propuesta por Southgate (1976) con mínimas modificaciones. Se trabajó con una solución de antrona (9,10 dihidroxi - 9 – oxoantraceno) 0,07% en H₂SO₄ 66% (v/v). La reacción se llevó a cabo con 100 µL de extracto etanólico, 4 mL de antrona en H₂SO₄ y 1,9 mL de H₂SO₄ al 66% (v/v), se incubó a 100°C durante 15 min, luego se enfrió rápidamente en baño de agua y se leyó en una longitud de onda de 620 nm, utilizando un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800. Los resultados se expresaron en g glucosa/100 g Tejido Fresco (TF).

3.2.7 Fenoles Totales

Se preparó un extracto metanólico como se describió previamente para actividad antioxidante. Sobre el extracto adecuadamente diluido se determinó el contenido de fenoles totales utilizando el reactivo de Folin Ciocalteu, según la metodología propuesta por Natic et al. (2015). Se mezclaron 500 µL de extracto (diluidos 1/20) con 500 µL de agua destilada y 2 mL de Reactivo de Folin Ciocalteu (10% v/v) se mezcló y se dejó en reposo por 5 minutos, luego se agregaron 2,5 mL Na₂CO₃ al 7,5%. La mezcla se dejó 60 minutos en oscuridad y finalmente se leyó absorbancias a 765 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV -1800. Se realizó una curva de calibración utilizando ácido Clorogénico y los resultados se expresaron como mg ácido Clorogénico eq/g Tejido Fresco (TF).

3.2.8 Flavonoides

Se utilizó el extracto preparado para la determinación de fenoles totales. Se siguió la metodología descrita por Kim et al. (2003), para ello se mezclaron 500 µL de extracto metanólico 80 % diluido adecuadamente con 500 µL de agua destilada y 150 µL de NaNO₂ al 5 %, se dejó reposar 5 min y luego se agregaron 150 µL de AlCl₃ al 10 %, transcurrido 6 min se agregó 1 mL de NaOH 1 N y 1,2 mL de agua destilada. La lectura se realizó a 510 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV -1800. Se construyó una curva calibración utilizando catequina como patrón. Los resultados se expresaron en mg de catequina/100g TF.

3.2.9 Identificación de Compuestos Fenólicos por HPLC

Los compuestos fenólicos fueron identificados utilizando un equipo de HPLC Shimadzu (Japón – Tokio) con dos bombas 10AT/20AT, con módulo de comunicación CMB-20A, un detector con arreglo de diodos SPD-M20A y con un detector UV- Vis SPD-10 A. Los análisis se realizaron utilizando una columna ODS HYPERSIL 250 x 4,6 mm, 5 µm y una fase móvil con flujo de 1 mL/min y gradiente binario formado por Ácido acético 0,1% (Solución A) y Metanol: Ácido acético 0,1% (Solución B). Se utilizó el siguiente gradiente: al tiempo cero 10% B - 25 min 40% B - 35 min 80% B - 40 min 80% B - 45 min 10 % B - 50 min 10% B. La longitud de onda de registro fue 280 nm. Se trabajó con dos metodologías de extracción de compuestos fenólicos: en la primera se procesaron 10 g de muestra con un procesador manual Philips y se agregaron 10 mL de metanol/agua al 80 % (v/v), luego se sonicó por 60 min y se dejó en agitación magnética durante 16 h, al concluirse el tiempo se centrifugó durante 15 min a 4500 rpm y se separó el sobrenadante. Con el pellet sobrante se repitió el procedimiento anterior por duplicado, en total se obtuvieron 3 extractos.

En la segunda metodología se pesaron 5 g de muestra procesada previamente para la primera metodología, se colocó en un balón al cual se agregaron 25 mL de metanol - HCl 1 % v/v y 12,5 mg de BHT (butil hidroxitolueno) más 5 mL de Ácido Clorhídrico 1,2 M. Se calentó a reflujo durante 2 h a 90°C, luego se enfrió y se centrifugó en tubos a 5000 rpm por 10 min. A continuación, se filtró por papel.

Todos los extractos fueron filtrados por filtro Nylon de 0,45 micras antes de su inyección al equipo de HPLC. Se trabajó con soluciones de patrones de ácidos Clorogénico, p-cumarico, cafeico, elagico, quercetina, gálico, ferúlico y 4-hidroxibenzoico, para lograr la identificación de las especies por comparación de los espectros obtenidos con el detector DAD.

3.2.10 Minerales Y Proteínas

Para las determinaciones de minerales y proteínas se solicitó colaboración del Laboratorio Provincial de Calidad Agropecuaria perteneciente al Ministerio de la Producción de la Ciudad de Corrientes.

La determinación de Nitrógeno se realizó a partir de una digestión húmeda con ácido sulfúrico y se cuantifico por el método de Kjeldahl, la estimación de proteínas se realizó multiplicando el valor de nitrógeno obtenido por el factor de 6,25. Factor establecido para dicha metodología (Kjeldahl) que, en promedio, en las proteínas el

contenido de nitrógeno es 16%. Así, el porcentaje de proteína en un alimento es calculado como el porcentaje de nitrógeno multiplicado por 6.25 ($100/16 = 6.25$). Esta medida se llama la proteína cruda.

Los elementos calcio, magnesio, cobre, manganeso, y zinc se determinaron por espectrometría de absorción atómica, en tanto el potasio y el sodio se determinaron por fotometría de llama. Para los iones calcio, magnesio, potasio, sodio, cobre, manganeso, zinc y fósforo se realizó de una mineralización húmeda en ácido nítrico.

El fósforo se determinó mediante el método azul Murphy y Riley (1962) a partir de la muestra anteriormente mencionada.

Todas las determinaciones de minerales fueron hechas a partir de 100 g de Tejido Fresco calcinado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos reflejan las características propias de la variedad, las condiciones ambientales, al momento de la cosecha y el estado madurativo de los frutos recolectados.

El valor de pH promedio fue de $3,33 \pm 0,02$, mientras otros autores informaron valores de en un rango de 2,5 y 3,5 en frutos con distintos grados de madurez. La Acidez tuvo un valor medio de $4,86 \pm 0,15$ mmol eq. ac. Cítrico/g, mientras que el contenido de agua fue de $70,8 \% \pm 0,4$. Diferentes valores de humedad fueron obtenidos por algunos autores en pulpa y semillas, siendo estos similares en algunos aspectos, tanto Pino et al. (2018) como Ruiz et al. (2010) obtuvieron valores de 75,6 y 75,0 % de humedad en pulpas. Mientras que Boeri et al. (2020) y Dalzotto et al. (2019) obtuvieron ambos 93,3 %. Si bien existe diferencia entre los autores citados, los valores obtenidos en el presente trabajo son aproximados a los obtenidos por los primeros autores.

El contenido de cenizas fue de 3,76 %, y se enviaron muestras al Laboratorio Provincial de Calidad Agropecuaria perteneciente al Ministerio de la Producción de la Provincia de Corrientes, en el cual se realizaron las determinaciones de los elementos. Calcio, Magnesio, Potasio, Fosforo, Sodio, Cobre, Zinc, Manganeso y Proteínas. Pino et al. (2018) como Ruiz et al; (2010) obtuvieron valores de 0,6 % y 0,9 % de cenizas a partir de pulpas. Mientras que Boeri et al; (2020) y Dalzotto et al; (2019) obtuvieron en pulpas 3,95 % y 3,65 %, en tanto en semillas obtuvieron ambos 2,21 %. Cabe destacar que en el presente estudio se trabajó con muestras procesadas a partir de frutos enteros (pulpa y semilla).

La concentración de azúcares totales en la muestra fue de $3,50 \pm 0,11$ g glucosa/100 g tejido Fresco. Respecto del trabajo realizado por Ruiz et al. (2010) se obtuvieron cantidades mínimas de alrededor al 0,90 % y máximos de 7,2 % para la suma de glucosa y fructosa (periodo de cosecha 2007 – 2008). Por lo que los valores hallados en este trabajo se encuentran en el rango descripto por el autor mencionado. Sin embargo, Arena et al. (2005), encontraron cantidades superiores en el orden del 8 al 10 % del peso fresco del fruto, considerando que para la misma se contó con frutos de 98 días desde su floración (finales de febrero) con un 100 % de coloración purpura.

La Actividad Antioxidante determinada por el método DPPH fue del $171,03 \pm 14,5$ mmol eq. ácido Clorogénico/g Tejido Fresco (TF), de acuerdo a los estudios presentados por Zapata et al. (2014) en arándanos se obtuvo valores de 5730 ± 103 y 4872 ± 124 mg EAA/100 mL, medidos por los métodos ABTS y DPPH.

Un determinante importante del contenido de Antocianinas totales es la etapa de madurez en la que se encuentra el fruto al momento de la cosecha, en particular el contenido fenólico total disminuye cuando el fruto alcanza su madurez, mientras aumenta sustancialmente el contenido de antocianinas totales y los sólidos solubles (Kalt et al. 2003). Las Antocianinas totales fueron de $260,82 \pm 11,8$ mg/100 g de TF. Para Arena (2016) el contenido de antocianinas encontrado en los frutos de *B. microphylla* en la madurez (753 mg/100 g de peso fresco de frutos) fue comparable al reportado por Ruiz et al. (2010) en *B. microphylla* del sur de Chile, encontrándose diferencia en el valor obtenido en esta investigación, posiblemente influenciado por la diferente etapa de maduración del fruto.

De acuerdo a otras investigaciones (Ruiz et al. 2013; Schmeda-Hirschmann et al. 2019) los niveles más altos de antocianinas se encuentran en el género *Berberis*, siendo mayores en *B. microphylla* (calafate), seguido de *B. empetrifolia* (calafatillo) y *B. ilicifolia* (michay). Las principales antocianinas presentes en el calafate son delfinidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido, malvidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido, delfinidina-3-rutinosido, petunidina-3-rutinosido, malvidina-3-rutinosido, cianidina-3-rutinosido, peonidina-3-rutinosido, petunidina-3,5-dihexósido

Los niveles de antocianinas totales detectados en el género *Berberis* fue más alto que los niveles detectados en otras frutas consumidas, como los arándanos, frutillas, moras, frambuesas o murtilla (Ruiz et al. 2013). Las frutillas mostraron siete veces menos antioxidantes que el calafate e incluso los arándanos, que se ha demostrado que ocupan el primer lugar entre las frutas en los valores de ORAC - Oxygen Radical Absorbance Capacity (Rodoni et al. 2014).

Por otro lado, *B. microphylla* (calafate) tiene una capacidad de captación de radicales 10 veces mayor que la de la manzana, la naranja y la pera (Rodoni et al. 2014). Reyes-Farias et al. (2015) estudiaron tres berries: maqui, calafate y arándano, concluyendo que el contenido de polifenoles y de antocianinas, y la actividad antioxidante es mayor en el maqui. El maqui presentó $38,9 \pm 1,70$ mmol Fe+2/100 g peso seco y el arándano $5,9 \pm 0,10$ mmol Fe+2/100 g peso seco (Reyes-Farias et al.

2015), mientras que el calafate obtuvo $38,44 \pm 0,08$ mmol Fe²⁺/100 g peso seco. Este método mide la reducción de Fe³⁺ a Fe²⁺ por lo que a mayor cantidad de Fe²⁺ formado, mayor es el poder antioxidante de la muestra. Es decir, el calafate y el maqui tendrían un poder antioxidante similar y superior al del arándano utilizando esta metodología.

El contenido de Fenoles Totales fue de $0,20 \pm 0,02$ mg de ácido Clorogénico /100 g TF. Para Zapata et al. (2014) el contenido de Fenoles Totales en arándanos fue de 1424 ± 67 mg GAE/100 mL.

Los Flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc.

El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. El resultado de Flavonoides en el presente trabajo fue de $287,02 \pm 39,86$ mg de catequina/100g TF, Arena (2016) obtuvo una máxima concentración de Flavonoides en aquellos frutos cuyas plantas no fueron fertilizadas ($200,2$ mg equivalentes de (+)-catequina/100 g peso fresco de frutos y $7,6$ mg equivalentes de (+)- catequina/g peso seco de frutos)

La identificación de los compuestos fenólicos por HPLC (Fig. 10) permitió definir la presencia mayoritaria de los ácidos fenólicos, gálico, clorogénico y el flavonoide quercetina. (Fig. 11 y 12)

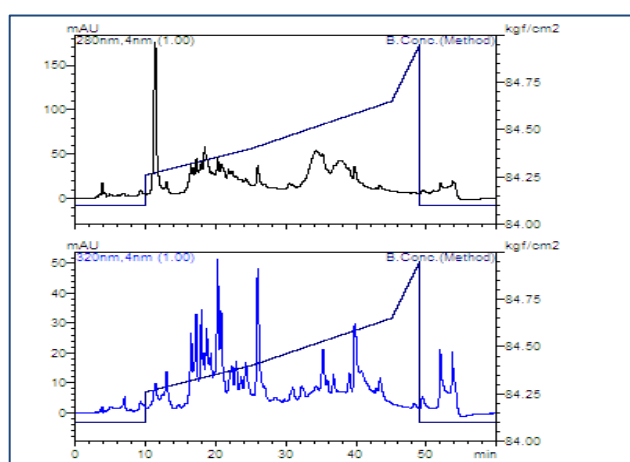


Figura 10: Cromatograma HPLC de Extracto entero del fruto de calafate (*Berberis Microphylla* G. Forst) a 280 nm.

Estos resultados son coincidentes con la investigación llevada adelante en diferentes lugares de Chile en la evaluación de las propiedades antioxidantes de calafate (E. Mariangel, M. Reyes-W Lobos et al. 2012) en el cual identificaron además de los ácidos gálicos y clorogénicos, los ácidos cafeicos y cumáricos y flavonoides.

En otras investigaciones también se pudieron identificar los ácidos clorogénicos, gálico, ferúlico, quercetina y rutina en frutos de *B. microphylla* de plantas crecidas en Chile (Mariangel et al. 2013; Ramírez et al. 2015). Resultados similares fueron encontrados por Ruiz et al. (2010) que pudieron identificar miricetina, rutina y quercetina en frutos de calafate.

En la figura 11 se puede observar la presencia mayoritaria de Ácido Clorogénico en la muestra analizada de calafate.

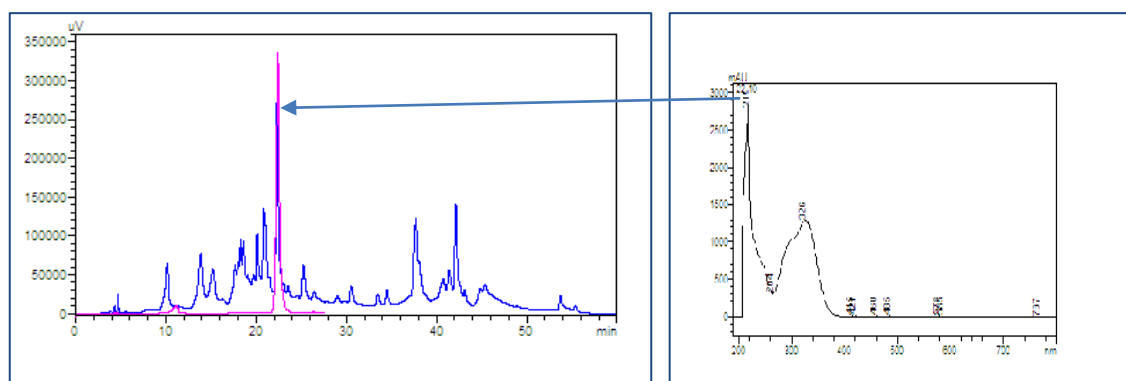


Figura 11: (IZQ) Cromatograma HPLC de Extracto entero a 320 nm – línea azul. Línea rosa Ácido clorogénico - (DER) Espectro pico a 22 min.

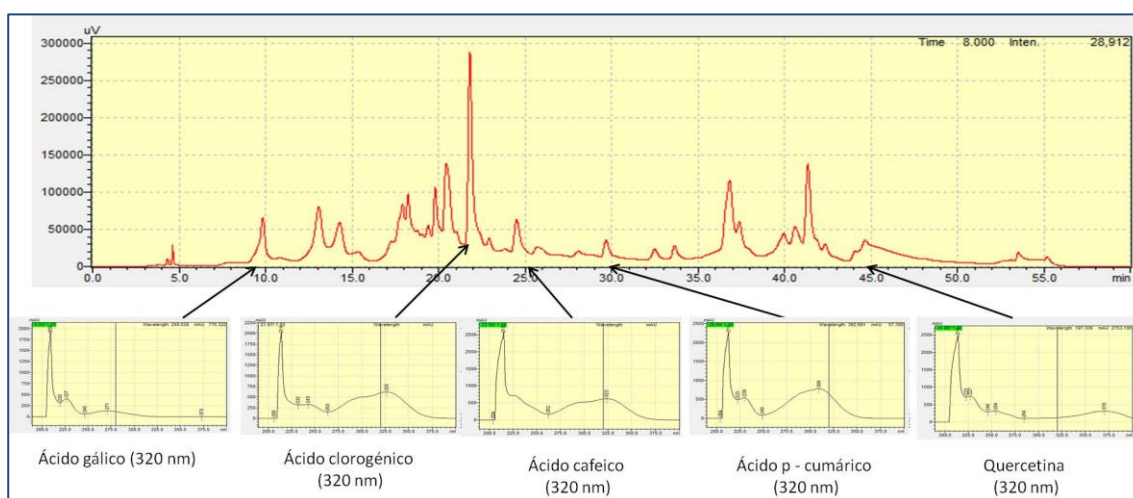


Figura 12: **(Arriba)** Cromatograma HPLC de Extracto entero a 320 nm – **(Abajo)** Espectros de Absorción de los Fenoles identificados

Dalzotto et al. (2019), utilizando la misma técnica (HPLC) pudieron identificar 14 compuestos fenólicos en frutos de calafate. De éstos, 9 fueron clasificados como “no antocianos”, entre los cuales los mayoritarios fueron el ácido cafeico y la quercetina. Los 5 compuestos restantes fueron antocianos, siendo las antocianinas mayoritarias delphinidina 3-O-glucosido, la delphinidina 3-O-glucosido y la malvidina 3-O-glucosido.

Se encontraron los siguientes resultados para los micronutrientes analizados nitrógeno 2,11%, calcio 1,93 %, magnesio 0,76 %, potasio 1,38 %, fósforo 0,03%, sodio 0,01%, cobre 35,61 ppm, zinc 18,99 ppm, manganeso 47,48 ppm y Proteínas 13,20 %. En el Estudio publicado por Cabrera et al. (2021) de la Universidad Nacional de Entre Ríos, en el cual se considera el estudio de calcio, magnesio, potasio, hierro, zinc, cobre y manganeso en arándanos de las variedades Jewel, Misty, Star, Emerald, Snowchaser, O’Neal, Springhigh y San Joaquín. El contenido de cada mineral dependió de la variedad. El rango de concentración de calcio fue 54,7 - 206,1 mg/100 g; de magnesio, 31,5 - 63,0 mg/100 g; de potasio, 417,6 - 1073,0 mg/100 g, de hierro, 3,2 - 7,5 mg/100 g; de zinc, 1,2 - 2,7 mg/100 g; de cobre, 0,4 - 1,1 mg/100 g y de manganeso, 0,6 - 5,1 mg/100 g.

Para la obtención del valor de proteínas en el presente trabajo se utilizó el factor de 6,25 obteniéndose un valor de 13,20%, estudios similares encontraron valores de pulpa 2,8 % (Pino et al. 2018), pulpa 1,33 % y en semilla 13,65 % (Boeri et al. 2010), pulpa 1,33 % y en semilla 13,65 % (Dalzotto et al. 2019) y (Ruiz et al. 2010) en pulpa 2,6 %. Todos los valores referenciados se han obtenidos a partir del análisis proximal realizado por los autores en bayas frescas de calafate.

5. CONCLUSIONES

Se caracterizaron los frutos de calafate y los valores obtenidos reflejan que los mismos son dependientes de diferentes factores, como el tiempo de floración, las condiciones climáticas favorables como son la exposición al sol y las lluvias. La zona geográfica en la que se desarrolla la planta condiciona las características del fruto, haciendo que no haya uniformidad en las condiciones fisiológicas en los frutos recolectados en el mismo periodo de tiempo. Lo que refleja las diferencias propias de cada población de arbustos aun cuando las distancias no sean tan significativas.

Estos resultados se encuentran en el rango de los resultados obtenidos por otros autores.

Determinación	Valores obtenidos	Unidad de medida
pH	3,33 ± 0,02	
Acidez	4,86 ± 0,15	mmol eq.ac. Cítrico/g tejido fresco
Cenizas	3,76	% (referido a 100 g TF)
Contenido de Agua	70,6 ± 0,4	%
Actividad Antioxidante	171,03 ± 14,5	mmol eq. ácido Clorogénico /g Tejido Fresco
Antocianinas	260,82 ± 11,8	mg/ 100 g TF
Azúcares Totales	3,50 ± 0,11	g de glucosa/100 g TF
Fenoles Totales	0,20 ± 0,02	mg de ácido clorogénico /100 g TF
Flavonoides	287,02 ± 39,86	mg de catequina/100 g TF
Proteínas Totales	13,20	%
Nitrógeno	2,11	%
Calcio	1,93	%
Magnesio	0,76	%
Potasio	1,38	%
Fosforo	0,03	%
Sodio	0,01	%
Manganeso	47,48	ppm
Cobre	35,61	ppm
Zinc	18,99	ppm
Ácidos Fenólicos	Gálico, Clorogénico y el Flavonoide Quercetina	HPLC

Finalmente, se propone para la caracterización de los frutos del calafate utilizar las siguientes técnicas:

Determinaciones	Metodología propuesta
pH	Metodología AOAC 1980
Acidez	Metodología AOAC 1980
Agua	Desecación en Estufa de vacío a 66°C por 24 hs
Azúcares totales	Southgate 1976
Proteínas	Método de Kjeldahl
Cenizas	Calcinación en mufla a 500°C por 2 horas
Calcio	Espectrometría de Absorción Atómica
Magnesio	Espectrometría de Absorción Atómica
Potasio	Fotometría de llama
Fosforo	Método propuesto por Murphy y Riley 1962
Sodio	Fotometría de llama
Cobre	Espectrometría de Absorción Atómica
Zinc	Espectrometría de Absorción Atómica
Antocianinas	Método de pH diferencial
Fenoles Totales	Método de Folin Ciocalteau adaptado
Flavonoides	Método propuesto por kim y col; 2003
Actividad antioxidante	Método DPPH
Quercetina, ácidos gálico y clorogénico	Por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

A fin de establecer un valor definido de los nutrientes para los frutos que crecen en la zona y que son aprovechados por los elaboradores locales, es necesario abordar aspectos más precisos de las condiciones ambientales óptimas para la cosecha con el fin de establecer los periodos más propicios para la cosecha, momentos en los cuales los frutos contienen sus mejores atributos nutricionales.

Teniendo en cuenta que el Código Alimentario Argentino presenta limitaciones a la hora de autorizar la comercialización de productos que se encuadren como “nutracéuticos” y que tienen como requisito la incorporación de información científica que respalde el atributo del alimento que se quiere asociar con el consumo del mismo y su efecto positivo en la salud del consumidor, se considera de importancia el aporte realizado con el presente trabajo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J, Desmarchelier, C. (2006). Plantas medicinales autóctonas de la Argentina: bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. Fitotecnica Ed. 680. Buenos Aires, Argentina.
- Arena M.E., Martinez Pastur G., (1995). Propagación de frutales menores nativos de los Bosques Andino- Patagónicos: El Calafate. Presencia 10 (37). 5-7.
- Arena M.E., P Peri., G Vater (1995). Producción de frutos y crecimiento de *Berberis heterophylla* Juss. en dos sitios de la Patagonia austral - Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. Vol. 16 (1), 2001
- Arena M.E., (2016) - Estudio de algunos fenómenos morfofisiológicos y cambios bioquímicos en *Berberis microphylla* G. Forst. (Sinónimo B. Buxifolia Lam.) Asociados a la formación y maduración de frutos en Tierra del Fuego y su relación con la producción de metabolitos útiles. Tesis Doctoral- Universidad Nacional del Sur Bahía Blanca, Argentina.
- Arena, ME, Vater, G. (2005). Native and introduced species of small fruits in Austral Patagonia, Tierra del Fuego. En: "Fruits: Growth, Nutrition, and Quality". Editor: Dris R. (WFL Publisher, Helsinki.Finlandia). ISBN: 952-99555-0-2. 220
- Base de datos española. <http://www.bedca.net/bdpub/index.php> último ingreso 24/3/2018
- Boeri, P., Piñuel, L., Dalzotto, D., Monasterio, R., Fontana, A., Sharry, S., ... Carrillo, W. (2020). Argentine Patagonia barberry chemical composition and evaluation of its antioxidant capacity. *Journal of Food Biochemistry*, 44(7). 1–11.
- Bottini M.C., Bustos C., Bran D., (1993). Arbustos de la Patagonia, Calafates y Michay. Presencia 8 (30). 5-9.
- Casamiquela, RM. (2001). Proyecto etnobotánico de la Patagonia, primer informe. Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Centro Nacional Patagónico (CENPAT), Puerto Madryn.
- Cabrera, C. Carlier, E. Zapata, L.M. (2021) Composición mineral de arándanos (*Vaccinium corymbosum*) cultivados en la región noreste de Argentina. Universidad Nacional de Entre Ríos. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, vol. 22, núm. 1, 2021
- Céspedes, C., M. Valdez, J. Ávila, M. EL-Hafidi, J. Alarcón, Y O. Paredes. (2010). perfil fitoquímico y la actividad antioxidante de negro salvaje de Chile - bayas, *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz (Elaeocarpaceae). Food Chemistry 119. 886-895.

Código Alimentario Argentino Ley 18.284 y sus Reglamentaciones.

<https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario> - última visita: 20/03/202

Dalzotto, D., Boeri, P., & Piñuel, L. (2019). *Biodiversidad Regional: Estrategias de Propagación, Propiedades del Fruto del Calafate (Berberis microphylla G. Forst)*. Universidad Nacional de Río Negro - Sede Atlántica - Licenciatura en Ciencias del Ambiente. 17 – 20

Decker, E. A. (1997) Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutritional Reviews*. 1997;55 (1). 396-398.

Elliot (1992). Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study *Biochem Pharmacol* 44 (8). 1603-1608.

Henriques A.T.; Basan V.L.; Raseira M.B.; Zuanazzi J/A.S. (2004). Antocianos e Capacidade Antioxidante de Frutas. Actas (editadas en CD) del 2° Simposio Nacional do Morango, 1° Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul: 271-280. 6 al 8 de Julio de 2004.

Huang HP, Shih YW, Chang YC, Hung CN, Wang CJ (2008) Chemoinhibitory effect of mulberry anthocyanins on pathway-involved melanoma metastasis / PI3K Ras. *J. Agric Food Chem* 56. 9286-9293.

Fajardo Morales V., (1987). Estudio químico de las especies chilenas del género *Berberis*. *Revista Latinoamericana de Química* 18. 46-50.

Fajardo Morales V., Podestá F., urzúa A., (1986). Reseña de los alcaloides encontrados en el género *Berberis* de Chile. *Revista Latinoamericana de Química* 16, 141-156.

Flores Cantillano F. (2004). Fisiologia e Manejo na Colheita e Pós-Colheita de Morangos. Actas (editadas en CD) del 2° Simposio Nacional do Morango, 1° Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul: 145-160. 6 al 8 de Julio de 2004.

Food and agriculture organization (FAO)- Base de datos -

<http://www.fao.org/infoods/infoods/tables-and-databases/faoinfoods-databases/en/> último ingreso 24/3/2018

Giusti M. and Ronald E. (2001) Wrolstad *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F1.2.1-F1.2.13

Harborne, J.B. (1973) A chemotaxonomicsuway of flavonoids and simple phenok in leaves of the Ericaceae. *Botanical journal of de linnean society* 66. 37 -54.

Instituto de investigaciones agropecuarias de chile

<http://www.inia.cl/wp-content/uploads/2015/06/Calafate-otro-super-berry-Chileno.pdf> - último ingreso 25/3/2018

Instituto nacional de tecnología agropecuaria

<https://inta.gob.ar/noticias/situacion-de-las-frutas-finas-berries-en-diferentes-regiones-argentinas> - ultimo ingreso 16/8/2018

Job, M. M. (1942). Los *Berberis* de la región del Nahuel-Huapi. Rev. del Museo de la Plata (Sección Botánica), 5. 21-72.

Kalt W, Forney CF, Martin A. Prior RI. (1999) Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits, Journal of Agricultural and food Chemistry, 47. 4638 – 4644.

Kim. D.k., jeong.S.W., lee. CY., (2003) -Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums - Food Chemistry 81. 321–326

Landrum L.R. (1999) - Revision of *Berberis* (*Berberidaceae*) in Chile and adjacent Southern Argentina. - Ann.Missouri Bot. Gard., 86(4). 793-834.

Mariangel, E., Reyes-Díaz, M., Lobos, W., Bensch, E., Schalchli, H., & Ibarra, P. (2013). The antioxidant properties of calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four different locations in southern Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 40(1), 161–170.

Mariangel, E. Marjorie Reyes Díaz, Walter Lobos Álvarez, Emma Bensch, Heidi Schalchli, Pamela Ibarra. (2013). The antioxidant properties of calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four different locations in southern Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura, ISSN-e 0718-1620, Vol. 40, Nº. 1. 161-170.

Martínez E.; Riádigos E.. (1993). Fruta fina en los valles patagónicos. Presencia VIII 30. 22-24.

Mullen W.; Crozier A. (2002). Soft fruit as sources of dietary antioxidants. Actas 8th IS Rubus and Ribes. Acta Hort. 585, ISHS. 459-465.

Nawar, W. W. (1993) Lípidos en: Fennema, U. R. Química de los Alimentos (traducido del original en inglés por Calvo Rebollar, P) Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España: 223 - 227

Nutrición y educación alimentaria. Ficha N° 17 “Alimentos funcionales”.

http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/fichaspdf/Ficha_17_AlimFunc.pdf Último ingreso 24/2/2018

Orsi M.C. (1984). *Berberidaceae*. En: Flora Patagónica IV, Tomo VIII. Ed. INTA. Buenos Aires, Argentina, 325-348.

Padda, M.S.; Picha, D.H. (2008a). Quantification of phenolic acids and antioxidant activity in sweetpotato genotypes. *Scientia Horticulturae*, 119, 17 - 20.

- Pitta-Alvarez, S. I., Medina-Bolivar, F., Alvarez, M. A., Scambatto, A. A., & Marconi, P. L. (2008). In vitro shoot culture and antimicrobial activity of *Berberis buxifolia* Lam. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44(6), 502–507.
- Pino, M., Pérez, R., Vergara, C., Domínguez, E., & Zamora, O. (2019). *MICHAY: berry nativo de amplia distribución con metabolitos de interés para la industria de alimentos*. (September), 1–4.
- Pino, M. T., Zamora, O., McLeod, C., Águila, K., Ojeda, A., & Vergara, C. (2018). *Calafate: propiedades del fruto y su potencial como ingrediente*. (May), 20–23.
- Pomillo A.B. (1973). Anthocyanins in fruits of *Berberis buxifolia*. *Phytochemistry* 12, 218-220.
- Poulev A.; O'Neal J.M.; Logendra S.; Pouleva R.B.; Timeva V.; Garvey A.S. et al. (2003). Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *J. Med. Chem* 46. 2542-2547.
- Rapoport, E, Ladio, A, Sanz, E. 1999. Plantas nativas comestibles de la Patagonia andina argentino-chilena. Dpto de Ecología, Centro Regional Universitario Bariloche. Ediciones de Imaginaria. Bariloche. Pág. 81
- Resolución Conjunta SPR y RS y SAGP y A N° 149/05 y N° 683/05 – Reglamento Técnico MERCOSUR para Rotulación de Alimentos Envasados. Buenos Aires, 1387 08/setiembre/2005.
- Resolución Conjunta SPR y RS y SAGP y A N° 149/05 y N° 683/05 – Reglamento Técnico MERCOSUR para Rotulación de Alimentos Envasados. Buenos Aires, 1387 08/setiembre/2005.
- Reyes- Díaz., W. Lobos., E. Bensch., H schalchil y P ibarra., (2013). Las propiedades antioxidantes de frutas de calafate (*Berberis microphylla*) desde cuatro lugares diferentes en el sur de Chile. *Cien. Inv. Agr.* 40 (1).161-170.
- Reyes-Farias, M, Vasquez, K, Ovalle-Marin, A, Fuentes, F, Parra, C, Quiral, V, Jimenez, P, Garcia-Diaz, DF. (2014). Chilean native fruit extracts inhibit inflammation linked to the pathogenic interaction between adipocytes and macrophages. *Journal of Medicinal Food* 00 (0). 1-8.
- Rodoni, LM, Feuring, V, Zaro, MJ, Sozzi, G, Vicente, AR, Arena, ME. (2014). Ethylene responses and quality of antioxidant-rich stored barberry fruit (*Berberis microphylla*). *Scientia Horticulturae* 179. 233-238.
- Ruiz, A., I. Gutierrez., C. Mardones., C. Vergara., E. Hertlitz., M. Vega., C. Dorau., P. Winterhalter, y D. Von Baer., (2010). Los polifenoles y la actividad antioxidante de frutas de Calafate (*Berberis microphylla*) y otros frutos del bosque del sur de Chile. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 58: 6081 - 6089.

- Ruiz, A., Hermosín-Gutiérrez, I., Vergara, C., von Baer, D., Zapata, M., Hitschfeld, A., ... Mardones, C. (2013). Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Research International*, 51(2): 706–713.
- Ruiz, A., Mardones, C., Vergara, C., Hermosín-Gutiérrez, I., Von Baer, D., Hinrichsen, P., Rodríguez, R., Arribillaga, D., Domínguez, E. (2013)- Analysis of hydroxycinnamic acids derivatives in calafate (*berberis microphylla* G.Forst) berries by liquid chromatography with photodiode array and mass Spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1281 (2013). 38– 45.
- Shaffer J.E., (1985). Inotropic and chronotropic activity of Berberine on Isolated Guinea Pig Atria. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 7: 307-31
- Sociedad Española de Cardiología- Alimentos Funcionales y Nutraceuticos
<https://secardiologia.es/images/publicaciones/libros/2007-sec-monografia-nutraceuticos.pdf>. - último ingreso 24/2/2018
- Schmeda-Hirschmann, G., Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., & Ladio, A. (2019). Patagonian berries as native food and medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111979>.
- Thain S. C.; Murtas G.; Lynn J. R.; Mc Grath R. B.; Millar A. J. (2002). The circadian clock that controls gene expression in Arabidopsis in tissue specific. *Plant Physiol* 130: 102-110.
- Universidad Nacional de la Plata.
 Base de datos www.argenfoods.unlu.edu.ar - ultimo ingreso 24/3/2018
- Vendruscolo J. L. S. (2004). Processamento de Morangos e Demais Pequenas. Frutas Actas (editadas en CD) del 2° Simposio Nacional do Morango, 1° Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul: 133-144. 6 al 8 de Julio de 2004.
- Zapata, Luz M.; Heredia, Ana M.; Quinteros, Carlos F.; Malleret, Antonio D.; Clemente, Gabriela; Cárcel, Juan A. (2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. Universidad Nacional de Entre Ríos. Argentina Ciencia, Docencia y Tecnología, vol. 25, núm. 49: 166-192
- Zhang, W., Han, F., HE, J., y Duan, C., (2008) -HPLC-DAD-ESI-MS/MS Analysis and Antioxidant Activities of Nonanthocyanin Phenolics in Mulberry (*Morus alba* L.) *Journal of Food Science*—Vol. 73, Num. 6, 2008.