



**Universidad de Chile**  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química

**“Estudio del efecto de mezcla de solventes (etanol,  
metanol y acetona) con agua en la extracción de  
antocianinas y flavonoides de bayas de Maqui  
(*Aristotelia Chilensis* (Mol.) Stuntz) y su evaluación  
de la capacidad antioxidante”**

Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos  
Financiado por Proyecto Fondecyt Regular 1210429

**Micaela Elena Quintanilla Lantadilla**

**Director**

Dr. Cristian Tapia  
Departamento de Ciencia de los  
Alimentos y Tecnología  
química, Universidad de Chile

**Codirector**

Dra. Lilian Abugoch James  
Departamento de Ciencia de los  
Alimentos y Tecnología  
química, Universidad de Chile

Santiago, Chile

2024

# Tabla de contenido

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
A) OBJETIVO GENERAL.....	15
B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	15
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>16</b>
LUGAR DE TRABAJO .....	16
MATERIA PRIMA .....	16
METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN.....	16
METODOLOGÍA DE CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO .....	18
ANÁLISIS DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	21
a) Captación del Radical ABTS: .....	21
b) ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno):.....	22
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>24</b>
POLARIDAD RELATIVA DE LOS SOLVENTES UTILIZADOS.....	24
CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE MAQUI.....	25
a) Rendimiento, Humedad y Actividad de Agua: .....	25
b) Cuantificación de Flavonoides y Antocianinas.....	27
ANÁLISIS DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	31
a) Captación del Radical ABTS*:.....	31
b) ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno):.....	33
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>38</b>
<b>7. REFERENCIAS.....</b>	<b>39</b>

## Índice de tablas

Tabla 1: Perfil de polifenoles (antocianinas y no-antocianinas) del maqui.....	11
Tabla 2: Identificación de los distintos extractos generados a partir de maqui liofilizado y los solventes necesarios.....	17
Tabla 3.- Condiciones de Detección de Antocianinas y Flavonoides mediante HPLC-PDA..	19
Tabla 4.- Condiciones de Gradiente para el Perfil de antocianinas y flavonoides del maqui mediante HPLC-PDA. ....	20
Tabla 5.- Diluciones de las muestras para su análisis en método ORAC .....	22
Tabla 6.- Caracterización de extractos de maqui y sus resultados de rendimiento, actividad de agua y humedad .....	27
Tabla 7.-Resultado de concentración de Flavonoides y Antocianinas promedio para los extractos de maqui .....	31
Tabla 8: Comparación de la capacidad antioxidante mediante método ORAC .....	35

## Índice de Figuras

Figura 1: Estructura básica y sustituyentes de las antocianidinas. ....	10
Figura 2: A la izquierda Fruto Maqui; a la derecha Pulpa de Maqui. ....	10
Figura 3: Mecanismo de acción de un antioxidante fenólico frente a una especie reactiva de oxígeno .....	12
Figura 4: Mecanismo de reacción de un ensayo ORAC .....	13
Figura 5: Esquema de extracción y obtención de extractos.....	18
Figura 6: Cromatograma de extracto de Ma/Me:20 de Flavonoides (1) y Antocianias (2)..	28
Figura 7: Análisis de ANOVA multifactorial de dos factores para las antocianinas y el tipo de solvente y su concentración, obtenida de Statgraphics.....	30
Figura 8: Análisis de ANOVA multifactorial de dos factores para ORAC y el tipo de solvente y su concentración, obtenida de Statgraphics. ....	37

## Índice de Gráficos

Gráfico 1.-Polaridad relativa de los solventes y la mezclas de estos con agua.....	24
Gráfico 2.- Cuantificación de flavonoides del maqui, expresados como mg eq-quercetina-3-glucosido/ml extracto.....	29
Gráfico 3.- Cuantificación de antocianinas del maqui, expresados como mg eq-cianidina-3-glucósido/ml extracto.....	29
Gráfico 4.- Capacidad antioxidante mediante captación del radical ABTS <sup>+</sup> (%) para los distintos solventes y extractos .....	32
Gráfico 5.- Relación entre capacidad antioxidante mediante ABTS y polaridad relativa de las muestras .....	32
Gráfico 6.- Capacidad antioxidante mediante método ORAC para los distintos solventes y extractos .....	34
Gráfico 7.- Relación entre capacidad antioxidante mediante método ORAC y polaridad relativa de las muestras.....	36

## Índice de ecuaciones

Ecuación 1: Rendimiento de Liofilización. ....	18
Ecuación 2: Humedad de extractos liofilizados. ....	19
Ecuación 3: Ponderación de la polaridad relativa. ....	25

## 1. Resumen

El maqui es uno de los frutos con mayor capacidad antioxidante en Sudamérica, siendo denominado como un superalimento, este es capaz de otorgar efectos beneficiosos a la salud como ser antidiabético, cardioprotector y además, este logra prevenir efectos nocivos del estrés oxidativo en el cuerpo ayudando en la prevención de enfermedades del intestino irritable. Su obtención afecta altamente los efectos antioxidantes otorgados por los flavonoides y antocianinas encontrados en el fruto, debido a esto se decidió lograr una optimización en su extracción mediante el estudio de 3 solventes utilizados en la industria (acetona, etanol y metanol) en conjunto con agua, verificando como la polaridad relativa que poseen los extractos afecta en la cuantificación de polifenoles y en la capacidad antioxidante de los extractos mediante el método ABTS<sup>+</sup> y ORAC. De los resultados obtenidos se puede evidenciar que las muestras con una mayor polaridad relativa se logra cuantificar una mayor cantidad de antocianinas como [mg-eq-cianidina 3 glucósido/g extracto] y mientras que para los flavonoides un punto medio de polaridad logra cuantificar la mayor cantidad como [mg-eq-quercetina 3 glucósido/g extracto] sin obtener diferencias significativas para el tipo de solvente utilizado en ambos casos. En cuanto a la capacidad antioxidante en ABTS ocurre el mismo fenómeno que las antocianinas en donde a una mayor polaridad relativa se logra una mayor capacidad antioxidante logrando una captación mayor para los extractos de acetona con un valor máximo de 77%, pero para los resultados de ORAC, la relación no es la misma, debido que a un punto medio de polaridad relativa se obtiene los mayores valores de capacidad antioxidantes, otorgados por el solvente acetona en un 50%, seguido por el etanol en un 80%. De los resultados obtenidos se puede observar que a pesar de que existen diferencias entre los extractos, estas no son significativas, un este caso el solvente utilizado acetona logro en conjunto los mejores resultados, pero debido a que es un solvente toxico y nocivo para la salud se descarta y no se recomienda su uso, obteniendo resultados similares con solventes como etanol y metanol. En este caso los casos de mayor interés corresponden a las antocianinas y su mayor cuantificación corresponde a la mezcla de etanol al 80% y para la capacidad antioxidante mediante ORAC corresponde a la misma mezcla, siendo el ideal para su extracción.

## Abstract

Maqui is one of the fruits with the greatest antioxidant capacity in South America, being called a superfood, it is capable of providing beneficial effects on health such as being antidiabetic, cardioprotective and in addition, it manages to prevent harmful effects of oxidative stress in the body by helping in the prevention of irritable bowel diseases. Its obtaining highly affects the antioxidant effects provided by the flavonoids and anthocyanins found in the fruit, due to this it was decided to achieve an optimization in its extraction through the study of 3 solvents used in the industry (acetone, ethanol and methanol) with water, verifying how the relative polarity of the extracts affects the quantification of polyphenols and the antioxidant capacity of the extracts using the ABTS+ and ORAC methods. From the results obtained, it can be seen that samples with a greater relative polarity can quantify a greater amount of anthocyanins expressed as [mg-eq-cyanidin 3 glucoside/g extract] and while for flavonoids a midpoint of polarity can quantify the greater amount as [mg-eq-quercetin 3 glucoside/g extract] without obtaining significant differences for the type of solvent used in both cases. Regarding the antioxidant capacity in ABTS, the same phenomenon occurs as in anthocyanins, where a greater relative polarity results in a greater antioxidant capacity, achieving a greater uptake for the acetone extracts with a maximum value of 77%, but for the results of ORAC, the relation is not the same, because at a midpoint of relative polarity the highest values of antioxidant capacity are obtained, given by the solvent acetone at 50%, followed by ethanol at 80%. From the results obtained, it can be observed that although there are differences between the extracts, these are not significant. In this case, the solvent used acetone achieved the best results overall, but because it is a toxic and harmful solvent for health. It is discarded and its use is not recommended, obtaining similar results with solvents such as ethanol and methanol. In this scenario, the cases of greatest interest correspond to anthocyanins and their highest quantification corresponds to the 80% ethanol mixture and for the antioxidant capacity using ORAC it corresponds to the same mixture, being ideal for extraction.



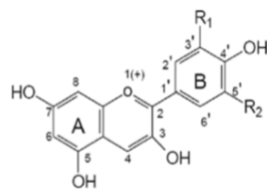
## 2. Introducción.

*Aristotelia Chilensis* (Mol.) Stuntz, más conocido como “maqui”, es un árbol autóctono de los bosques subantárticos de Chile y Argentina (Benedetti, 2012). En Chile el maqui se distribuye desde la región de Coquimbo (IV) hasta la región de Aysén (XI), encontrándolo incluso en la isla o Archipiélago Juan Fernández (Fernández, Doll, & Vallejos, 2019). El fruto se desarrolla en un arbusto o árbol generalmente pequeño (Fernández et al., 2019), su fruto es una baya comestible redonda y pequeña de color púrpura intenso, con una pulpa dulce y con 2 a 4 semillas en su interior (Benedetti, 2012; Salinas & Caballé, 2020). El fruto es susceptible a sufrir modificaciones químicas en función a su fenotipo, esto según las condiciones de maduración que se encuentra sometida (distintas presiones atmosféricas, temperatura, condiciones del suelo, entre otras) generando así variaciones de componentes especialmente polifenólicos, tanto en las hojas, como en el fruto (Pinto, Fuentealba-Sandoval, López, Peña-Rojas, & Fischer, 2022).

En la última década se ha reconocido ampliamente el fruto por las características químicas, que llaman mucho la atención frente a la necesidad actual de la salud humana, el maqui destaca principalmente por contener un alto contenido de polifenoles, con una gran variedad de antocianinas y flavonoides, encontrándose tanto en el fruto como en sus hojas. Este fruto en conjunto con el calafate se destacan dentro de todos los de Sudamérica por tener la mayor actividad antioxidante (Fernández et al., 2019). Dentro de la evidencia científica el fruto es denominado como una “super fruta” (Pinto et al., 2022) y “superalimento (J. E. Brauch, Buchweitz, Schweiggert, & Carle, 2016), debido a la cantidad de efectos benéficos que este tiene para la salud humana, como por ejemplo, Céspedes, El-Hafidi, Pavon, & Alarcon, (2008) demostró en ratas *in vivo* el efecto cardioprotector de extractos de maqui contra el daño producido por arritmias, además de prevenir los efectos nocivos en el corazón gracias a la disminución de la oxidación de lípidos referida a la capacidad antioxidante del fruto, otros estudios como el de Rojo et al., (2012) mostraron como los antioxidantes de las antocianinas del maqui son capaces de tener efectos antidiabéticos en estudios *in-vivo* en ratas, mostrando que estas son capaces de regular los niveles de glucosa en la sangre y la tolerancia a la glucosa en ratas con hiperglicemia y

obesidad dada por una dieta alta en grasas. Machado et al., 2021, logró evidenciar mediante distintas investigaciones científicas que los antioxidantes de distintos frutos de América (incluido el maqui) son capaces de lograr un efecto positivo en las distintas etapas de las enfermedades de intestino irritable (Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y colitis indeterminada) como tratamiento secundario y/o alternativo, debido a que los distintos compuestos polifenólicos logran generar el mismo o parecido efecto fisiológico que un tratamiento convencional, además evidencia que estos son eficaces en tratamientos preventivos de estas enfermedades, teniendo en cuenta las distintas manera de obtener los compuestos (fruto puro, extracción, purificación, entre otros) y la calidad de compuestos que se obtiene cada una.

El maqui destaca por su alto contenido de polifenoles, estos son el grupo de sustancias no enérgicas presentes en los alimentos de origen vegetal, los cuales son bio-sintetizados en una alta cantidad por el fruto, hojas, tallos y raíces, como producto de su metabolismo secundario. En cuanto a su caracterización química, todos los polifenoles presentan en su estructura al menos un anillo fenólico y sus clases y subclases se definen en función a la cantidad de anillos fenólicos que presentan (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012). Existen dos categorías en las que se separan los polifenoles, estos corresponden a los flavonoides que son pigmentos ampliamente distribuidos en el reino vegetal y son compuestos necesarios para el desarrollo fisiológico de los vegetales, generando un rol de defensa frente a agentes agresores externos, además de señalizadores químicos (Quiñones et al., 2012) y los compuestos no flavonoides, mayormente comprenden alcoholes monofenólicos, ácidos fenólicos y estilbenos (INTA, 2011).



Aglicona	Sustituyentes		λ <sub>máx</sub> (nm) Espectro visible
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvinidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

*Figura 1: Estructura básica y sustituyentes de las antocianidinas.*

El maqui durante los últimos años ha ganado mucho interés económico y científico debido a su excepcionalmente alto contenido de antocianinas (glúcidos solubles parte de los flavonoides), estos están constituidas por una aglicona (presentadas en la figura 1), unida a una azúcar mediante un enlace de tipo  $\beta$ -glucosídico. Las antocianinas, le atribuyen al fruto su potente color púrpura demostrado en la figura 2 y por sobre todo su alta capacidad antioxidante (Brauch et al., 2017; Fernández et al., 2019).



*Figura 2: A la izquierda Fruto Maqui; a la derecha Pulpa de Maqui.*

Para la caracterización de este fruto, Genskowsky *et al.*, 2016 reportó un Contenido Fenólico Total (TPC) de extracto de maqui de  $49,74 \pm 0,57$  (g GAE kg<sup>-1</sup>), a la vez también reportó un Contenido Total de Flavonoides (TFC) de  $12,19 \pm 0,02$  (g RE kg<sup>-1</sup>) y un contenido total de Antocianinas (TAC) de  $22,58 \pm 0,24$  (g C-3-GE kg<sup>-1</sup>). En relación a estos datos, un alto contenido de polifenoles va de la mano con una alta capacidad antioxidante, Gironés-Vilaplana *et al.*, 2014 reporta una capacidad antioxidante ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno) de  $29,90 \pm 0,98$  hasta  $19,18 \pm 0,29$  (mmol ET/100g) en muestras

de maqui con distintos tipos de secado (liofilización y secado en spray microencapsulado por atomización).

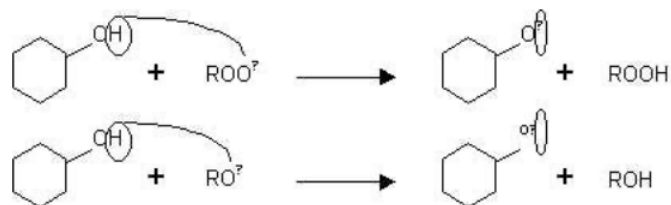
En cuando al análisis de los extractos de maqui, en la tabla 1 podemos encontrar que Genskowsky *et al.*, 2016, logró identificar 19 componentes fenólicos de los cuales ocho corresponden a antocianinas, once no antocianinas. A la vez Gironés-Vilaplana *et al.*, 2014 y Brauch *et al.*, 2017 lograron detectar los mismos ocho compuestos de antocianinas, siendo estos glúcidos de la delfinidina y la cianidina, en concentraciones variables en función al tipo de extracto de cada estudio. Las antocianinas derivadas de la delfinidina representan un aproximado del 66% del TAC según Genskowsky *et al.*, 2016 y un 82,2% según Brauch *et al.*, 2017, siendo la delfinidina-3-glucosido la significativamente predominante entre las antocianinas, seguido por la delfinidina-3,5-diglucosida y delfinidina-3-sambubosida, sin tener diferencias significativas entre las últimas dos (Genskowsky *et al.*, 2016).

*Tabla 1: Perfil de polifenoles (antocianinas y no-antocianinas) del maqui.*

Compuesto	Concentración (g/kg DM)	Compuesto	Concentración (g/kg DM)
<i>Antocianinas</i>		<i>No Antocianinas</i>	
Delfinidina-3-sabubiosido-5-glucosido	4,36 ± 0,01	Miricetina-3-galactosido	0,32 ± 0,01
Delfinidina-3,5-diglucosido	7,23 ± 0,04	Miricetina-3-glucosido	0,62 ± 0,01
Cianidina-3-sabubiosido-5-glucosido	6,89 ± 0,06	Quercetina-galloyl-hexosido	0,12 ± 0,00
Cianidina-3,5-diglucosido	5,36 ± 0,05	Quercetina-galloyl-hexosido	0,07 ± 0,00
Delfinidina-3-sabubiosido	7,06 ± 0,15	Rutina	0,20 ± 0,01
Delfinidina-3-glucosido	9,48 ± 0,25	Ácido elágico	0,94 ± 0,01
Cianidina-3-sabubiosido	0,73 ± 0,11	Quercetina-3-galactosido	0,17 ± 0,00
Cianidina-3-glucosido	1,24 ± 0,02	Quercetina-3-glucosido	0,07 ± 0,00
<b>TOTAL</b>	<b>42,35 ± 0,08</b>	Dimetoxi-quercetina	0,28 ± 0,00
		Miricetna	0,25 ± 0,01
		Quercetina	0,06 ± 0,00
		<b>TOTAL</b>	<b>3,11 ± 0,02</b>

De los compuestos químicos mencionados, son las antocianinas las que le confieren el poder antioxidante al maqui (Brauch *et al.*, 2017). Estos actúan captando especies reactivas de oxígeno (ROS) o especies reactivas de nitrógeno (RNS), basándose en un sistema de oxidación-reducción (C. Zapata & Zapata, 2019). En la salud humana los antioxidantes son capaces de reducir el estrés oxidativo (generado por radicales libres) y de reducir el efecto de oxidación

generado día a día por efectos endógenos (metabolizados por el propio organismo celular) o exógenos (provenientes de fuentes como humo, dietas no balanceadas, contaminación del aire, radiación UV, entre otros) (Fernández-Pachón, Villaño, Troncoso, & García-Parrilla, 2006), en la figura 3 se observa el mecanismo básico de reacción de un antioxidante fenólico frente a una especie reactiva de oxígeno o radical libre (Ángel, Hidalgo, & Rubio, 2018).

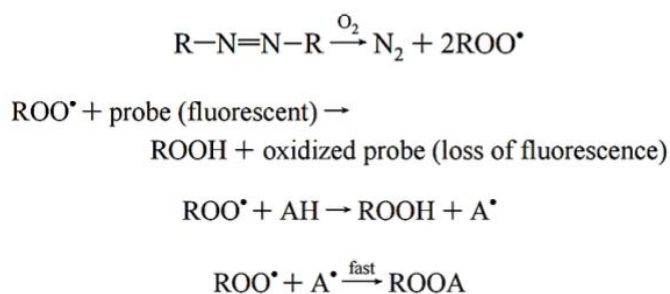


*Figura 3: Mecanismo de acción de un antioxidante fenólico frente a una especie reactiva de oxígeno*

Para conocer la capacidad antioxidante que logran entregar este tipo de compuestos, se han desarrollado distintos métodos de determinación de la actividad antioxidante, estos se basan en comprobar como un agente oxidante, induce un daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante a prueba, esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto. Los métodos antioxidantes difieren en mayor parte por el tipo de agente oxidante y el sustrato empleado (Fernández-Pachón et al., 2006; Tovar, 2013). La importancia de poder cuantificar esta actividad, es para darle un valor nutricional a los distintos antioxidante, reconociendo su Capacidad Antioxidante, para lograr beneficios en la salud humana (C. Zapata & Zapata, 2019).

Dentro de los métodos de evaluación de capacidad antioxidante se encuentra el método ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), este método in vitro es el más implementado para los análisis antioxidantes debido a su adaptabilidad a la gran variabilidad de especies radicales. Este ensayo está basado en la transferencia de átomos de hidrógenos (HAT) y es altamente sensible, lo que genera más confianza en su resultado (Tovar, 2013; C. Zapata & Zapata, 2019). El método ORAC permite cuantificar la capacidad que tiene de un antioxidante para “apagar o detener” la reactividad de radicales libres,

particularmente los del tipo peroxilo (los cuales son generados químicamente mediante agentes oxidantes como el AAPH, mientras que a nivel in vivo estos radicales serían generados en los procesos de oxidación del organismo), este “apagamiento” se evidencia a través de la inhibición de la oxidación de la molécula blanco (fluoresceína). El valor del ensayo no solo mide el comportamiento antioxidante de las moléculas, sino que también mide la posible interacción entre ellos, como una potenciación sinérgica (INTA, 2021). El mecanismo de reacción se observa en la figura 4, en donde el agente oxidante (R-N=N-R) reacciona rápidamente con el oxígeno generando radicales peroxilo (2ROO<sup>•</sup>), este reacciona con el medio oxidando la molécula de fluoresceína, generando la pérdida de su fluorescencia, la incorporación de antioxidantes (AH) a la solución logra competir de modo de evitar la pérdida de fluorescencia. Este cambio en el medio logra cuantificar la cantidad de medio oxidado frente a la no oxidada, esta diferencia es cuantificada mediante un fluorímetro basado en la medición de longitudes de ondas en un tiempo determinado para la cuantificación (C. Zapata & Zapata, 2019).



*Figura 4: Mecanismo de reacción de un ensayo ORAC*

Existen también otros tipos de métodos, no tan exactos como el método ORAC, pero aun así altamente utilizados en las investigaciones, uno de estos corresponde al ensayo ABTS<sup>•+</sup> (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), este se basa en la transferencia de electrones, mediante una reacción redox con el oxidante, este tipo de ensayo es aplicable a antioxidantes del tipo hidrofílicos y lipofílicos ya sea en sustancias puras o en mezclas acuosas (Tovar, 2013).

La actividad antioxidante concedida por los polifenoles flavonoides y aquellos no flavonoides, depende principalmente de la presencia de grupos -OH en su estructura, estos

al estar unidos a un anillo bencénico, confieren al polifenol la habilidad para actuar como un donante de un átomo de hidrogeno o como un donante de un electrón a un radical libre (o a otras especies reactivas). A pesar de que no haya evidencia científica de que el consumo de polifenoles sea “esencial” para la conservación de la salud, numerosos estudios científicos se han encargado de evidenciar los beneficios a la salud (INTA, 2011). Este alto interés ha dado a lugar el desarrollo y perfeccionamiento de su extracción a partir de distintas bases alimentarias, incluyendo el maqui (Rubio & Rodriguez, 2018). Solventes como etanol, metanol, acetato de etilo, acetona y mezclas de estos solventes en conjunto al agua, son los solventes más utilizados para poder recuperar polifenoles (Muhlack, Potumarthi, & Jeffery, 2018). Dentro de la evidencia científica, para la extracción del maqui, han sido utilizado mezclas de metanol acidificado con HCl a pH 1 (Johanna Elisabeth Brauch et al., 2017) y a pH de 0,1 (J. E. Brauch et al., 2016) , mezclas de metanol y agua en proporciones de 70:30 v/v (Gironés-Vilaplana et al., 2014) y de 80:20 v/v (Estefania Genskowsky et al., 2016), entre otros. Para la extracción de la molécula de antocianina (polifenol predominante en el maqui), el método de extracción se enfoca en mantener un rango de pH bajo para poder ser afín a la molécula y de tener una naturaleza polar para su extracción, debido a la afinidad de esta con el medio (L. Zapata et al., 2014).

### 3. Objetivos

a) Objetivo General

Lograr un método de extracción óptimo de los compuestos bioactivos fenólicos del maqui liofilizado mediante tres solventes (etanol, metanol y acetona), a modo de lograr las mejores condiciones de extracción y obtener la mayor capacidad antioxidante en los extractos generados.

b) Objetivos Específicos:

- Caracterizar los extractos mediante su contenido de humedad, actividad de agua y rendimiento de extracción.
- Cuantificar la cantidad de antocianinas y flavonoides de los extractos de maqui mediante cromatografía HPLC.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos mediante ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno) y Captación de Radical ABTS<sup>+</sup>.
- Encontrar el mejor método de extracción en función de la polaridad de los solventes.



## 4. Metodología

### Lugar de Trabajo

El proceso de extracción y caracterización del extracto (a excepción el análisis de cuantificación de antocianinas y flavonoides mediante HPLC-PDA UV Visible) fueron realizados en el Departamento de Ciencia y Tecnología de alimentos de la Universidad de Chile, en el laboratorio de Operaciones Unitarias y en el laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Procesos Alimentarios, Santiago, Chile.

Los análisis químicos (capacidad antioxidante ORAC y ABTS) fueron llevado a cabo en el centro de Investigación Austral Biotech, (Centro de investigación Biotecnológica), Universidad Santo Tomás, Santiago Chile, al igual que la caracterización de las muestras mediante HPLC-PDA UV Visible.

### Materia Prima

Para llevar a cabo el proyecto, se obtuvo maqui entero (*Aristotelia Chilensis* (MOL.) Stuntz) liofilizado del Fundo Santa Rosa, comuna de Gorbea, Región de la Araucanía, IX Región, Chile. Las muestras fueron almacenadas en un lugar oscuro y fresco a temperatura ambiente durante el proceso de investigación.

### Metodología de Extracción

Para la obtención del extracto, el proceso se basó en el método utilizado por Genskowsky, (2015) con ciertas modificaciones.

Se realizó un estudio de extracciones con 3 distintos solventes: Metanol, Etanol y Acetona, en proporciones de 20%, 50% y 80% del solvente en agua para la extracción de los compuestos antioxidantes del maqui previamente liofilizado.

*Tabla 2: Identificación de los distintos extractos generados a partir de maqui liofilizado y los solventes necesarios.*

	<b>Metanol</b>	<b>Etanol</b>	<b>Acetona</b>
<b>20%</b>	Ma/Me:20	Ma/Et:20	Ma/Ac:20
<b>50%</b>	Ma/Me:50	Ma/Et:50	Ma/Ac:50
<b>80%</b>	Ma/Me:80	Ma/Et:80	Ma/Ac:80

*Leyenda: Ma: Maqui; Me: Metanol; Et: Etanol; Ac: Acetona.*

- Se pesan 3 gramos de maqui previamente liofilizado, disolviéndolo en 30 ml de solvente/agua acidificada (HCl al 0,1%), en las proporciones de 20%, 50% y 80% de solvente de Metanol, Etanol y Acetona mencionadas anteriormente (tabla 2), la muestra luego es homogeneizada con un ULTRA-TURRAX (homogeneizador IKA T-25; IKA Staufen, Alemania) a 18000 rpm durante 5 minutos. La muestra se centrifuga en las condiciones de 3000 rpm durante 7 minutos a 4°C. Posteriormente el extracto se filtra de modo de separar aquellas sustancias sólidas en el sobrenadante con filtros Millipore de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF) de 0,45 micrones de tamaño de poro para las muestras de 80 y 50% de solvente y filtros de policarbonato RTTP de 1,2 micrones de tamaño de poro para las muestras con 20% de solvente a una presión de 0,2 atm (20 kPa). El extracto líquido posteriormente es rotaevaporado utilizando un rotavapor R-205 (Buchi, Flawil, Suiza) durante 1 hora a 50°C de modo de separar los solventes presentes en las muestras. Finalmente se añadieron 10 ml de agua mili-q al extracto con el fin de poder traspasar el extracto a tubos falcon de 50ml, cuidando de no llenar más de un tercio del tubo con el extracto. El extracto fue congelado a -20°C por un mínimo de 24 horas para posteriormente ser liofilizado a -52°C durante 72 horas a una presión de 500 kPa.

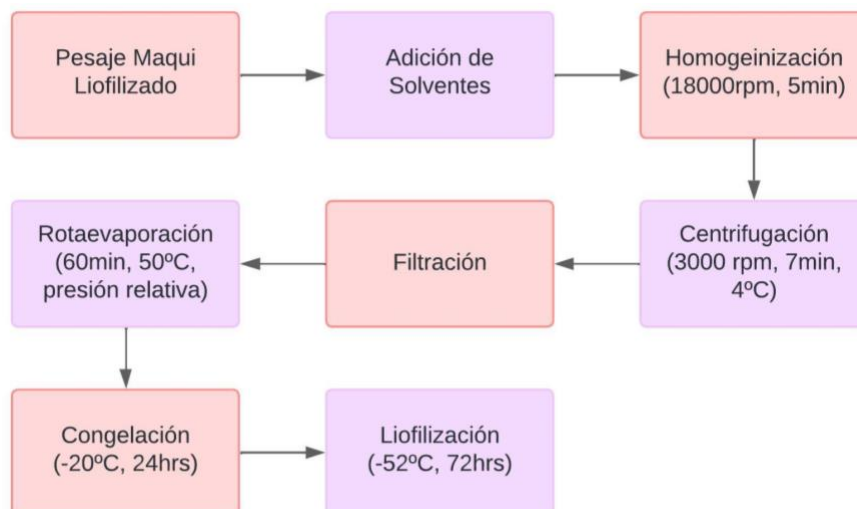


Figura 5: Esquema de extracción y obtención de extractos.

#### Metodología de Caracterización del extracto

- Se determina rendimiento de la liofilización mediante diferencia de peso de la muestra antes y después de liofilizar (Ecuación 1), actividad de agua ( $A_w$ ) medida en AquaLab Serie 4TEV, pesando una muestra de  $30\text{mg} \pm 5\text{mg}$  de la muestra liofilizada, y porcentaje de humedad mediante diferencia por peso seco al extracto liofilizado, pesando  $30\text{mg} \pm 5\text{mg}$  de muestra liofilizada y llevando a estufa por 24 horas a  $106^\circ\text{C}$  (Ecuación 2). Todos los valores se expresan como valor medio  $\pm$  DE.

*Ecuación 1: Rendimiento de Liofilización.*

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{[P_L * 100]}{P_S}$$

Donde:

$P_S$ : Peso en seco maqui liofilizado (g)

$P_L$ : Peso extracto Liofilizado (g)

*Ecuación 2: Humedad de extractos liofilizados.*

$$\text{Humedad (\%)} = 100 - \frac{[P_S * 100]}{P_E}$$

Donde:

P<sub>S</sub>: Peso en seco maqui liofilizado (g)

P<sub>E</sub>: Peso post secado en estufa (g)

- Se cuantifican antocianinas y flavonoides del maqui utilizando el equipo cromatógrafo HPLC-PDA UV Visible (Waters, Alliance 2695), en donde las condiciones de cromatografía y la gradiente utilizadas se encuentran en la tabla 3 y 4 respectivamente, basadas en el método utilizado por Genskowsky, (2015) con ciertas modificaciones.

Las preparación de muestras se llevó a cabo pesando un aproximado de 20mg de extracto liofilizado, disolviéndolo en una mezcla de ácido acético (1%) y acetonitrilo (50:50) con una inyección al equipo de 50uL.

*Tabla 3.- Condiciones de Detección de Antocianinas y Flavonoides mediante HPLC-PDA*

<b>Condición</b>	<b>Característica</b>
<b>Columna</b>	C18 (250mm x 4,6mm, 5 micrones)
<b>Fase móvil*</b>	Ac. Acético 1% (A)/ Acetonitrilo (B)
<b>Flujo</b>	1 ml/min
<b>Tiempo de Corrida</b>	40 min
<b>Volumen de Inyección</b>	50 uL
<b>Modo</b>	Gradiente

\*Ambos solventes utilizados son de grado cromatográfico

Tabla 4.- Condiciones de Gradiente para el Perfil de antocianinas y flavonoides del maqui mediante HPLC-PDA.

Tiempo (minutos)	Ácido Acético (A%)	Acetonitrilo (B%)
0	0	100
2	0	100
15	20	80
20	30	70
30	40	60
37	40	60
38	0	100
40	0	100

- Para la cuantificación de antocianinas y flavonoides se utilizaron cianidina 3 glucósido y quercetina 3 glucósido como estándares de calibración. El método fue obtenido por Andrade et al., 2024 (proyecto financiado por el mismo FONDECYT), utilizando la misma curva de calibración para la cuantificación, para esto, 0,733 mg del estándar de cianidina fue disuelto en 0,5 ml de ácido acético (1%) en agua, una alícuota de 0,2 ml fue disuelta en 2 ml de la misma solución anterior, de modo que de la última solución se tomaron alícuotas de 0,1, 0,2, 0,4, 0,5 y 1 ml llevadas a un volumen de 5 ml con la solución de ácido acético en un matraz ámbar. La autora logró un coeficiente de correlación lineal  $R^2 = 0,9998$ . Además, se obtuvo también la curva de calibración para la quercetina 3 glucósido (trabajo no publicado), en este caso 2 mg del estándar fueron disueltos en 2 ml (1:1, acetonitrilo:ácido acético 1%), se tomaron alícuotas de 0,02, 0,04, 0,06, 0,1, 0,16 y 0,2 llevando a un volumen final de 2 ml en matraz ámbar con ácido acético al 1 %. En este caso se logró un coeficiente de correlación lineal  $R^2 = 0,9995$ .

## Análisis de capacidad Antioxidante

### a) Captación del Radical ABTS:

- **Generación del Radical ABTS<sup>\*+</sup>**: Se realizó una solución de 7mM de reactivo ABTS (*2,2-Azino-bis (3-etilbenzotizolina-6-sulfónico)*) pesando 77,6mg del reactivo disolviendo en 20ml de agua miliq, posteriormente se añaden 13,2 mg de Persulfato de Potasio ( $K_2S_2O_8$ ), logrando una concentración de 2,45mM. La solución es homogeneizada en un frasco ámbar cubierto con papel aluminio y dejando reposar a una temperatura de 3°C durante 12 a 16 horas en la oscuridad (Re et al., 1998). Posteriormente se diluyó la solución del radical en Etanol al 20% en razón de 1:10, logrando estabilizar el radical en el tiempo, finalmente se diluyó la solución con Etanol al 20% hasta obtener una absorbancia de  $0,72 \pm 0,03$  a una lectura de 732 nm en un lector de placas Infinite M200 pro, TECAN.

- **Evaluación de Capacidad Antioxidante**: La evaluación se realiza en una microplaca de 96 pocillos transparente, en donde se utilizan 20 uL de muestra por triplicado, disolviendo 50 uL del extracto liofilizado (previamente disuelto en una concentración de 1mg/ml en las proporciones de los solventes iniciales del extracto) en 950 uL de la proporción de solvente utilizada inicialmente y además se utilizan 200 uL de radical ABTS previamente disuelto en Etanol al 20%. Posteriormente la placa se incubó a temperatura ambiente durante 7 minutos y finalmente se realiza su lectura de absorbancia a 732 nm en un lector de placas Infinite M200 pro, TECAN.

Se realiza una curva de calibración de 8 puntos con TROLOX en concentraciones de 0,0125 a 0,0875 ug/uL (considerando 7 puntos dentro de esas concentraciones) y además considerando uno de los puntos como blanco o control que solo contenga etanol al 20%. La placa es llenada de la misma manera, en donde se llenan por triplicado 20 uL de los 8 puntos de la curva de calibración del trolox en la placa y luego se añaden 200 uL del radical ABTS, la placa se deja incubar por 7 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se realiza la lectura de la absorbancia a 732 nm en lector de placa Infinite M200 Pro, TECAN.

Los resultados son expresados en porcentaje de inhibición de la captación del radical ABTS, capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC-ABTS del inglés Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) en  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de muestra en base seca.

b) ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno):

El método ORAC de Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001 fue modificado para su uso en este estudio. El método consiste en realizar en primer lugar un buffer fosfato (PBS) 75mM a pH de  $7,40 \pm 0,04$ , pesando 2,1187 gr de Fosfato de Sodio Dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) y 0,5278 gr de Fosfato de Sodio Dihidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) diluyendo en 250ml de agua miliq.

Se debe realizar una curva de calibración pesando 5mg de TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), solubilizando con 1ml de Etanol puro y aforando con agua miliq en matraz aforado ámbar de 10ml. Posteriormente se realizan diluciones de Trolox tomando 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 80  $\mu\text{L}$  de la solución llevando a un volumen total de 1000  $\mu\text{L}$  de PBS y preparando un último punto como control o blanco sin la adición de Trolox y solo PBS.

Las muestras del extracto liofilizado previamente solubilizado en las proporciones de solvente iniciales son llevadas a 4 diluciones distintas encontradas en la tabla 5.

*Tabla 5.- Diluciones de las muestras para su análisis en método ORAC*

Dilución	A	B	C	D
Concentración	1/25	1/50	1/100	1/150
$\mu\text{L}$	50 (muestra)	100 (A)	100 (A)	100 (A)
$\mu\text{L PBS}$	1200	100	300	500

La evaluación se realiza en microplaca FLATBLACK de 96 pocillos agregando 150  $\mu\text{L}$  por pocillo de fluoresceína al 0,003 $\mu\text{M}$  disuelta en buffer y 25 $\mu\text{L}$  por triplicado de cada punto de la curva de calibración del Trolox más el blanco, además de 25

uL de muestras diluida (A, B,C y D) por triplicado en la placa (total de 6 muestras distintas por placa más las diluciones para la curva de calibración de Trolox), posteriormente la placa se incuba por 25 minutos a 37°C y una vez transcurrido el tiempo se añaden 25uL en cada pocillo de radical AAPH a 96mM (se pesan 137,17mg de radical AAPH (2,2'-Azobis[2-methyl-propionamide] dihydrochloride) llevando a volumen de 5ml de PBS). Finalmente se mide la intensidad de la fluorescencia cada dos minutos durante dos horas a longitudes de onda de excitación de 485nm y emisión a 520nm a una temperatura de 37°C en un lector de placas Infinite M200 pro, TECAN. Los resultados son expresados en umol eq-Trolox/g extracto, capacidad antioxidante equivalente a Trolox por gramo de extracto en base seca

#### Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de Varianza (ANOVA Multifactorial) para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos para su análisis mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion Versión 19.6.03, se consideró un estudio de dos variables la concentración del extracto y el tipo de extracto frente a la respuesta de los resultados obtenidos en duplicado.

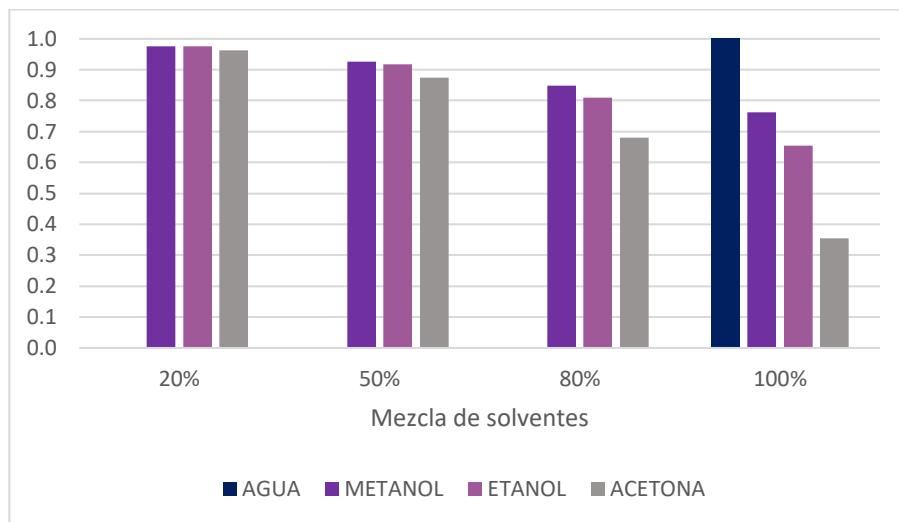


## 5. Resultados y discusiones.

### Polaridad Relativa de los solventes utilizados

En el gráfico 1 se pueden observar las distintas polaridades relativas de las mezclas de los solventes con agua en las proporciones de 20%, 50% y 80% respectivamente y de los solventes puros a modo de comparación entre ellos.

*Gráfico 1.-Polaridad relativa de los solventes y la mezclas de estos con agua.*



De los resultados, se puede rescatar que a medida que aumenta la cantidad de solvente (etanol, metanol y acetona), va disminuyendo la polaridad relativa de la mezcla y a la vez disminuyendo en función de la polaridad de cada tipo del solvente. El metanol es el que tiene una mayor polaridad que el resto de 0,762 seguido del etanol y finalmente la acetona con valores de 0,654 y 0,355 respectivamente, debido a esto es que se tomó la decisión de trabajar con estos tres solventes, de modo de poder tener un rango de polaridad relativa lo suficientemente amplio para poder observar de distintos puntos cual es el mejor método de extracción, un punto alto de polaridad (metanol), un punto medio (etanol) y un punto bajo (acetona).

*Ecuación 3: Ponderación de la polaridad relativa.*

$$P_r = (X_A * Polaridad_A) + (X_B * Polaridad_B)$$

Donde:

$P_r$ : Polaridad Relativa

$X_A$ : Fracción molar del solvente A

$Polaridad_A$ : Polaridad del solvente A

$X_B$ : Fracción molar del solvente B

$Polaridad_B$ : Polaridad del solvente B

En donde, a medida que la mezcla de solventes contenga un mayor porcentaje de agua, tendrá una mayor ponderación de polaridad relativa, debido a la polaridad de agua, siendo esta 1,0. Los distintos análisis realizados en este estudio se visualizaron en función de la polaridad, de modo de ver si es posible que las diferentes polaridades relativas de las mezclas de solventes utilizados tiene algún efecto sobre los extractos de maqui y como esto puede ser utilizado en la industria para el uso de farmacéuticos.

### **Caracterización de los extractos de maqui.**

a) Rendimiento, Humedad y Actividad de Agua:

Para poder realizar la caracterización de los distintos extractos de maqui en primer lugar se calculó el rendimiento de la liofilización de las muestras, variando de un total de 40,50% a 48,36%, siendo el dato de menor valor la muestra de Ma/Et:20 y la de mayor rendimiento Ma/Ac:20 expresado en tabla 6, en donde no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas, lo que indica una liofilización uniforme entre los extractos, se calculó una pérdida promedio de  $44,9 \pm 3,03\%$  entre todos los extractos de maqui al momento de liofilización. El mayor rendimiento de la liofilización tuvo una relación inversa en función a la polaridad del solvente utilizado, hubo una tendencia de mayor rendimiento en el solvente de menor polaridad (muestras con acetona) y mayor

contenido de agua (80%). De modo de continuar con la caracterización de los extractos de maqui, se cuantificó el porcentaje de humedad y además su actividad de agua. Los porcentajes de humedad dentro de los extractos varían de un mínimo de 15,5% (correspondiente a la muestra de Ma/Ac:80) y un máximo de 23,71% (correspondiente a la muestra de Ma/Et:20) de humedad luego de la liofilización, con un promedio de  $22,02 \pm 3,27\%$  en todas las muestras, entre las muestras no existen diferencias estadísticamente significativas, por lo tanto se considera un humedad uniforme entre las muestras, Guerrero, 2016 realiza la comparación entre los resultados obtenidos en su investigación y la publicación de Genskowsky (2015), obteniendo resultados muy variables de extracto liofilizado de maqui con valores de 11,15% a 0,74%, la diferencias entre los tres distintos estudios se deben principalmente a la temperatura de liofilización, tomando valores de -80, -52 y -10°C y además al tipo de muestra en estudio, en donde, si existe un mayor proceso de trituración del fruto o de su materia prima inicial, el contenido de agua luego de la liofilización, tiende a disminuir, esto es debido a que en los procesos de homogenización, la fuerza ejercida (mecánica o manual) es capaz de romper las membranas celulares, de modo que en un paso posterior de secado el agua en solución es fácilmente extraíble según el método. Por último, la actividad de agua ( $A_w$ ) que se registró corresponde a un mínimo de 0,27 (correspondiente a la muestra de Ma/Et:80) y un máximo de 0,31 (correspondiente a la muestra de Ma/Ac:50), con un promedio de  $0,28 \pm 0,01$  sin haber diferencias significativas entre las distintas muestras, en este caso, la actividad de agua tiene una relación con la polaridad de los solventes, en donde a medida que aumenta la polaridad, aumenta la actividad de agua de los compuestos, al igual que ocurre en el caso de la humedad de los compuestos, pero no necesariamente así con el rendimiento de liofilización.

Tabla 6.- Caracterización de extractos de maqui y sus resultados de rendimiento, actividad de agua y humedad

Muestra	Rendimiento (%)	Aw	Humedad (%)
Ma/Ac:20	48,36 ± 8,10 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>a</sup>	22,84 ± 0,48 <sup>a</sup>
Ma/Ac:50	46,50 ± 1,55 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,02 <sup>a</sup>	19,16 ± 1,07 <sup>a</sup>
Ma/Ac:80	47,42 ± 1,86 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>a</sup>	15,53 ± 8,02 <sup>a</sup>
Ma/Me:20	48,19 ± 0,68 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,06 <sup>a</sup>	27,49 ± 9,88 <sup>a</sup>
Ma/Me:50	45,35 ± 0,84 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>a</sup>	22,86 ± 0,20 <sup>a</sup>
Ma/Me:80	44,10 ± 11,25 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,00 <sup>a</sup>	23,09 ± 3,54 <sup>a</sup>
Ma/Et:20	40,70 ± 3,63 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,03 <sup>a</sup>	23,71 ± 2,56 <sup>a</sup>
Ma/Et:50	42,99 ± 2,63 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>a</sup>	21,49 ± 2,28 <sup>a</sup>
Ma/Et:80	40,50 ± 4,77 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>a</sup>	22,01 ± 2,39 <sup>a</sup>

Valores expresados en promedio ± desviación estándar, Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas,  $p < 0,05$ .

De los datos anteriores, podemos visualizar que el tipo de solvente o la concentración de este mismo en el proceso de extracción no afecta en la caracterización del extracto, es decir su cambio no altera significativamente la humedad, su actividad de agua y el rendimiento de la liofilización, en donde, finalmente las diferencias que se encuentran se deben a factores propios de cada extracto y además de factores externos, como ambiente, debido a que las condiciones de cada extracción se mantuvieron estandarizadas.

#### b) Cuantificación de Flavonoides y Antocianinas

Mediante cuantificación en HPLC-UV-Visible se logró determinar el área total bajo la curva de las muestras, siendo estas cuantificadas como antocianinas y flavonoides, expresados como miligramos equivalentes de Cianidina-3-glucósido y Quercitina-3-glucósido respectivamente, por mililitro de extracto y por gramo de extracto. Este último dato se logró cuantificar gracias al estudio hecho por Andrade et al., 2024, está basado en el mismo tipo de extracto y logra diferenciar las muestras por mililitro de extracto y por gramo de extracto para fines comparativos, obteniendo una densidad de 0,477 (g/ml).

Del análisis mediante HPLC-UV-Visible se lograron obtener los cromatogramas expuestos en la figura 5. En el gráfico 2 y 3 se pueden apreciar las diferencias entre cada

muestra en función a los flavonoides y antocianinas respectivamente. En cuanto al gráfico 1, la menor cuantificación de flavonoides se presenta en la muestra de Ma/Me:20, mientras que las mayores dos corresponden a Ma/Et:50 y Ma/Ac:50. En cuanto a la cuantificaciones de los flavonoides se puede ver una tendencia que las muestras con menor contenido de solvente (20%) contienen una menor cantidad de antocianinas, pero no es correlativo a los solventes con mayor porcentaje, siendo las muestras de 50% de solvente y 50% de agua las cuales tuvieron una mayor cuantificación, aunque solo se puede marcar como una tendencia ya que las diferencias entre estos datos no son significativas.

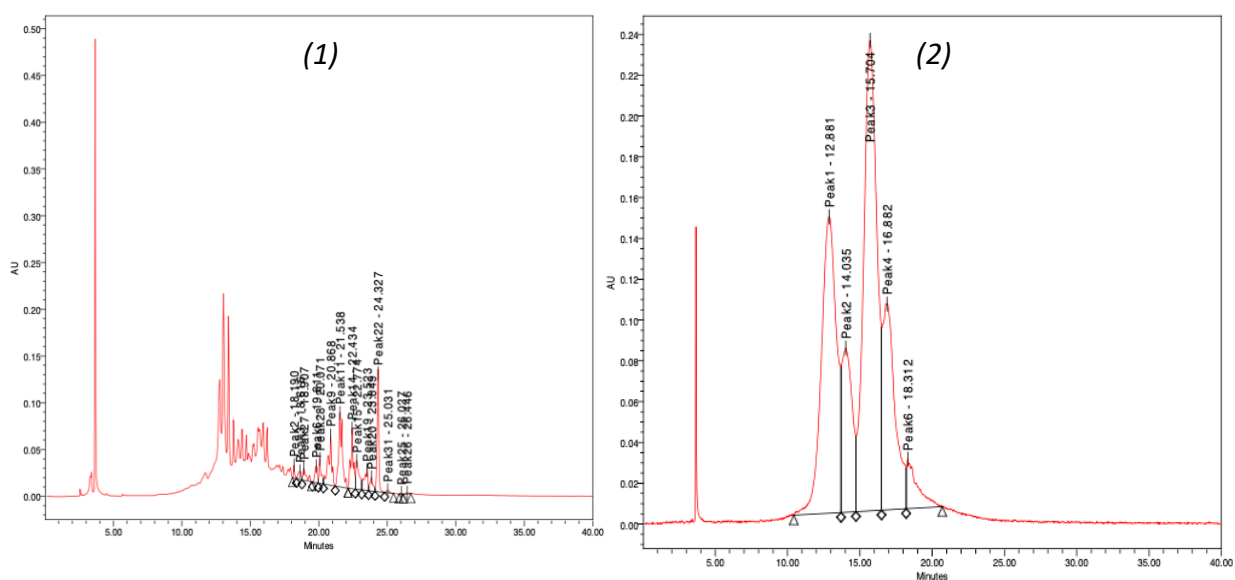
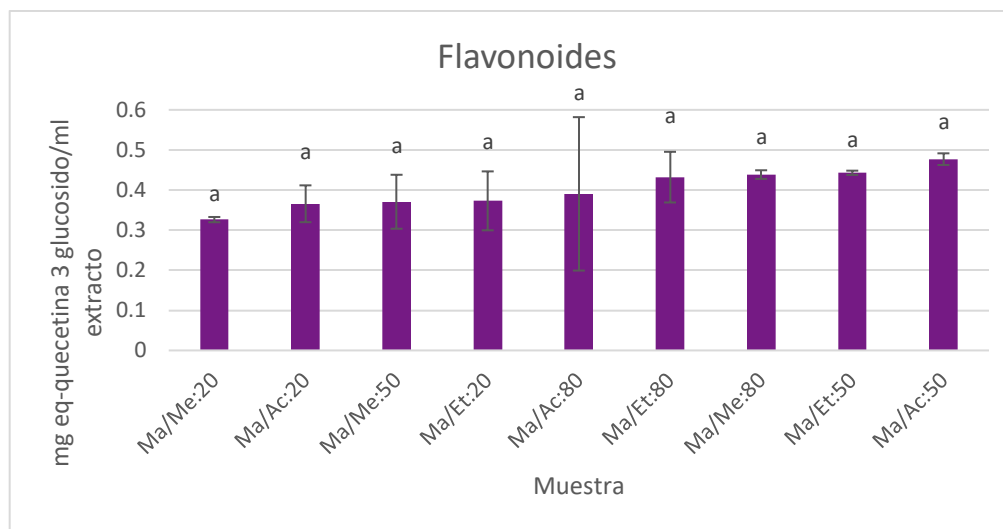


Figura 6: Cromatograma de extracto de Ma/Me:20 de Flavonoides (1) y Antocianinas (2).

En cuanto a la cuantificación de antocianinas esta fue más de 5 veces mayor a la cantidad de flavonoides en promedio, cuantificados como [mg-eq de cianidina-3-glucosido/ml extracto] y [como mg-eq de quercitina-3-glucosido/ml extracto] respectivamente. En el grafico 2 se aprecia una mayor cantidad de antocianinas en el extracto con 80% de metanol como solvente, seguido por etanol con 50% como solvente de extracción, según el diseño de ANOVA multifactorial (figura 7) se puede visualizar que no existen diferencias significativas en el uso de distintos solventes, pero si en la concentración en la que se encuentra este en el extracto, encontrando datos

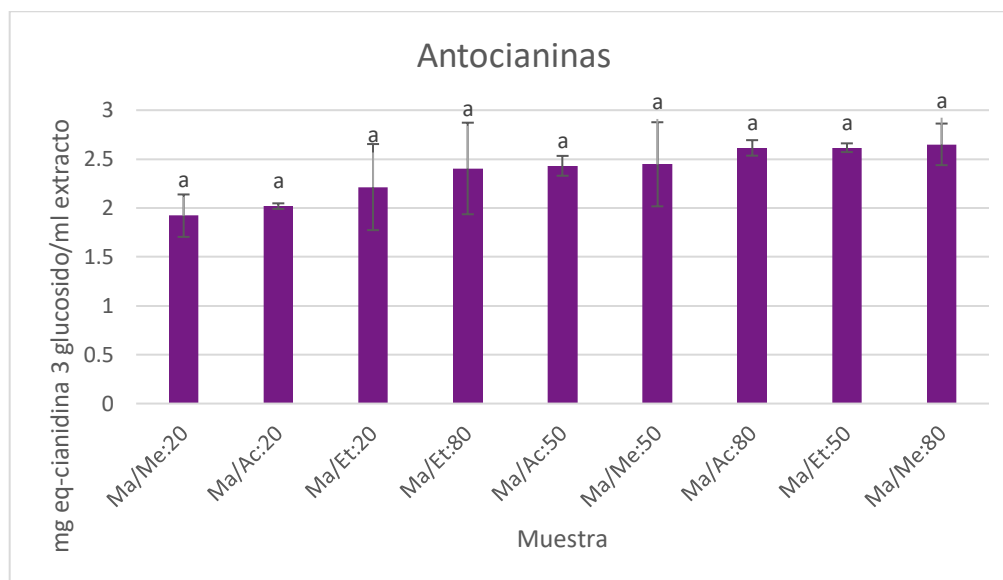
significativamente mayores para un porcentaje de 50% y 80%, cuantificando un número mayor de antocianinas, aunque el escenario no es el mismo para los flavonoides, en donde no existen diferencias ni entre el tipo de solvente ni la concentración de estos en el extracto.

Gráfico 2.- Cuantificación de flavonoides del maqui, expresados como mg eq-quercetina-3-glucosido/ml extracto.



Letras distintas en las filas indican diferencias significativas,  $p < 0,05$ .

Gráfico 3.- Cuantificación de antocianinas del maqui, expresados como mg eq-cianidina-3-glucósido/ml extracto.



Letras distintas en las filas indican diferencias significativas,  $p < 0,05$ .

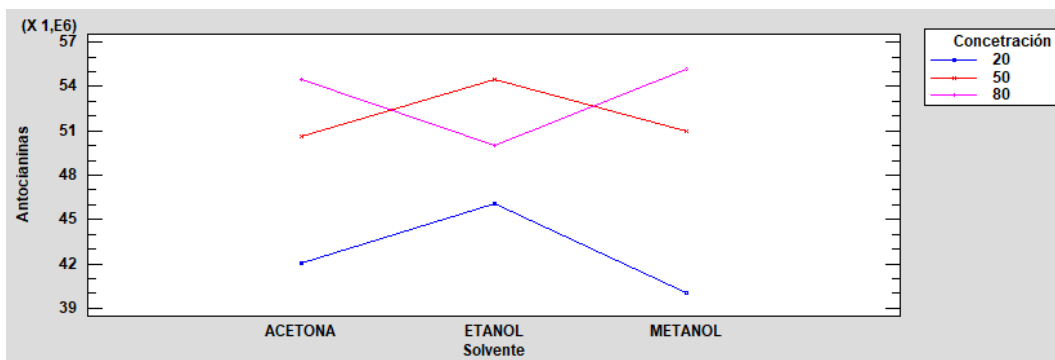


Figura 7: Análisis de ANOVA multifactorial de dos factores para las antocianinas y el tipo de solvente y su concentración, obtenida de Statgraphics.

En la tabla 7 se ponen en comparación la cuantificación de antocianinas y flavonoides de los extractos en gramos de extracto, visualizando así que el solvente que entrega mayor cuantificación es el metanol en un 80% para las antocianinas, seguido del etanol en proporciones de 50% y 80% respectivamente.

Genskowsky et al., 2016 utilizó el mismo método de extracción descrito para la muestra con solvente de 80% de metanol y agua acidificada, obteniendo extractos de maqui con altas cantidades de antocianinas y casi inexistentes cantidades de compuestos No-Antocianinas, siendo aproximadamente 10 veces mayor el contenido de ambos, expresado como g/Kg DM o mg/g, a pesar de ser el mismo tipo de extracto, las diferencias se pueden encontrar debido a método de identificación y curvas utilizadas en ambos métodos HPLC-UV-Visible, en donde la metodología se ajustó más al tipo de muestras utilizadas, los resultados de otros autores se correlacionan con los datos de Genskowsky, Rojo et al., 2012, realizó la cuantificación de antocianinas de un extracto mediante metanol al 70% y agua sin acidificar obteniendo contenidos de 39,5 (mg eq-cianidina 3 glucósido/g) y por último (Vega & Muñoz, 2017) realizó una cuantificación de antocianinas de un extracto de maqui obtenido mediante agua acidificada (0,1% de HCL v/v) cuantificando  $1,00 \pm 0,01$  mg eq-cianidina 3 glucósido/ml extracto, siendo este dato aproximadamente 2,5 veces menor a lo cuantificado en este estudio. El tipo de extracción afecta directamente sobre las antocianinas utilizadas, en este caso se logra

visualizar que el uso de solventes como etanol y metanol logra obtener mayores valores de antocianinas que utilizando solo agua.

*Tabla 7.-Resultado de concentración de Flavonoides y Antocianinas promedio para los extractos de maqui*

Muestra	Concentración de Antocianinas (mg eq-cianidina-3-glucósido/g extracto)	Concentración de Flavonoides (mg eq-quercetina-3-glucósido/g extracto)
Ma/Ac:20	4,23 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,10 <sup>b</sup>
Ma/Ac:50	5,10 ± 0,21 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,03 <sup>b</sup>
Ma/Ac:80	5,48 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,40 <sup>b</sup>
Ma/Me:20	4,03 ± 0,45 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,01 <sup>b</sup>
Ma/Me:50	5,13 ± 0,90 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,14 <sup>b</sup>
Ma/Me:80	5,56 ± 0,45 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,02 <sup>b</sup>
Ma/Et:20	4,64 ± 0,92 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,15 <sup>b</sup>
Ma/Et:50	5,48 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,01 <sup>b</sup>
Ma/Et:80	5,04 ± 0,98 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,13 <sup>b</sup>

Valores expresados en promedio ± desviación estándar, letras distintas en las filas y columnas indican diferencias significativas, p<0,05.

### **Análisis de Capacidad Antioxidante**

Debido a que un solo método de análisis para la capacidad antioxidante puede no determinar una tendencia en los resultados, debido al tipo de variabilidad que posee cada uno y su sensibilidad de detección, para este análisis se realizaron dos análisis:

- Captación del radical ABTS<sup>+</sup>
- ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno)

#### a) Captación del Radical ABTS<sup>+</sup>:

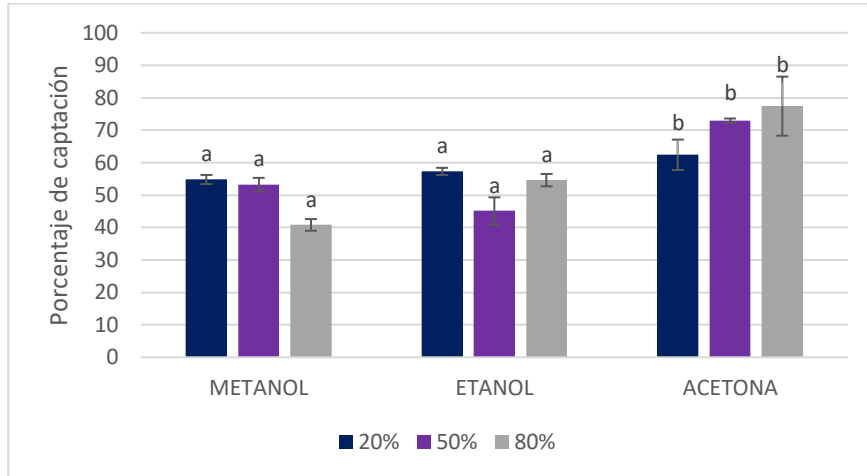
Se cuantificó el porcentaje de captación del radical ABTS<sup>+</sup>, para las nueve muestras de maqui en duplicado, para el método descrito anteriormente.

En el gráfico 4, se pueden apreciar las diferencias entre el porcentaje de capacidad antioxidante en función del solvente y la proporción utilizada, en donde las mezclas de acetona contienen valores significativamente mayores que las muestras de etanol y metanol, obteniendo valores sobre el 60% y cercano a un 80% de captación



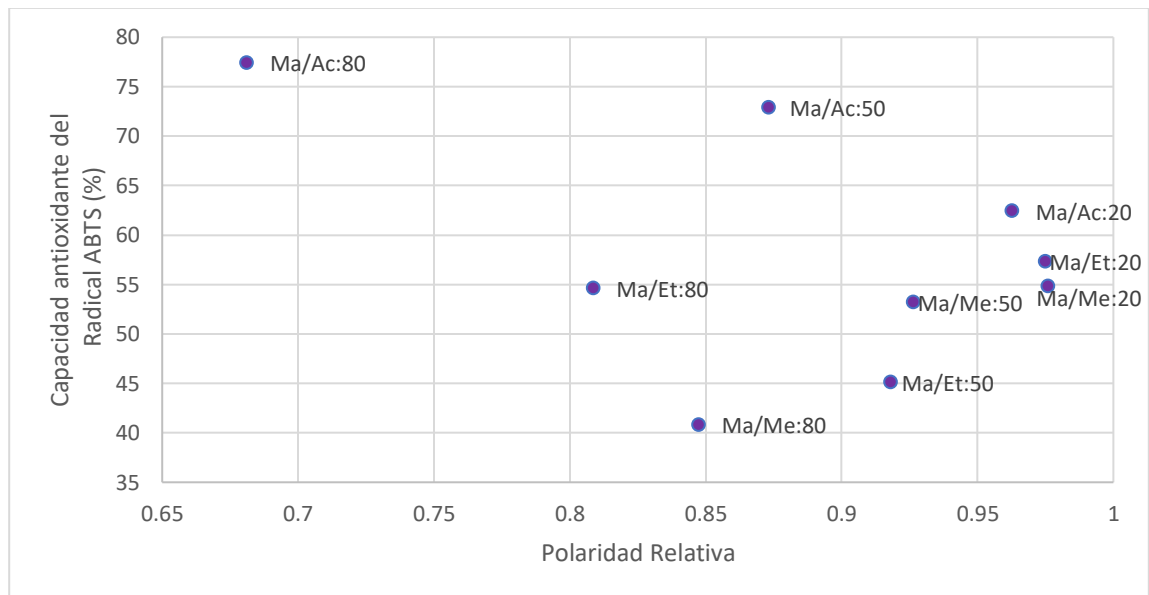
del radical por los polifenoles cuantificados anteriormente para los tres tipos de solventes de acetona.

*Gráfico 4.- Capacidad antioxidante mediante captación del radical ABTS<sup>+</sup> (%) para los distintos solventes y extractos*



Valores expresados en promedio  $\pm$  desviación estándar, letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ )

*Gráfico 5.- Relación entre capacidad antioxidante mediante ABTS y polaridad relativa de las muestras*

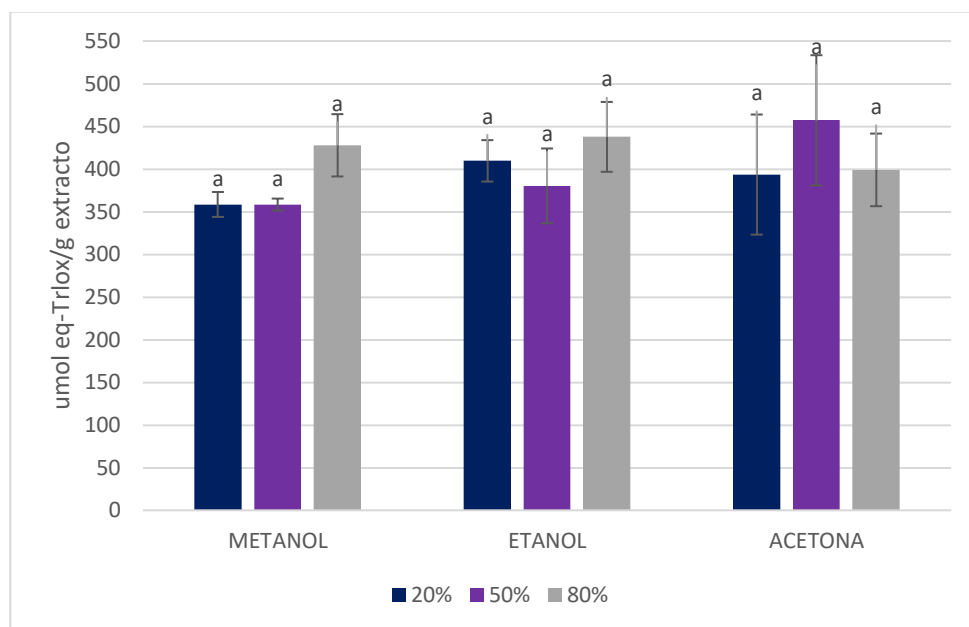


Del gráfico 5 se puede observar la relación de polaridad relativa de las muestras y su capacidad antioxidante según el método ABTS, en este caso se observa que a medida que disminuya la polaridad de las muestras, se logra obtener una mayor capacidad de retención del radical ABTS<sup>+</sup> en donde los extractos con acetona lograron valores significativamente mayores que los extractos de etanol y metanol, siendo estos últimos los extractos más polares y con los menores resultados de captación de radical ABTS<sup>+</sup>. Otros autores han indicado un nivel de captación máxima cercano a los obtenidos en este estudio con valores de  $85,9 \pm 0,6$ ,  $95,7 \pm 0,9$  y  $97,6 \pm 0,94$  % (Cespedes et al., 2017; Lillo, A.; Carvaján-Caiconte, F.; Nuñez, D.; Balboa, N.; Alvear, 2016) para extractos de maqui obtenidos con metanol acidificado y etanol acidificado respectivamente, en ninguno de los casos anteriores se utilizó acetona como el solvente de extracción.

b) ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno):

Como se revisó anteriormente dentro de los distintos métodos de capacidad antioxidante el método ORAC es uno de los más utilizados debido a su adaptabilidad y a su asertividad en cuanto a la actividad antioxidante, en este estudio se sometieron las muestras al análisis de capacidad antioxidante mediante ORAC utilizando como agente oxidante APPH y los antioxidantes naturales del maqui en distintas concentraciones para poder confirmar si hay o no una capacidad antioxidante frente al APPH (agente oxidante). Los resultados se encuentran expuestos en el gráfico 6, en donde el valor mayor de capacidad antioxidante corresponde a la muestra de Ma/Ac:50 y la menor corresponde a Ma/Me:50 con resultados de  $457,1 \pm 40,9$  y  $358,4 \pm 24,3$  (umol-eq-Trolox/g extracto) respectivamente, en este caso no existen diferencias significativas entre las muestras en la cantidad de umol-eq-Trolox/g extracto, tanto para el tipo de solvente ni para su concentración (20, 50 y 80%).

Gráfico 6.- Capacidad antioxidante mediante método ORAC para los distintos solventes y extractos



Valores expresados en promedio  $\pm$  desviación estándar, letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ )

De la literatura, se pueden encontrar resultados similares en función a la capacidad antioxidante medida por el método ORAC expresados en la tabla 8. El tipo de muestra utilizada en los estudios es un gran diferenciador en la capacidad de oxidante obtenida, para los resultados de maqui fresco, se encontraron valores mayores que para el fruto seco (por liofilización y atomización) y mediante extractos obtenidos en este estudio, Rodríguez et al., 2016 realizó un tratamiento de secado por convección a temperaturas de 40, 50, 60, 70 y 80°C teniendo una pérdida de la capacidad antioxidante de aproximadamente un 30% (valor no cuantificado por autores), solo encontrando una menor pérdida en las muestras sometidas a mayor temperatura (60, 70 y 80°C) con una capacidad aproximada de 400  $\mu\text{mol-eq-trolox/g}$ . En el estudio de Girones-Vilaplana las muestras de maqui liofilizado (dos muestras distintas) y maqui secado por atomización, presentan valores bajos en comparación a las otras muestras, siendo el tipo de tratamiento dado la posible pérdida de capacidad antioxidante, sobre todo posible exposición a la luz a lo largo

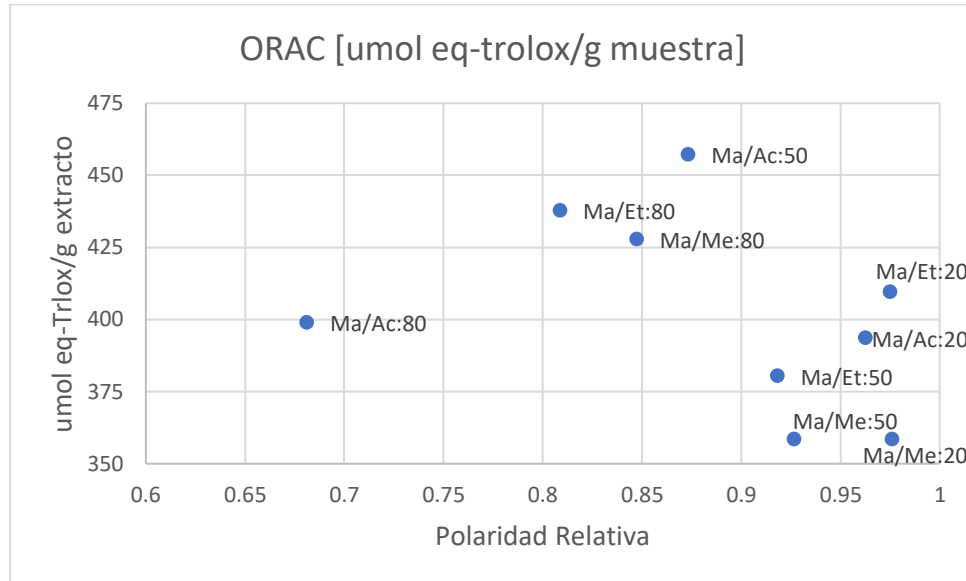
de su procesamiento. Los datos obtenidos podrían indicar que una optimización en el proceso de extracción del maqui podría aumentar los valores de capacidad antioxidante, de modo que se logre a la vez cuantificar una mayor cantidad de polifenoles.

*Tabla 8: Comparación de la capacidad antioxidante mediante método ORAC*

<b>Fuente</b>	<b>Tipo de Muestra Utilizada</b>	<b>Capacidad Antioxidante (<math>\mu\text{mol-eq-Trolox/g extracto bs}</math>)</b>
Rodríguez et al., 2016	Maqui fresco	$599,5 \pm 16,8$
Gironés-Vilaplana et al., 2014	Maqui liofilizado	$299,0 \pm 9,8$
	Maqui liofilizado	$268,0 \pm 16,4$
	Maqui Secado por atomización y microencapsulado	$181,8 \pm 2,9$
Este Estudio	Extractos de maqui en agua acidificada (0,1% HCL) y solventes (acetona, etanol, metanol) en proporciones de 20, 50 y 80%	$457,1 \pm 40,9 - 358,4 \pm 24,3$

En el gráfico 7 se logra ver la relación entre la capacidad antioxidante y la polaridad relativa de los extractos en estudio, en este caso un punto medio de polaridad logra obtener los mejores resultado de capacidad antioxidante, mientras que una mayor polaridad relativa (cercana a 1) obtiene los menores valores de capacidad antioxidante, la molécula que mayor capacidad otorga al maqui corresponde a la antocianina, esta corresponde a una molécula del tipo polar (Muhlack et al., 2018) , teniendo una alta interacción con el agua, en este caso una disminución en la polaridad relativa logra una mayor capacidad antioxidante, yendo de la mano con la cuantificación de antocianinas vista anteriormente en donde el metanol y el etanol en un 80% lograron cuantificar una mayor cantidad.

Gráfico 7.- Relación entre capacidad antioxidante mediante método ORAC y polaridad relativa de las muestras.



Valores expresados en promedio  $\pm$  desviación estándar, letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ )

En la figura 7 se logra ver la relación mediante una anova multifactorial entre la capacidad antioxidante mediante el método ORAC y el tipo de solvente utilizado y la concentración en que se encuentra el solvente, para que un resultado sea significativo las rectas de la figura deben estar separadas de sus correlativas, en este caso no hay separación de ninguna recta, lo que indica que no existen diferencias significativas ni para el tipo de solvente utilizado o para la concentración en la que se encuentra el solvente.

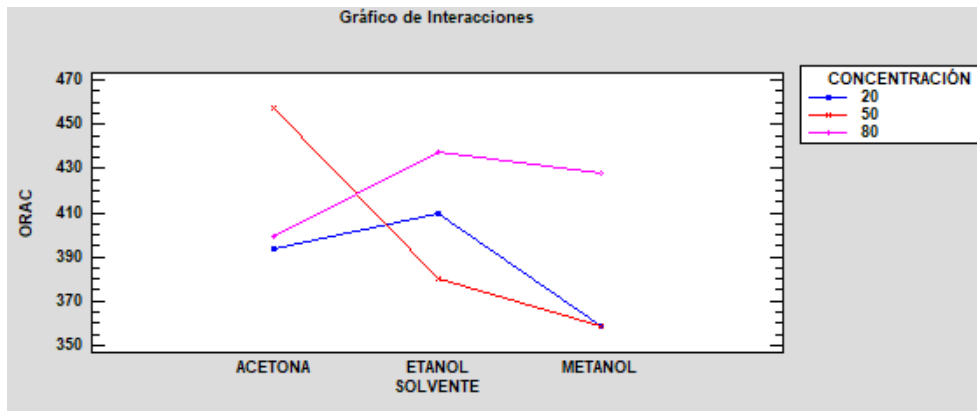


Figura 8: Análisis de ANOVA multifactorial de dos factores para ORAC y el tipo de solvente y su concentración, obtenida de Statgraphics.

## 6. Conclusiones

Se logró obtener un método de extracción óptimo de los compuestos fenólicos del maqui (flavonoides y antocianinas), logrando así las mejores condiciones de extracción para cuantificar estas y para obtener la mayor capacidad antioxidante. Esto fue mediante la caracterización de los extractos mediante las variables expuestas (humedad, actividad de agua, rendimiento, cuantificación de antocianinas y flavonoides mediante HPLC-UV-Visible y capacidad antioxidante mediante método ABTS y ORAC).

De estos resultados obtenidos se puede observar que a pesar de que existen diferencias entre los extractos, estas no son significativas, en este caso el solvente utilizado acetona logro en conjunto los mejores resultados, pero, debido a que es un solvente no recomendado para su uso en alimentos, o en este caso específico para nutraceuticos, a partir de esto, se lograron obtener resultados similares con solventes como etanol y metanol a excepción de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS<sup>+</sup>. En este caso los resultados de mayor interés en el estudio y para el fruto en cuestión corresponden a las antocianinas y su mayor cuantificación corresponde a la mezcla de etanol al 80% y para la capacidad antioxidante mediante ORAC corresponde a la misma mezcla, siendo esta el ideal para su extracción.

## 7. Referencias

- Andrade, D., Maldonado-bravo, F., Albuquerque, A., Camilo, P., Gamboa, A., Caro, N., ... Tapia, C. (2024). *Nanoencapsulation of Maqui ( Aristotelia chilensis ) Extract in Chitosan – Tripolyphosphate and Chenopodin-Based Systems*.
- Ángel, M., Hidalgo, G., & Rubio, M. O. (2018). Estrés oxidativo y antioxidantes. *Avances En Investigación Agropecuaria*, 22(1), 127–118.
- Benedetti, S. (2012). *Monografía de Maqui Aristotelia Chilensis (Mol.) Stuntz*.
- Brauch, J. E., Buchweitz, M., Schweiggert, R. M., & Carle, R. (2016). Detailed analyses of fresh and dried maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) berries and juice. *Food Chemistry*, 190, 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.097>
- Brauch, Johanna Elisabeth, Reuter, L., Conrad, J., Vogel, H., Schweiggert, R. M., & Carle, R. (2017). Characterization of anthocyanins in novel Chilean maqui berry clones by HPLC–DAD–ESI/MSn and NMR-spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.003>
- Céspedes, C. L., El-Hafidi, M., Pavon, N., & Alarcon, J. (2008). Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chemistry*, 107(2), 820–829. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.092>
- Céspedes, C. L., Pavon, N., Dominguez, M., Alarcon, J., Balbontin, C., Kubo, I., ... Avila, J. G. (2017). The chilean superfruit black-berry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui as mediator in inflammation-associated disorders. *Food and Chemical Toxicology*, 108, 438–450. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.036>
- Estudio de Medicina Digestiva UC afirma un aumento de hospitalización por enfermedades inflamatorias del intestino - Escuela de Medicina UC.* (2018, 10 junio). Escuela de Medicina UC. Recuperado 5 de agosto de 2023, de <https://medicina.uc.cl/noticias/estudio-de-medicina-digestiva-uc-afirma-un-aumento-de-hospitalizacion-por-enfermedades-inflamatorias-del-intestino-2/>
- Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 56(2).
- Fernández, M. P., Doll, U., & Vallejos, C. (2019). *El Maqui: fruto forestal chileno famoso a nivel mundial*. (January).
- Genskowsky, E. (2015). *CARACTERIZACIÓN DE LIOFILIZADO DE MAQUI ( Aristotelia chilensis ( Molina ) Stuntz ) Y SU INCORPORACIÓN A UNA MATRIZ ALIMENTARIA TIPO PELÍCULA COMESTIBLE*. 1–75.
- Genskowsky, Estefania, Puente, L. A., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., Muñoz, L. A., & Viuda-Martos, M. (2016). Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(12), 4235–4242. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7628>
- Gironés-Vilaplana, A., Baenas, N., Villaño, D., Speisky, H., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2014). Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 599–608.



- <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.025>
- González, M. (2002). Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII); *Revista Chilena de Pediatría* v73 (5); 508-510, 2002. <http://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062002000500012>
- Guerrero, O. M. B. (2011). *Bioaccesibilidad de Antocianinas, Polifenoles Totales y Capacidad Antioxidante en Maqui (Aristotelia chilensis[Mol] Stuntz), Secado por Convección y Liofilización*. 1–63.
- INTA (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. (2011). *ANTIOXIDANTES EN ALIMENTOS: PRINCIPALES FUENTES Y SUS CONTENIDOS*. Portal Antioxidantes Primer Portal de Antioxidantes, Alimentos y Salud en el Mundo de Habla Hispana. Recuperado 10 de junio de 2022, de <http://portalantioxidantes.com/antioxidantes-en-alimentos/>
- INTA. (2021, 15 septiembre). ORAC: Su significado y correcta interpretación. Recuperado 11 de julio de 2022, de <http://portalantioxidantes.com/2011/07/22/antioxidantes-en-frutas/>
- Lillo, A.; Carvaján-Caiconte, F.; Nuñez, D.; Balboa, N.; Alvear, M. (2016). Cuantificación espectrofotométrica de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en distintos berries nativos de Cono Sur de América. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 42(2), 168–174.
- Machado, A. P. da F., Geraldini, M. V., do Nascimento, R. de P., Moya, A. M. T. M., Vezza, T., Diez-Echave, P., ... Maróstica Júnior, M. R. (2021). Polyphenols from food by-products: An alternative or complementary therapy to IBD conventional treatments. *Food Research International*, 140(July 2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110018>
- Muhlack, R. A., Potumarthi, R., & Jeffery, D. W. (2018). Sustainable wineries through waste valorisation: A review of grape marc utilisation for value-added products. *Waste Management*, 72, 99–118. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.011>
- Olate, V. (2008). *Estudio químico y actividad antioxidante de los antocianos presentes en los frutos de maqui*. Talca, Chile: Universidad de Talca
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Pinto, A. A., Fuentealba-Sandoval, V., López, M. D., Peña-Rojas, K., & Fischer, S. (2022). Accumulation of delphinidin derivatives and other bioactive compounds in wild maqui under different environmental conditions and fruit ripening stages. *Industrial Crops and Products*, 184(December 2021). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115064>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1998). Antioxidant activity applying an improved ABTS Radical cation Decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(1999), 7.
- Rodríguez, K., Ah-Hen, K. S., Vega-Gálvez, A., Vásquez, V., Quispe-Fuentes, I., Rojas, P., & Lemus-Mondaca, R. (2016). Changes in bioactive components and antioxidant capacity of maqui, *Aristotelia chilensis* [Mol] Stuntz, berries during drying. *Lwt*, 65, 537–542. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.050>
- Rojo, L. E., Ribnicky, D., Logendra, S., Poulev, A., Rojas-Silva, P., Kuhn, P., ... Raskin, I. (2012).

- In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chemistry*, 131(2), 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.066>
- Rubio, J., & Rodriguez, S. (2018). “Extracción de compuestos bioactivos mediante pre-tratamiento con microondas de subproductos vitivinícolas. Valorización del raspón de la uva.” *UdeV*, 1(1), 15.
- Salinas, J., & Caballé, G. (2020). Maqui: el fruto silvestre de mayor importancia en Chile. In *Instituto Forestal*. <https://doi.org/10.52904/20.500.12220/30380>
- Tovar, J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plntas recolectadas en la ecoregión cafetera. In *Occupational Medicine* (Vol. 53).
- Vega, P., & Muñoz, O. (2017). *Elaboración de un abebida funcional con compuestos bioactivos de maqui, a partir de suero fermentado con Lactobacillus helveticus*. 1–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.myaccess.library.utoronto.ca/pubmed/11720961>
- Zapata, C., & Zapata, P. (2019). Estandarización del método ORAC como herramienta básica de análisis de la capacidad antioxidante de diversas sustancias. *Universidad CES*, 1–15. Retrieved from <https://repository.ces.edu.co/handle/10946/3943>
- Zapata, L., Heradia, A., Quinteros, C., Mallaret, A., Clemente, G., & Cárcel, J. (2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 25(49), 166–192.