



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LIOFILIZADO DE MAQUI (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) Y SU INCORPORACIÓN A UNA MATRIZ ALIMENTARIA TIPO PELÍCULA COMESTIBLE**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

**ESTEFANÍA GENSKOWSKY ORTIZ**

**Patrocinante**

**Dr. LUIS PUENTE DÍAZ**

Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química  
Universidad de Chile

**Directores**

**Dr. LUIS PUENTE DÍAZ**

Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química  
Universidad de Chile

**Dra. LORETO MUÑOZ HERNÁNDEZ**

Departamento de Ingeniería Química y Bioprocesos  
Pontificia Universidad Católica de Chile

Santiago, Chile

2015

*Dedicado a  
Hortensia Márquez Navarrete*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, quienes me han enseñado el valor y el poder que tiene una sonrisa frente a la vida. Por el incondicional apoyo y amor que he recibido de ellos toda mi vida. En especial a mi madre, María Angélica por no dejarme caer jamás, por enfrentar la vida con optimismo y nobleza, por enseñarme que una familia no tiene relación con el número de integrantes, por creer en mis sueños y hacerlos suyos. A mi hermana, María Paz por enseñarme a ser perseverante y a no rendirme frente a ninguna adversidad. A Humberto, por su apoyo, comprensión y por concluir junto a mí esta etapa universitaria y comenzar la siguiente, juntos.

Al laboratorio de Biomateriales del Departamento de Ingeniería Química y Bioprocesos de la Escuela de Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica de Chile, quienes me acogieron como una más del grupo, me ayudaron y me guiaron, muchas gracias.

Al laboratorio de Industrialización de Productos de Origen Animal (IPOA) del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela, en especial a Manuel Viuda y José Ángel Pérez, por su ayuda y colaboración en la realización de esta investigación, y también por hacerme sentir como en casa, muchísimas gracias a ambos.

A mis directores de memoria: Loreto Muñoz y Luis Puente, por creer en mí y brindarme su apoyo, tanto en lo académico como en lo personal durante esta experiencia, por permitirme aprender de ustedes. Espero haber sido una digna memorista.

A mis amigas de toda la vida y a los que encontré en esta etapa: Camila y Francisco, muchas gracias por permitirme ser parte de sus vidas, sin duda esta etapa no hubiera sido la misma sin ustedes queridísimos.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>vi</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
2.1. Materia Prima ( <i>Aristotelia chilensis</i> (Molina) Stuntz) .....	11
2.1.1. Antecedentes generales .....	11
2.1.2. Distribución geográfica .....	12
2.1.3. Cultivo y Hábitat.....	12
2.1.4. Descripción Botánica .....	13
2.1.5. Taxonomía.....	14
2.1.6. Composición química .....	15
2.1.7. Propiedades y usos .....	15
2.1.8. Polifenoles y su actividad antioxidante .....	16
2.1.9. Compuestos bioactivos de <i>Aristotelia chilensis</i> : Evidencia científica. 17	
2.1.10. Polifenoles y flavonoides con actividad antimicrobiana .....	19
2.2. Liofilización.....	20
2.3. Generalidades de las películas comestibles .....	22
2.3.1. Quitosano .....	24
2.3.2. Films de quitosano.....	25
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>27</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
4.1. Objetivo General .....	28
4.2. Objetivos Específicos .....	28
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
5.1. Lugar de trabajo .....	29
5.2. Materia Prima.....	29
5.3. Metodología de análisis liofilizado de maqui .....	30
5.3.1. Obtención del liofilizado.....	30

5.3.2.	Capacidad antioxidante .....	30
5.3.3.	Contenido de polifenoles totales.....	32
5.3.4.	Contenido de flavonoides totales.....	32
5.3.5.	Actividad antimicrobiana.....	33
5.3.6.	Determinación del análisis proximal .....	34
5.4.	Metodología de análisis a los films.....	35
5.4.1.	Elaboración de films .....	35
5.4.2.	Obtención de extractos de los films .....	35
5.4.3.	Análisis químicos a los films .....	36
5.4.4.	Actividad antimicrobiana.....	36
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
6.1.	Resultados para el liofilizado de maqui.....	37
6.1.1.	Capacidad antioxidante .....	37
6.1.2.	Contenido de polifenoles totales.....	38
6.1.3.	Contenido de flavonoides totales.....	39
6.1.4.	Actividad antimicrobiana .....	40
6.1.5.	Composición química.....	41
6.2.	Resultados para los films .....	44
6.2.1.	Capacidad antioxidante .....	44
6.2.2.	Contenido de polifenoles totales.....	45
6.2.3.	Contenido de flavonoides totales.....	46
6.2.4.	Actividad antimicrobiana .....	47
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>51</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>63</b>

## RESUMEN

Teniendo en cuenta el creciente interés por el consumo de alimentos benéficos para la salud humana por parte de la población, los berries adquieren cada vez más protagonismo en este nuevo estilo de vida sana. Dentro de ellos, destaca el maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz), berry nativo chileno conocido por su alto contenido de compuestos bioactivos. Por otro lado, la industria alimentaria está cada vez más interesada en envases activos. Gracias a esta premisa es que las películas comestibles están siendo estudiadas debido a los beneficios que aportarían en contra del deterioro alimentario.

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el potencial tecnológico de componentes antioxidantes obtenidos del liofilizado de maqui y su aplicación en películas comestibles de quitosano. Para ello se realizaron análisis de (i) capacidad antioxidante, (ii) contenido de polifenoles totales (iii) contenido de flavonoides totales (iv) actividad antimicrobiana, tanto al liofilizado como a las películas elaboradas y (v) composición química del liofilizado de maqui.

Los resultados obtenidos comprobaron que el liofilizado de maqui posee una alta capacidad antioxidante mediante DPPH, FRAP y FIC de  $2,81 \pm 0,04$  mg ET/g;  $25,2 \pm 0,38$  mg ET/g y  $121,12 \pm 1,88$   $\mu$ g EDTA/g, respectivamente. Así como también altos contenidos de polifenoles y flavonoides totales de  $49,74 \pm 0,57$  mg EAG/g y  $68,04 \pm 24,63$  mg ER/g, respectivamente. Además, presentó actividad antimicrobiana mediante el método de microdilución contra ocho cepas bacterianas. Los contenidos de materia grasa, cenizas, fibra dietaria total y humedad fueron  $0,9 \pm 0,07$ ;  $1,44 \pm 0,004$ ;  $30,47 \pm 1,29$  g/100g p.s. (peso seco) y 0,74 %, respectivamente. En los films, los análisis mostraron correlación entre la concentración de liofilizado incorporado y la cuantificación realizada, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en todos los análisis excepto en capacidad antioxidante mediante FIC, donde no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre las muestras. En cuanto

a la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en disco de agar, los films con liofilizado de maqui fueron más efectivos que el control (quitosano puro), ya que generaron halos de inhibición en siete de las ocho cepas bacterianas testadas, mientras que los films control sólo generaron halos en dos de las ocho cepas. Los resultados mostraron que el liofilizado de maqui podría ser utilizado tanto como ingrediente funcional, así como preservante natural en la industria alimentaria. Por otro lado, los films de quitosano con liofilizado de maqui incorporados podrían ser utilizados como películas activas debido a sus excelentes actividades antioxidantes y antimicrobianas.

**Palabras clave:** maqui, capacidad antioxidante, películas comestibles, quitosano, antimicrobiano.

## SUMMARY

“Lyophilized Maqui characterization (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) and it's incorporation to a food matrix”

Thinking about the increasing interest of the people in using food that benefits the human health, berries are having a leading role in this new healthy lifestyle. Among them, one of the recognized is the Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz), Chilean native berry known for it's high bioactive compound content. Besides, in the food industry the interest in active packaging is growing. Thanks to this premise is that edible films are being studied because of their benefits against food spoilage.

The aim of this work was to assess the technological potential of antioxidant components obtained by the lyophilization of the maqui and its application to edible chitosan films. With this purpose the analyzes performed were (i) the antioxidant activity, (ii) total phenolic content (iii) total flavonoid content (iv) antimicrobial activity assay of the lyophilized maqui and also about films elaborated and (v) chemical composition of the lyophilized maqui.

The results obtained proved that lyophilized maqui has a high antioxidant activity through DPPH, FRAP and FIC of  $2,81 \pm 0,04$  mg TE/g;  $25,2 \pm 0,38$  mg TE/g and  $121,12 \pm 1,88$   $\mu$ g EDTA/g, respectively. As well as high content of polyphenols and flavonoids of  $49,74 \pm 0,57$  mg EAG/g and  $68,04 \pm 24,63$  mg RE/g, respectively. It also presented antimicrobial activity by the microdilution method against eight bacterial strains. Fat, ash, total dietary fiber and moisture contents of lyophilized maqui were  $0,9 \pm 0,07$ ;  $1,44 \pm 0,004$ ;  $30,47 \pm 1,29$  g/100g d.m. (dry matter) and 0,74 %, respectively. About the films, chemical analysis showed correlation between the concentration of incorporated lyophilized and the quantification performed, with statistically significant differences ( $p < 0,05$ ) in every analysis except antioxidant capacity by FIC, where there were no statistically significant differences ( $p > 0,05$ ) in the film samples. Concerning the antimicrobial activity by disc diffusion method,



the films with incorporated lyophilized maqui were more effective than the control (pure chitosan), because inhibition halos generated in seven of the eight bacterial strains tested. While control films generated halos in only two of the eight strains. Results showed that lyophilized maqui could be used both as a functional ingredient and a natural preservative in the food industry. Furthermore, chitosan films with incorporated lyophilized maqui could be used as active films due to their excellent antioxidant and antimicrobial activities.

**Key words:** maqui, antioxidant capacity, edible films, chitosan, antimicrobial.

## 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día existe un creciente interés por parte de los consumidores por integrar a la dieta alimentos que tengan efectos benéficos en la salud humana, entre ellos se encuentran los berries, frutos ricos en compuestos bioactivos como antocianinas y otros fitoquímicos. Dentro de los berries destaca el maqui (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz), fruto nativo chileno de la familia *Elaeocarpaceae* obtenido de arbustos siempre verdes denominados “macales”, el cual produce pequeñas bayas de no más de 6 mm de diámetro de color púrpura/negro (Gironés-Vilaplana, et al. 2012). Este berry ha sido estudiado por su alto contenido de antioxidantes y compuestos fenólicos (Céspedes, et al. 2008, Fredes, et al. 2014, Gironés-Vilaplana, et al. 2014). Además, el maqui por si solo o sus extractos pueden ser utilizados como ingredientes funcionales en distintas preparaciones como licores, bebidas no alcohólicas, diversos alimentos nutracéuticos e incluso ser incorporado a matrices alimentarias tipo película.

Las películas comestibles corresponden a recubrimientos que pueden prolongar la vida útil de un alimento otorgando un efecto protector en frutas y hortalizas evitando así su deshidratación, reduciendo la respiración, ayudando a preservar los compuestos volátiles y reducir el deterioro microbiano (Giosafatto, et al. 2014). Algunos autores han agregado ingredientes funcionales bioactivos a películas comestibles, otorgándole así propiedades antimicrobianas y antioxidantes previniendo el crecimiento de patógenos (Ponce, et al. 2008; Li, et al. 2014; Siripatrawan and Harte, 2010; Ruiz-Navajas, 2014).

Por otro lado, la liofilización es un proceso de deshidratación por sublimación de un producto congelado. Debido a la ausencia de agua líquida y las bajas temperaturas del proceso, se detienen reacciones de deterioro entregando un producto final de alta calidad, protegiendo la estructura primaria del alimento y con ello reteniendo gran cantidad de compuestos bioactivos (Ratti, 2001).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial tecnológico de componentes antioxidantes obtenidos del liofilizado de maqui y su aplicación a una matriz alimentaria tipo película comestible de quitosano.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Materia Prima (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz)

#### 2.1.1. Antecedentes generales

*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz, también conocido como “maqui”, “chilean blackberry” (Inglaterra), “koelon” (Argentina), “maki” (Mapuche), “chilean maqui”, “queldron”, “clon” es una especie nativa chilena que produce pequeñas bayas que son recolectadas en forma silvestre. Sus distintas etapas de maduración y flores se aprecian en la figura 1. El maqui ha sido reconocido por sus múltiples beneficios que son atribuidos a su alto contenido de polifenoles, así como también a su amplia variedad de antocianinas y flavonoides (Fredes, et al. 2012).



Figura 1. Las imágenes superiores (a, b y c) corresponden a los distintos estados de maduración del fruto. Las imágenes inferiores (d, e y f) muestran las flores de *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz. Fuente: (Benedetti, 2012).

### **2.1.2. Distribución geográfica**

El maqui es una especie endémica de los bosques subantárticos de Chile que crece desde la provincia de Limarí en la IV región de Coquimbo (29°54'28"S 71°15'15"O) hasta la provincia de Aysén en la XI región Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo (45°34'12"S 72°03'58"O), tanto en el valle central como en ambas cordilleras, pudiendo alcanzar altitudes de los 2500 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) (Rodríguez, et al. 1983), también es común encontrarlo en los parques nacionales Lanín, Nahuel Huapi y Los Alerces en la patagonia Argentina. Se desarrolla preferentemente en quebradas, faldeos de cerros o márgenes de bosques. Además es común encontrarlo en la isla Juan Fernández, formando extensos matorrales en los valles y penetrando el bosque. Crece en lugares húmedos, coloniza con facilidad terrenos que han perdido su cubierta vegetal, transformándose en una especie pionera de suelos recién quemados o explotados. La comunidad que forma se denominan "macales", que cumplen la función de proteger terrenos de agentes erosivos (Benedetti, 2012).

### **2.1.3. Cultivo y Hábitat**

#### **2.1.3.1. Suelo**

El maqui crece en terrenos alterados, en general con buena exposición a la luz, tolera diferentes tipos de suelo y necesita riego mediano. El maqui se desarrolla como especie secundaria, preferentemente en suelos húmedos, quebradas, faldas de los cerros o márgenes de bosques. Al preferir suelos con especificaciones bien definidas, su crecimiento lo restringe a solo algunos lugares de la región. En la cordillera de la costa se desarrolla sobre suelos graníticos sin grandes restricciones de humedad y profundidad, desde los 300 hasta los 1.100 m.s.n.m. En la cordillera de los Andes se desarrolla con mayor frecuencia en trumaos (suelo derivado de cenizas volcánicas, de textura gruesa, fuerte estratificación y baja fertilidad) y otros sectores con humedad suficiente y aportes de material orgánico.

Si bien abunda en suelos húmedos, también se ha observado en suelos degradados y secos (Donoso, 2006).

#### **2.1.3.2. Clima**

Hacia el norte de Chile aparece en la zona de clima mediterráneo, asociado principalmente a lugares húmedos como quebradas, laderas sombrías, zonas expuestas a niebla y riberas de ríos. Hacia el sur dentro del clima templado, la dependencia de los cursos de agua, quebradas y otras zonas húmedas, se hace menos preponderante pudiendo crecer en un sinnúmero de sitios, prosperando típicamente en los bordes de bosques, lechos de ríos y arroyos, praderas y otros lugares con baja cobertura de dosel (Alonso, 2012).

Por otro lado, el mayor inconveniente que presenta el maqui corresponde a la dificultad de domesticación del cultivo. Además, su recolección no es sustentable, ya que para alcanzar los volúmenes necesarios de maqui se corta la rama completa que contiene la carga frutal y dicha rama demora tres años, en promedio, en volver a crecer y dar frutos (Araya, 2012).

Al ser una especie silvestre presenta mucha variabilidad entre plantas, poblaciones y años, y debido a que es un fruto que se procesa, la industria requiere que sea lo más homogéneo posible, que su producción sea sustentable en el tiempo y que la materia prima presente determinadas características (Vogel, 2012).

#### **2.1.4. Descripción Botánica**

Es un arbusto perenne de cuatro a cinco metros de altura, de tronco dividido en ramas delgadas y flexibles, cuya corteza es lisa y clara, blanda y desprendible fácilmente en tiras (Alonso, 2012). Se comporta como tropófito facultativo aportando materia orgánica al suelo (Ramírez, et al. 1983).

El maqui es una especie dioica, con flores femeninas y masculinas en plantas distintas. Las flores unisexuales forman umbelas de dos a tres unidades que nacen de las axilas de las hojas donde cada flor está provista de cinco sépalos lanceolados, algo pilosos, encontrándose en forma alterna a éstas los pétalos amarillentos, que son más largos que los sépalos y de forma ovalada (Hoffmann, 1997). Estas flores son de color amarillo claro (figura 1e), de 5 – 6 mm de diámetro y 1 – 1,5 mm de ancho, con 5 a 6 pétalos libres, transovados, de 3 a 4 mm de largo (Benedetti, 2012). Sus frutos son bayas pequeñas de 4 a 5 mm, de color negro brillante o azuladas (figura 1c) y contienen de dos a cuatro semillas por fruto. Pertenece a la familia de las *Elaeocarpaceas*, la cual está formada por diez géneros y alrededor de cuatrocientas especies, distribuidas en las regiones tropicales y templadas del mundo (salvo el continente africano) (Alonso, 2012).

### 2.1.5. Taxonomía

La clasificación de *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz se presenta tabla 1.

Tabla 1. Taxonomía del fruto *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz.

	Descripción
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Oxalidales</i>
Familia	<i>Elaeocarpaceae</i>
Género	<i>Aristotelia</i>
Especie	<i>chilensis</i>
Nombre Científico	<i>Aristotelia chilensis</i> (Molina) Stuntz.

Fuente: (Hoffmann, 1997).

### 2.1.6. Composición química

En la tabla 2 se expone la composición química del maqui en base húmeda, de la cual existen muy pocos datos recientes. De ella se destaca su bajo contenido graso y su importante aporte en materias no nitrogenadas (se incluyen carbohidratos y fibra soluble).

Tabla 2. Composición química del fruto *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz.

g/100 g parte comestible	
Energía (kcal)	150
Humedad	56,4
Proteínas (g)	0,8
Grasa Total (g)	tr.
E.N.N. (por dif.)	40,8
Fibra Cruda	0,8
Cenizas	1,2
mg/100 g parte comestible	
Calcio	87
Fósforo	44
Hierro	30,5
Potasio	296

Fuente: (Schmidt-Hebbel, et al. 1992)

### 2.1.7. Propiedades y usos

La parte utilizada corresponde al fruto y las hojas. Es una planta que ha sido empleada ampliamente por el pueblo mapuche, ya sea en el ámbito medicinal como ingrediente principal para elaborar la chicha de maqui o bien, darle tinte al vino utilizando el jugo del fruto (Muñoz, et al. 2004). Los principios activos del maqui (alcaloides y taninos) le confieren propiedades antiinflamatorias, antiespasmódicas, astringentes y analgésicas. En medicina popular se utiliza la

infusión de hojas secas para curar heridas, y esta misma preparación a partir de las hojas frescas para aliviar el estado febril, diarreas, disenterías, calmar dolencias en la faringe e inflamación de amígdalas y aliviar úlceras bucales; también se puede utilizar el jugo fresco de las hojas ya sea consumiéndolo o en forma tópica (Muñoz, et al. 2004).

Por otro lado, en artesanía se emplea su madera, que es frágil y sonora, en la fabricación de instrumentos musicales. La corteza sacada en tiras se utiliza como sogá (Hoffmann, 1997).

### **2.1.8. Polifenoles y su actividad antioxidante**

Siendo parte de los compuestos bioactivos que contiene el maqui, los polifenoles son compuestos biosintetizados por las plantas (sus frutos, hojas, tallos, raíces u otras partes). Todos los polifenoles exhiben propiedades antioxidantes. Desde el punto de vista químico, todos los polifenoles presentan en su estructura, a lo menos, uno o más grupos hidroxilos (-OH) unidos a un anillo aromático. A su vez, existen dos categorías en las cuales están distribuidos los polifenoles:

- a. Flavonoides: Dentro de esta categoría existen seis subtipos de flavonoides. Ellos son: Antocianidinas, flavanoles, flavanonas, flavonoles, flavonas e isoflavonas.
- b. No flavonoides: Mayormente comprenden alcoholes monofenólicos y ácidos fenólicos.

La capacidad de los polifenoles para actuar como antioxidantes, tanto la de los flavonoides como de aquellos no flavonoides, depende principalmente de la presencia de hidroxilos en su estructura, ya que éstos le confieren la habilidad para donar un átomo de hidrógeno o como donante de un electrón a un radical libre (o a otras especies reactivas). Particularmente en el caso de los flavonoides, algunos pueden actuar como antioxidantes a través de su habilidad para quelar ciertos metales de transición (cobre y hierro), lo cual evita la formación de



radicales libres hidroxilo (a partir de peróxido de hidrógeno en la reacción de Fenton) y de superóxido (a partir de oxígeno molecular).

Por otro lado, cabe destacar que la literatura científica que implica a los polifenoles como factores de protección de la salud comprende mayormente a los polifenoles de tipo flavonoideo (Speisky, 2015).

### **2.1.9. Compuestos bioactivos de *Aristotelia chilensis*: Evidencia científica**

Entre todos los compuestos bioactivos que posee el maqui, destacan las antocianinas; glucósidos solubles en agua de antocianidinas que son parte de los compuestos fenólicos conocidos como flavonoides (Strack and Wray, 1989). Escribano-Bailón, et al. (2006) reporta que su composición es particularmente rica en antocianinas (donde un 34 % correspondería a delfinidina-3-sambubiosido-5-glucosido). El interés en las antocianinas recae en su potencial beneficioso a la salud humana, habiéndose reportado que durante el paso desde el tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas (Miyazawa, et al. 1999) y ejercen efectos terapéuticos relacionados con su actividad antioxidante. Se ha demostrado que las antocianinas son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno llamadas radicales libres, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas (Guiselli, et al. 1998).

Se ha demostrado ampliamente que el maqui es rico en compuestos fenólicos (Miranda - Rottmann, et al. 2002, Fredes, et al. 2012, Gironés-Vilaplana, et al. 2014) con una alta capacidad antioxidante en comparación con otros berries también de alto poder antioxidante, como es el açai de Brasil o el arándano nativo chileno. Más aún, el maqui posee tres y nueve veces la cantidad de antocianinas que tienen el açai y el arándano, respectivamente (tabla 3), así como también posee los valores más altos en cuanto al contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante ORAC en comparación a las dos frutas mencionadas anteriormente (tabla 3).

Tabla 3. Comparación del contenido total de antocianinas, capacidad antioxidante (ORAC) y contenido de polifenoles totales en maqui, açai y arándano.

Fruto	Contenido total antocianinas (mg/100 g p.s.)	Capacidad antioxidante <sup>1</sup> (ORAC, $\mu\text{mol ET/g p.s.}$ )	Polifenoles totales <sup>2</sup> (mg EAG/100 g p.s.)
maqui ( <i>Aristotelia chilensis</i> )	<b>984,12±7,32</b> (Gironés-Vilaplana, et al. 2014)	<b>299±0,98</b> (Gironés-Vilaplana, et al. 2014)	<b>1420±10,00</b> (Fredes, et al. 2014)
açai ( <i>Euterpe oleracea</i> )	347,81±35,86 (Gironés-Vilaplana, et al. 2014)	283±3,88 (Gironés-Vilaplana, et al. 2014)	312±2,60 (Kang, et al. 2012)
arándano bluegold ( <i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	101,88±2,36 (Bunea, et al. 2013)	55,7±2,94 (You, et al. 2011)	274,48±15,83 (Rodrigues, et al. 2011)

<sup>1</sup>Resultado expresado como  $\mu\text{mol}$  de equivalentes Trolox en un gramo de peso seco.

<sup>2</sup>Resultado expresado como mg de equivalentes Ácido gálico en cien gramos de peso seco.

Existen investigaciones que avalan el gran potencial de los compuestos bioactivos del maqui. Un estudio *in vitro* (Miranda - Rottmann, et al. 2002) reporta que la capacidad de los polifenoles de extractos de maqui protegen contra la oxidación de la LDL (Lipoproteína de baja densidad) y contra el daño oxidativo a células del endotelio vascular, sugiriendo con ello un potencial anti-aterogénico de los polifenoles del fruto. Otro estudio *in vivo* demuestra el efecto cardioprotector de extractos de maqui contra la isquemia aguda en corazones de ratas. El extracto de maqui protegió los corazones del daño ocasionado por arritmias por reperfusión y por no recuperación del ritmo sinusal (Céspedes, et al. 2008). Más aún, existe evidencia *in vitro* que sugiere una actividad antiinflamatoria e inhibitoria de la adipogénesis de los polifenoles del maqui (Schreckinger, et al. 2010). Se ha investigado que extractos crudos de maqui serían capaces de inhibir la actividad de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa, responsables de la degradación de carbohidratos en glucosa. Tal actividad podría suponer un potencial de algunos de los polifenoles del maqui para “modular” la glicemia postprandial (Rubilar, et al. 2011). Recientemente, en un estudio *in vivo* se reportó que el extracto de maqui puede ser utilizado como una intervención preventiva contra el síndrome del ojo

seco estimulando la hidratación ocular modulando la capacidad de secreción de lágrimas en la glándula lacrimal gracias a un tipo de antocianina encontrada en la baya de maqui (Nakamura, et al. 2014).

Por otro lado, se ha reportado que el estado de madurez del fruto al momento de la cosecha interfiere en el contenido de compuestos bioactivos como polifenoles y flavonoides (Fredes, et al. 2012). Cuando el fruto alcanza entre 18 y 19 °Brix, presenta el mayor contenido de antocianinas y mayor capacidad antioxidante. Por otro lado, se han estudiado diferentes genotipos del fruto descubriendo que existen tres tipos de genotipos que se distinguen por su particular alto contenido de antocianinas, los cuales además poseen la más alta capacidad antioxidante (Fredes, et al. 2013). Esto implica que al poseer una amplia variabilidad genética es posible encontrar también una amplia variabilidad en resultados obtenidos de los mismos métodos de ensayo.

#### **2.1.10. Polifenoles y flavonoides con actividad antimicrobiana**

Como se menciona anteriormente, los flavonoides son compuestos orgánicos heterocíclicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se encuentran en frutas, vegetales, nueces, semillas, tallos, flores, vino y miel, entre otros (Havsteen, 2002). Su función no sólo consiste en proporcionar colores atractivos para los polinizadores (Middleton, et al. 2000; Harborne and Williams, 2000), sino que también están implicados en la fotosensibilización, transferencia de energía, en procesos asociados al crecimiento y regulación hormonal, control de la respiración y fotosíntesis, morfogénesis y la determinación sexual de la planta (Middleton, et al. 2000; Harborne and Baxter, 1999). En las hojas, se cree que éstos compuestos promueven la supervivencia fisiológica de la planta, protegiéndola – por ejemplo – de patógenos fúngicos o de la radiación UV-B (Harborne and Baxter, 1999; Harborne and Williams, 2000). En particular, la acción antimicrobiana de los flavonoides sería explicada por más de un mecanismo de acción y así mismo se detallan más de un método de ensayo como

por ejemplo, el análisis de concentración mínima inhibitoria (MIC) o el método del tiempo de muerte. El mecanismo de acción de los flavonoides ha sido identificado como bacteriostático o bactericida (Cushnie and Lamb, 2011). En el primer caso, el mecanismo de acción supone la agregación bacteriana, sin embargo aún no está claro si se debería a una agregación genuina (células que se aglutinarían) o a bacterias pseudo multicelulares, las cuales no se lograrían reproducir a través de la fisión binaria (Stapleton, et al. 2004). El segundo mecanismo de acción propuesto está dado por el efecto bactericida, el cual se define generalmente como la actividad que resulta en una reducción del 99,9 % en el número de bacterias (Cushnie and Lamb, 2011).

Por otro lado, se han investigado diversos compuestos fenólicos que también tendrían actividad antimicrobiana. Se ha establecido que dañan las paredes celulares ocasionando el desprendimiento de los materiales celulares y por consiguiente, la muerte del microorganismo (Abdel Ghani, et al. 2008). Los polifenoles pueden atravesar la pared celular de ciertas bacterias e interactuar no sólo con los organelos intracelulares, sino que también con la superficie celular (Kaur and Singh, 2008).

## **2.2. Liofilización**

La deshidratación es una excelente alternativa de conservación con el fin de aumentar la vida útil de un alimento, hacer más fácil su comercialización, transporte y uso. Entre las técnicas de deshidratación disponibles, la liofilización se ha vuelto objeto de interés debido a la calidad de los productos obtenidos a partir de ella, proporcionando productos secos de estructura porosa conservando la microestructura del mismo, lo cual se pondera en contra de su alto costo de tratamiento (Krokida and Maroulis, 2000). El estado sólido del agua durante el proceso de liofilización protege la estructura primaria y minimiza los cambios en la estructura del alimento como el encogimiento excesivo (Marques, et al. 2006, Ratti, 2001).

El proceso de liofilización involucra tres etapas:

1. Congelación: En dicha etapa se acondiciona el producto a liofilizar, de manera tal que éste posea una estructura sólida sin intersticios en los que haya líquido, para así propiciar que todo el secado ocurra por sublimación y que el producto final sea lo más uniforme posible. Los parámetros de presión y temperatura deben ser cercanos a los  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $760\text{ mmHg}$  (presión atmosférica), respectivamente.
2. Secado primario por sublimación: El secado primario se realiza una vez que se alcancen presiones de vacío ( $0,1\text{ mmHg}$ ) y la temperatura descienda hasta los  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En esta etapa se retira la mayor cantidad de agua del alimento, ocurriendo transferencia de masa y de calor. La transferencia de masa tiene relación con la transformación del hielo en vapor mediante la sublimación del contenido acuoso del producto. Por otro lado, la transferencia de calor se realiza mediante convección y conducción en menor medida desde el equipo al producto. La sublimación ocurre debido al desequilibrio entre presiones. La presión parcial de vapor que rodea al producto debe ser menor a la presión de vapor del hielo del producto, a la misma temperatura. El liofilizador provee bajas presiones, las cuales son indispensables para lograr que el agua se evapore a los  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
3. Secado secundario por desorción: El objetivo de dicha fase es reducir el contenido de humedad residual en el producto tanto como sea necesario para asegurar que el producto pueda ser almacenable a temperatura ambiente. El agua que debe eliminarse es aquella denominada como “agua ligada”, la cual requiere de presiones más bajas ( $0,5\text{ mmHg}$ ) y de un aumento de temperatura ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), ya que el esfuerzo por parte del equipo en esta etapa es mayor debido a la naturaleza de aquella agua (Oliva, 2010).

Las bajas temperaturas empleadas en el proceso eliminan el shock térmico contribuyendo a preservar componentes nutricionales como vitaminas y minerales, retención sabor y aroma original (Marques, et al. 2006), evitando la degradación de compuestos sensibles a altas temperaturas, además, la alta velocidad del

proceso apoya la inactivación enzimática logrando una rápida inhibición de la oxidación enzimática (Abascal, et al. 2005, George, et al. 2011).

Por otro lado, la preservación del contenido de compuestos bioactivos en productos liofilizados es altamente variable. En un estudio acerca de distintos métodos de secado en grosella negra (*Ribes nigrum*) se descubrió que el proceso de liofilización aumentó el contenido de compuestos fenólicos, lo cual fue atribuido a la alta porosidad de la muestra y a la eficiencia de la extracción de dichos compuestos desde el tejido del vegetal (Wu, et al. 2010). El mismo resultado fue conseguido en otra investigación en uvas muscadinas donde fueron comparados tres métodos de secado, de los cuales la liofilización fue el único proceso que logró aumentar el contenido de polifenoles totales (Vashisth, et al. 2011). Sin embargo hay estudios que por el contrario, reportan que no existen cambios en el contenido de compuestos bioactivos. Tal caso corresponde al reportado por (Wojdyło, et al. 2009), donde el contenido de polifenoles en muestras frescas y liofilizadas de frutillas (*Fragaria ananassa*) no varió. Un fenómeno similar ocurrió en el estudio de (Materska, 2014) al comparar el contenido polifenólico y actividad antioxidante en pimientos semi-picantes (*Capsicum annum*, L.), donde la muestra fresca registró una actividad antioxidante mayor que en el fruto liofilizado, el mismo comportamiento se obtuvo en la cuantificación de polifenoles totales.

### **2.3. Generalidades de las películas comestibles**

El desarrollo de recubrimientos comestibles elaborados a partir de polímeros biodegradables ha surgido como una tecnología emergente para mejorar la seguridad alimentaria gracias a sus múltiples beneficios y así, aumentar la vida útil de algunos alimentos, como frutas y alimentos cárnicos, entre otros. Varios biopolímeros como proteínas, polisacáridos y lípidos, así como sus formas combinadas se han utilizado para desarrollar recubrimientos y películas comestibles (Muñoz, et al. 2012). Las películas comestibles promueven la extensión en la vida útil del producto mejorando las características organolépticas

del producto que se ofrecerá. Es sabido que los films comestibles otorgan un efecto protector en frutas y hortalizas evitando su deshidratación, reduciendo la respiración, aumentando la calidad estructural, ayudando a preservar los compuestos volátiles y reduciendo el deterioro microbiano (Giosafatto, et al. 2014).

Para elaborar películas comestibles existen dos procesos principales: Uno de ellos es el “proceso seco”, que se fundamenta en la conducta termoplástica que algunas proteínas y polisacáridos muestran a bajos niveles de humedad por compresión y extrusión. En el método de moldeo por compresión, luego de formada la masa de los componentes de la película, se aplica una presión y temperatura determinadas durante un tiempo establecido, para lograr así la formación de la película. Otro método más utilizado llamado “proceso húmedo”, que involucra la dispersión o solubilización de los biopolímeros en una solución para la formación de la película, seguida por la evaporación del solvente. Un ejemplo es el método *casting*, en el cual luego de formada la solución de los componentes de la película, se realiza la evaporación del solvente a temperatura y humedad controladas, formándose así las películas (Escobar, et al. 2009).

Para que una película o film comestible se considere tal, debe recubrir el alimento en forma de capa fina y continua de material comestible, dispuesta sobre la superficie del mismo. Las características de las materias primas para elaborar una película están afectadas por diversos parámetros como la formulación, las características del solvente, aditivos y la tecnología empleada en la elaboración (Ruiz-Navajas, 2014). Como se menciona anteriormente, las películas pueden formarse con diversas materias primas como carbohidratos (almidones, extractos de algas, pectinas, gomas o quitosano), las cuales crean matrices estables. El quitosano presenta propiedades formadoras de películas, además de mostrar ciertas propiedades antioxidantes y antimicrobianas por sí mismo (Sayas-Barberá, et al. 2011). A continuación se detallará algunos aspectos relevantes en cuanto a dicho polisacárido “quitosano”:

### 2.3.1. Quitosano

El quitosano, poli- $\beta$ -(1,4)-D-glucosamina-N-acetil-D-glucosamina (figura 2a), es un polisacárido obtenido de la desacetilación de la quitina, poli- $\beta$ -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina, (figura 2b), el segundo polisacárido natural más abundante, después de la celulosa. La quitina es el mayor constituyente del exoesqueleto de los crustáceos (Zivanovic, et al. 2005), sin embargo para uso industrial, la quitina no es compatible ya que es insoluble en agua y solventes orgánicos (Rinaudo, 2006).

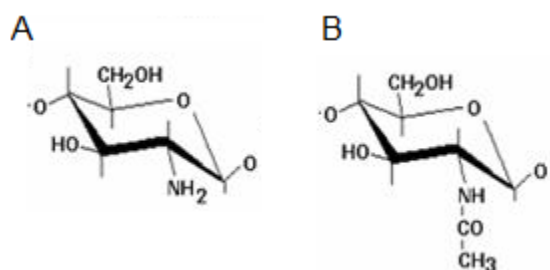


Figura 2. Estructuras químicas de un monómero de quitosano (a) y quitina (b). Fuente: (Ruiz-Navajas, 2014).

Por otro lado, el quitosano como material para la elaboración de matrices es objeto de un creciente interés tecnológico debido a algunas de sus propiedades fisicoquímicas, como su mayor solubilidad en agua respecto de la quitina y su biodegradabilidad. Posee aplicaciones en múltiples ámbitos. En la industria cosmética es utilizado en tratamientos contra el acné, en biomedicina tiene diversas aplicaciones como por ejemplo en suturas quirúrgicas, reconstrucciones óseas e implantes dentales. En la industria alimentaria, al ser considerado como un material biológico amigable con el medioambiente, el quitosano posee un gran potencial para ser usado como un recurso alternativo en el envasado activo de alimentos, ya que posee intrínsecamente propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Ruiz-Navajas, 2014).



### **2.3.2. Films de quitosano**

El quitosano posee ventajas por sobre otros polímeros basados en biomoléculas usadas como materiales de envase debido a su comportamiento antibacterial y capacidad quelante de minerales bivalentes (Abdollahi, et al. 2012, Aider, 2010). Es por ello que el quitosano se ha utilizado ampliamente como un recubrimiento antimicrobial debido a la efectividad en la inhibición no sólo contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, sino también contra hongos y levaduras. Dicha propiedad antimicrobiana se debe principalmente a su carga positiva, la cual interfiere con los residuos cargados negativamente de las macromoléculas en la superficie celular microbiana, causando el desprendimiento de la membrana (Siripatrawan, et al., 2010).

Generalmente las concentraciones más utilizadas de quitosano para elaborar films están en un rango entre 1 – 3 % en soluciones acuosas acidificadas de ácido acético o ácido láctico. Junto a ellos, además se debe añadir un agente plastificante como es el glicerol (aprox. 0,5 mL de glicerol por cada gramo de quitosano utilizado) (Ruiz-Navajas, 2014).

#### **2.3.2.1. Propiedades antimicrobianas y antioxidantes en films de quitosano con incorporación de extractos**

Los films de quitosano con incorporación de distintos extractos exhiben determinadas propiedades de barrera (humedad, aromas, lípidos, luz) gracias a la interacción entre el material del film y el extracto, y también logran excelentes propiedades antioxidantes y/o microbianas ocasionadas por la presencia de los mismos, lo cual es una buena alternativa para lograr el aumento de la vida útil y mantener la calidad organoléptica del producto (Wu, et al. 2013). Dicha actividad antioxidante del film podría estar relacionada con los compuestos fenólicos provenientes del extracto añadido, y a su vez dichos compuestos están estrechamente relacionados con las propiedades antioxidantes siguiendo distintos

mecanismos, como el atrapamiento de radicales libres, la donación de átomos de hidrógeno y/o quelación de metales de transición.

Al agregar extractos naturales (aceites esenciales, extracto de aceite de semilla de uva extracto de té verde, entre otros) con propiedades antioxidantes en films no solo logran que éstos aumenten su actividad antioxidante y contenido de polifenoles totales (Li, et al. 2014), sino que además una película con adición de extractos puede ser una importante barrera contra la contaminación microbiológica y química en la industria alimentaria. En este sentido, se han estudiado las propiedades antimicrobianas en films de quitosano adicionados con aceites esenciales frente a microorganismos relativos al deterioro de los alimentos. En el estudio de Zivanovic, et al. (2005) fueron evaluados *in vitro*, films enriquecidos con aceites esenciales de anís, albahaca, cilantro y orégano, contra patógenos como *L. monocytogenes* y *E. Coli* O157:H7. Los resultados mostraron que los films con orégano fueron los más activos, sin embargo aquellos con cilantro y anís también mostraban actividad antimicrobiana. Otro estudio (Ruiz-Navajas, et al. 2013) que utilizó aceites esenciales de hierbas *Thymus moroderi* y *Thymus piperella*, demostraron poseer actividad antimicrobiana contra distintas cepas relacionadas al deterioro de los alimentos como *Serratia marcescens* y *Listeria innocua*, entre otras y además actividad antioxidante. Más aún, se han incorporado extractos naturales como Té verde, semillas de uvas y hojas de ginkgo (Li, et al. 2014) a films comestibles, siendo la adición del extracto de hojas de ginkgo la que obtuvo la mayor cuantificación de actividad antioxidante por DPPH, aunque los films adicionados con los otros extractos también registraron una alta capacidad antioxidante.

### **3. HIPÓTESIS**

Los compuestos fenólicos obtenidos de maqui poseen un comprobado efecto antioxidante, proporcionando dicho efecto en situaciones de estrés oxidativo. Mediante el proceso de liofilización se obtendrá un producto que conserve dichos compuestos bioactivos, siendo viable de ser usado como ingrediente funcional en una matriz alimentaria elaborada con quitosano de manera que éstas aumenten su capacidad antioxidante.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar el potencial tecnológico de componentes antioxidantes obtenidos del fruto liofilizado nativo chileno *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz y su aplicación a una matriz alimentaria tipo película comestible de quitosano.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Realizar la liofilización del maqui para ser caracterizado e incorporado a una matriz alimentaria tipo película comestible.
- Caracterizar el polvo liofilizado a través de composición química, capacidad antioxidante, polifenoles totales y flavonoides totales.
- Determinar la actividad antimicrobiana del polvo liofilizado frente a microorganismos relativos a la degradación de alimentos.
- Elaborar una matriz alimentaria tipo película comestible con incorporación de liofilizado de maqui.
- Caracterizar las películas a través de análisis de capacidad antioxidante, polifenoles totales y flavonoides totales.
- Determinar la actividad antimicrobiana de las películas contra microorganismos relacionados al deterioro de los alimentos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Lugar de trabajo

La liofilización del fruto y los análisis preliminares de la elaboración de los films fueron realizados en el laboratorio de Biomateriales del Departamento de Ingeniería Química y Bioprocesos de la Escuela de Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

La composición química de la materia prima utilizada fue realizada en el laboratorio de Química de los Alimentos del Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

Los análisis químicos (capacidad antioxidante, polifenoles totales, flavonoides totales) y microbiológicos tanto al liofilizado de maqui como a las películas elaboradas se realizaron en el laboratorio de Industrialización de Productos de Origen Animal (IPOA) del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela en la Universidad Miguel Hernández. Alicante, España.

### 5.2. Materia Prima

Para llevar a cabo el presente proyecto, la empresa Geco Group facilitó la materia prima (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) en estado fresco y en congelación, proveniente de la ciudad de Cañete, en la provincia de Arauco en la VIII Región del Bío – Bío de Chile. Las muestras continuaron congeladas y almacenadas a -22 °C hasta los análisis posteriores.

### **5.3. Metodología de análisis liofilizado de maqui**

#### **5.3.1. Obtención del liofilizado**

El maqui fresco fue triturado aun estando congelado en batidora de inmersión Black and Decker SB400; luego con la ayuda de un mortero se realizó una segunda molienda suave. El fruto molido fue liofilizado en un Liofilizador (Labconco, 4.5, Kansas, Estados Unidos) a -10 °C a presión de vacío de 100 MT durante 72 h. El producto obtenido fue nuevamente triturado en mortero y finalmente tamizado para retirar las semillas.

##### **5.3.1.1. Obtención de extracto de liofilizado de maqui**

El procedimiento se realizó acorde a la metodología de Chaves López, et al. (2015) con modificaciones. Se extrajo 1 g de muestra con 5 mL de solución metanol/agua (80:20). La mezcla fue homogeneizada utilizando un homogenizador rotor-estator (Ultraturrax IKA, T25D, Staufen, Alemania) a 12.000 rpm durante 1 min, luego se centrifugó a 5.000 rpm por 10 min. A continuación, se filtró con la ayuda de un filtro Millipore de 0,45 µm (Millipore Corporation, Bedford, EUA). Finalmente se diluyó con agua destilada dicho extracto en una proporción de 1:10.

#### **5.3.2. Capacidad antioxidante**

##### **5.3.2.1. Análisis de antioxidantes por DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl free radical scavenging)**

Este ensayo se realizó siguiendo un método previamente establecido (Brand-Williams, et al. 1995). Se colocaron en tubos de ensayo 200 µL de cada muestra y se adicionaron 2 mL de la solución metanólica de DPPH (Sigma – Aldrich Chemical, Co., Steinheim, Alemania), se agitó durante 1 min en un agitador tipo vórtex (2500 rpm) y se reservaron en oscuridad por 15 min. Luego se midió la

absorbancia en un espectrofotómetro (Hewlett Packard HP 8451, Cambridge, Reino Unido) a 517 nm. Los resultados fueron expresados como miligramos de equivalentes trolox por gramo de muestra (mg ET/g) como promedio de tres repeticiones.

#### **5.3.2.2. Análisis de antioxidantes por FRAP (Ferric reducing antioxidant power)**

Siguiendo el método de cloruro hierro-ferricianuro potásico (Oyaizu, 1986), a 1 mL de muestra se le adicionó 2,5 mL de tampón fosfato (0,2 M, pH 6,6) y 2,5 mL de ferricianuro potásico al 1 % (Panreac Química, Barcelona, España). Se agitó durante 1 min y se incubó a 50 °C durante 20 min. Una vez transcurrido este tiempo se añadió 2,5 mL de ácido tricloroacético al 10 % (Panreac Química, Barcelona, España) y se agitó durante 2 min. Se tomó una alícuota de 2,5 mL de dicha muestra y se mezcló con 2,5 mL de agua destilada y 0,5 mL de cloruro de hierro hexahidratado al 0,1 % (Panreac Química, Barcelona, España). Una vez que se volvió a agitar la mezcla por 2 min, se dejó reposar durante 10 min adicionales y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Hewlett Packard HP 8451, Cambridge, Reino Unido) a 700 nm. Los resultados fueron expresados como mg ET/g como promedio de tres repeticiones.

#### **5.3.2.3. Análisis de antioxidantes por FIC (Ferrous ion chelating)**

Según un método anteriormente descrito (Carter, 1971), a 1 mL de cada muestra se les agregó 0,1 mL de sulfato de hierro tetrahidratado 2mM (Panreac Química, Barcelona, España) y 3,7 mL de metanol. Se agitó durante 1 min en un agitador tipo vórtex y se dejaron reposar durante 5 min. A continuación, se añadió 200 µL de ferrozina 5mM (Panreac Química, Barcelona, España) y se volvió a agitar durante 2 min. Luego de dejar las muestras en reposo por 10 min, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Hewlett Packard HP 8451, Cambridge,

Reino Unido) a 562 nm. Los resultados fueron expresados como  $\mu\text{g}$  EDTA/g de muestra como promedio de tres repeticiones.

### **5.3.3. Contenido de polifenoles totales**

Para realizar dicho método se siguió el método Folin – Ciocalteu (Singleton, et al. 1999). Se colocaron 300  $\mu\text{L}$  de cada muestra y 2,5 mL de solución de Folin – Ciocalteu diluida 1:10, v/v (Sigma – Aldrich Chemical Co., Steinheim, Alemania). Se agitó durante 1 min en un agitador tipo vórtex. Luego se adicionó 2 mL de carbonato de sodio 7,5 % v/v (Panreac Química, Barcelona, España) y se volvió a agitar por un minuto. Las muestras se incubaron durante 5 min a 50 °C y luego se enfriaron a temperatura ambiente durante 5 min y finalmente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Hewlett Packard HP 8451, Cambridge, Reino Unido) a 760 nm. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g) como promedio de tres repeticiones.

### **5.3.4. Contenido de flavonoides totales**

El presente ensayo se basó en un estudio anterior (Blasa, et al. 2006). A 1 mL de muestra se adicionó 0,3 mL de solución de nitrito de sodio al 5 % (Panreac Química, Barcelona, España), se agitó 1 minuto en un agitador tipo vórtex. Se esperaron 5 min para luego adicionar 0,3 mL de cloruro de aluminio al 10 % (Panreac Química, Barcelona, España) y se agitó nuevamente, por 1 min. Luego de 6 min, se neutralizó con 2 mL de hidróxido de sodio 1 N (Panreac Química, Barcelona, España), finalmente luego de 5 min, se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Hewlett Packard HP 8451, Cambridge, Reino Unido) a 510 nm. Los resultados fueron expresados como miligramos de equivalentes rutina por gramo de muestra (mg ER/g) como promedio de tres repeticiones.



### **5.3.5. Actividad antimicrobiana**

#### **5.3.5.1. Extracción de la muestra de liofilizado de maqui**

La extracción de la muestra de maqui se realizó acorde a un protocolo anterior (Chaves López, et al. 2015) con modificaciones, 1 g de liofilizado de maqui se mezcló con 5 mL de metanol/agua (80:20) con la ayuda de un homogenizador rotor-estator (Ultraturrax IKA, T25D, Staufen, Alemania) a 12.000 rpm durante 1 min, luego se centrifugó a 5.000 rpm por 10 min. El sobrenadante se reservó y el residuo fue tratado con 5 mL de solución acetona/agua (70:30) y nuevamente se mezcló utilizando un homogenizador rotor-estator seguido de una centrifugación a 5.000 rpm por 10 min y se desechó el último residuo obtenido. Ambos sobrenadantes se unieron y se secaron en un evaporador rotatorio (Rotavapor Büchi R-200, Flawil, Suiza). Luego se les agregó caldo Muller Hinton broth (MHB) (Scharlau S.L., España) para así obtener la solución madre de maqui liofilizado (MHB+M).

#### **5.3.5.2. Método de actividad antimicrobiana para liofilizado de maqui**

La actividad antimicrobiana fue evaluada acorde al método de microdilución en caldo colorimétrico (Abate, et al. 1998), con algunas modificaciones contra ocho cepas bacterianas. Las cepas *Serratia marcescens* CECT 854, *Aeromonas hydrophila* CECT 5734, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346 y *Achromobacter denitrificans* CECT 449 fueron incubadas a 26 °C durante 24 h, *Alcaligenes faecalis* CECT 145, *Enterobacter amnigenus* CECT 4078, *Enterobacter gergoviae* CECT 587 fueron incubadas a 37 °C durante 24 h en caldo Nutrient Broth No. 2 (NB No. 2) (Oxoid Ltd, Inglaterra) y *Listeria innocua* CECT 910 fue incubada a 37 °C por 24 h en caldo Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Scharlau S.L., España) y ajustada a una densidad final de  $10^6$  UFC/mL y usada como inóculo. Las microplacas de 96 pocillos (Iwaki brand, Asahi Techno Glass, Japón) fueron preparadas agregando 10 µL de inóculo a todos los pocillos. Al primer pocillo se

agregó 490  $\mu\text{L}$  de MHB+M y 10  $\mu\text{L}$  de inóculo, a los pocillos siguientes se les agregó distintas cantidades de MHB y MHB+M. El contenido de las microplacas fue mezclado en un agitador de platos a 150 rpm por 2 min antes de ser incubadas por 24 h a las temperaturas de 26 °C y 37 °C según fue el inóculo utilizado. Después de la incubación, 25  $\mu\text{L}$  de MTT ((3-4,5-dimetil tiazolilo-2)-2,5-difenil tetrazolium bromuro) (Sigma Life Science), disueltos en DMSO (dimetil sulfóxido) 0,8 mg/mL (Sigma Life Science) fue añadido a cada pocillo e incubado por 1 h para que así los microorganismos pudiesen metabolizar el MTT color amarillo y así, cambiasen el color de las muestras (rojas) a púrpura. El valor de concentración inhibitoria mínima (MIC) fue considerada como la concentración del primer pocillo que no cambió de color (desde rojo a púrpura). El procedimiento se repitió tres veces para cada microorganismo. Las cepas bacterianas fueron suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia.

### **5.3.6. Determinación del análisis proximal**

Los contenidos de humedad, materia grasa, fibra dietaria total y cenizas fueron determinados mediante métodos AOAC (AOAC, 1997). La humedad del liofilizado se determinó mediante la pérdida de peso después de deshidratar la muestra a 105°C por 24 h. La cuantificación de materia grasa (g materia grasa/100 g peso seco (p.s.)) fue calculada por la pérdida de peso después de realizar una extracción con Hexano (Heyn S.A., Santiago, Chile) en un extractor Soxhlet (Velp Scientifica SER 148, Italia). El contenido de fibra dietaria total (g FDT/100 g p.s.) fue obtenido siguiendo el método 991.43 (AOAC, 1997) mediante un extractor de fibra dietaria (Velp Scientifica CSF – 6, Italia). El contenido de cenizas (g cenizas/100 g p.s.) se determinó en una mufla de laboratorio a 550 °C por 5 h.

## **5.4. Metodología de análisis a los films**

### **5.4.1. Elaboración de films**

La elaboración de los films se realizó siguiendo una metodología anterior (Ojagh, et al. 2010) con modificaciones. Se disolvió 1 g de quitosano (de alto peso molecular) 75 % - 85 % deacetilado (Sigma – Aldrich Chemical Co., Steinheim, Alemania) por cada 100 mL de solución de ácido láctico al 1 % v/v (Sigma – Aldrich Chemical Co., Steinheim, Alemania) mediante agitación magnética a temperatura ambiente por 24h. Luego, se agregó glicerol en una concentración de 2,5 mL por gramo de quitosano (Panreac Química, Barcelona, España) y se volvió a agitar por 30 min adicionales a temperatura ambiente. Se elaboraron tres matrices distintas:

1. Control sin incorporación de liofilizado de maqui (q).
2. Con liofilizado de maqui al 0,5 % (q+maqui 0,5%).
3. Con liofilizado de maqui al 1 % (q+maqui 1%).

Se volvió a agitar por 30 min. Se utilizaron placas Petri de 9 cm de diámetro, a las cuales se les agregó 20 mL de soluciones formadoras de films y finalmente, se secaron a 37 °C por 48 h. Las muestras secas fueron almacenadas en un desecador a 25 °C y 51 % de humedad relativa antes de los ensayos. Para lograr dicha humedad se utilizó una solución saturada de nitrato de magnesio (Panreac Química, Barcelona, España).

### **5.4.2. Obtención de extractos de los films**

En la obtención de extractos de films se utilizó el protocolo de Ruiz-Navajas, et al. (2013) con modificaciones. Se pesó 1 g de cada film y se agregó 5 mL de metanol y se transfirió a un baño de ultrasonido (Selecta S.A., Barcelona, España) durante 60 min. Luego, se colocaron las muestras en un homogenizador rotor-estator (Ultraturrax IKA, T25D, Staufen, Alemania) a 12.000 rpm durante 1 min. Finalmente, los extractos fueron diluidos 1:5 en metanol.

### **5.4.3. Análisis químicos a los films**

Se realizaron análisis de antioxidantes para los extractos (obtenidos del punto 5.4.2.) de los tipos de films preparados (q, q+maqui 0,5% y q+maqui 1%) por los métodos DPPH, FRAP y FIC siguiendo la misma metodología descrita en los puntos 5.3.2.1., 5.3.2.2. y 5.3.2.3. respectivamente. Además, se midió polifenoles totales y flavonoides totales siguiendo las metodologías 5.3.3 y 5.3.4. ya descritas.

### **5.4.4. Actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana se evaluó acorde al método de difusión en disco de agar (Tepe, et al. 2005) con algunas modificaciones contra ocho cepas bacterianas. Las placas Petri se prepararon adicionando 20 mL de agar Nutrient Agar II (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) en el caso de *Serratia marcescens* CECT 854, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346, *Pseudomonas fluorescens*, *Achromobacter denitrificans* CECT 449 y *Aeromonas hydrophila* CECT 5734 y fueron incubadas a 26 °C durante 24 h. A las cepas *Alcaligenes faecalis* CECT 145 y *Citrobacter freundii* CECT 4626 se agregó 20 mL de agar Nutrient Agar I (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) a cada placa y se incubaron a 37 °C durante 24 h. En el caso de la cepa *Listeria innocua* CECT 910, se agregó 20 mL de agar Brain Heart Infusion (Sharlab, Barcelona, España) y se incubó a 37 °C por 24 h. Se cortaron cuadrados de 1cm<sup>2</sup> de cada film y se situaron al centro de cada placa de 9 cm de diámetro que contenían los distintos microorganismos y se incubaron por 24 h a 37°C y a 26°C.

#### **5.4.4.1. Análisis Estadísticos**

Se realizó análisis de varianza (ANOVA de una cola) para evaluar diferencias estadísticamente significativas de los resultados obtenidos mediante el programa Statgraphics Centurion Software XV ver. 15.1.02.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Resultados para el liofilizado de maqui

#### 6.1.1. Capacidad antioxidante

Se evaluó la capacidad antioxidante del liofilizado de maqui mediante tres métodos distintos (DPPH, FRAP y FIC). En la tabla 4 se exponen los resultados obtenidos.

Tabla 4: Capacidad antioxidante del liofilizado de maqui (Promedio  $\pm$  SD).

Muestra	DPPH (mg ET <sup>3</sup> /g p.s.)	FRAP (mg ET/g p.s.)	FIC ( $\mu$ g EDTA <sup>4</sup> /g p.s.)
Liofilizado de maqui	2,81 $\pm$ 0,04	25,2 $\pm$ 0,38	121,12 $\pm$ 1,88

<sup>3</sup> mg TE: miligramos de equivalentes Trolox por gramo de peso seco; <sup>4</sup>  $\mu$ g EDTA: microgramos equivalentes de EDTA por gramo de peso seco.

Mediante el método DPPH, el resultado obtenido (tabla 4) fue menor al descrito por Gironés-Vilaplana, et al. (2014) de 30,96 mg ET/g p.s. Esta diferencia es atribuible a distintas variables como la procedencia del fruto, clima, altitud, época del año en que fue recolectado e incluso al método mismo. En particular, la amplia variabilidad genética del fruto, que ha sido demostrada en un estudio anterior (Fredes, et al. 2013) podría ser un parámetro que explicaría las diferencias en los resultados. El mismo fenómeno ocurrió en el caso del análisis mediante FRAP, donde el resultado obtenido es menor al reportado por Gironés-Vilaplana, et al. (2014) de 50,49 mg ET/g p.s. En el último análisis de capacidad antioxidante mediante FIC, no se han reportado valores para el fruto fresco así como tampoco para el liofilizado de maqui. Sin embargo se compara el resultado del presente análisis de 121,12  $\mu$ g EDTA/g con aquel reportado por Chaves López, et al. (2015) de 4,29  $\mu$ g EDTA/g p.s. para el fruto Borojó (*Borojoa patinoi* Cuatrecasas) y

con el resultado obtenido por (Viuda-Martos, et al. 2011) de 42,87  $\mu\text{g}$  EDTA/g p.s. para el arilo y la cáscara de la granada (*Punica granatum* L.). El maqui fue capaz de quelar una mayor cantidad del ión  $\text{Fe}^{+2}$  y así inhibir la formación del complejo ferrozina- $\text{Fe}^{+2}$ , lo cual demuestra su alta capacidad antioxidante en comparación a las muestras referenciales.

Si bien los métodos anteriormente expuestos miden la capacidad antioxidante de una muestra, están basados en diferentes mecanismos. El análisis mediante DPPH determina la capacidad de inactivar un átomo de nitrógeno que posee un electrón desapareado del reactivo DPPH gracias a un antioxidante de la muestra que dona un hidrógeno capaz de unirse a aquél nitrógeno y transformarlo a su forma no radicalaria, lo cual se visualiza mediante la decoloración de la solución metanólica de DPPH. El análisis por FRAP evalúa el poder reductor de una muestra a pH bajo midiendo el cambio en la absorbancia al reducir ión férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) a ión ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) presente en el reactivo FRAP. Por último, el análisis mediante FIC mide cuán eficaz puede competir la muestra con el reactivo ferrozina por el ión ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) mediante la formación de un quelato estable de  $\text{Fe}^{+2}$ , para así reducir la concentración de aquellos iones ( $\text{Fe}^{+2}$ ) libres y con ello, y así disminuir la extensión de la reacción de Fenton.

### 6.1.2. Contenido de polifenoles totales

Tabla 5: Contenido de polifenoles totales (CPT) (Promedio  $\pm$  SD).

Muestra	CPT (mg EAG <sup>5</sup> /g p.s.)
Liofilizado de maqui	49,74 $\pm$ 0,57

<sup>5</sup> mg EAG: miligramos de equivalentes de Ácido gálico por gramo de peso seco.

El resultado obtenido para el contenido de polifenoles totales en el presente ensayo fue de 49,74 mg EAG/g como se expuso en la tabla 5. El cual se comparó con aquel reportado en un estudio anterior (Schreckinger, et al. 2010), también

sobre maqui liofilizado donde se obtuvo 53,3 mg EAG/g. Cabe destacar que en ambos ensayos se utilizó la misma técnica de deshidratación por liofilización obteniéndose resultados similares. En particular, los factores principales que afectan específicamente el contenido de polifenoles en frutas son la etapa de cosecha, conservación y procesamiento, medio ambiente y el genotipo (Vvedenskaya, et al. 2004; Kulkarni and Aradhya, 2005; Wang, et al. 2009). Por otro lado, se ha reportado en el estudio de Miranda-Rottmann, et al. (2002) que existe correlación entre el contenido de polifenoles totales con la actividad antioxidante de las muestras de maqui.

### 6.1.3. Contenido de flavonoides totales

Tabla 6: Contenido de flavonoides totales (CFT) (Promedio  $\pm$  SD).

Muestra	CFT (mg RE <sup>6</sup> /g p.s.)
Liofilizado de maqui	68,04 $\pm$ 24,63

<sup>6</sup> mg ER: miligramos de equivalentes de Rutina por gramo de peso seco.

El resultado del análisis de flavonoides totales fue comparado con el trabajo realizado por (López-Vargas, et al. 2013), en el cual se obtuvo 6,83 mg ER/g para la fruta Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *Flavicarpa*), y con el bagazo de la fruta entera del jugo de granada (*Punica granatum* L.) obtenido en el estudio de Viuda-Martos, et al. (2011) de 7,19 mg ER/g. El contenido de flavonoides totales del maqui fue superior a ambas referencias bibliográficas, como se expuso en la tabla 6. Dicha diferencia se atribuye a la comprobada naturaleza antioxidante del fruto estudiado. El estudio de Fredes, et al. (2013) reporta que los genotipos con mayor contenido de antocianinas (pigmentos hidrosolubles que pertenecen al grupo de los flavonoides), también obtuvieron las capacidades antioxidantes más altas.

#### 6.1.4. Actividad antimicrobiana

Tabla 7: Actividad antimicrobiana del extracto de liofilizado de maqui (ELM).

Cepa Bacteriana	MIC <sup>7</sup> (μL/mL)
<i>Listeria innocua</i>	50
<i>Alcaligenes faecalis</i>	60
<i>Enterobacter amnigenus</i>	100
<i>Enterobacter gergoviae</i>	80
<i>Serratia marcescens</i>	60
<i>Aeromonas hydrophila</i>	40
<i>Shewanella putrefaciens</i>	70
<i>Achromobacter denitrificans</i>	80

<sup>7</sup> MIC: Concentración mínima inhibitoria

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos por el ELM contra ocho bacterias, a través del método de microdilución con concentraciones de ELM entre 20 y 100 μL/mL. Se escogieron dichas bacterias por su relación al deterioro de los alimentos. Con ellos se afirma que el microorganismo que requirió la concentración más baja de ELM para su inhibición fue *Aeromonas hydrophila* (40 μL/mL), mientras que aquel que precisó la máxima concentración para lograr la inhibición fue *Enterobacter amnigenus* (100 μL/mL). Si bien existen estudios que avalan que extractos naturales poseen actividad antimicrobiana, la razón de su capacidad no está bien documentada. Sin embargo, se cree que la actividad antimicrobiana del ELM podría estar provocada por compuestos como polifenoles y/o flavonoides. La actividad antimicrobiana de aquellos compuestos está ampliamente demostrada (Cushnie and Lamb, 2005; Tian, et al. 2009; Boulekbache-Makhlouf, et al. 2013; Kaur and Singh, 2008). Se ha propuesto que dichos compuestos causan daño a las membranas celulares causando el desprendimiento de materiales intracelulares y ocasionando la muerte del microorganismo (Abdel Ghani, et al. 2008). En el estudio de Kaur and Singh, 2008, los autores proponen que el mecanismo de acción de los polifenoles en el



microorganismo tendría relación con acción extracelular o blancos intracelulares. Los autores reportan que los polifenoles pueden atravesar la pared celular de la bacteria e interactuar con compartimientos intracelulares independiente a la interacción en la superficie celular. Estos compuestos podrían interactuar con las proteínas de la superficie de la bacteria mediante puentes de hidrógeno a través de sus grupos hidroxilos, los cuales ocasionarían cambios en la permeabilidad de la membrana y así la destrucción de la célula, además Tian, et al. (2009) reportó que dichos compuestos podrían penetrar en la bacteria y coagular el contenido celular.

### 6.1.5. Composición química

La composición química del liofilizado de maqui se realizó a través de un análisis proximal, cuyos resultados son expuestos en la tabla 8. En los anexos se encuentran los cálculos realizados para obtener los resultados. Los resultados en **negrita** son aquellos obtenidos experimentalmente.

Tabla 8: Resultados en base seca del análisis realizado y la referencia consultada.

Composición química	Contenido (g/100g p.s.)	Schmidt-Hebbel, et al. (1992)
Calorías	273,90 (kcal) <sup>(8)</sup>	341,48 (kcal) <sup>(8)</sup>
Humedad	<b>0,74±0,06</b>	0,74
Proteínas	1,82 <sup>(9)</sup>	1,82
Materia grasa	<b>0,90±0,07</b>	tr.
E.N.N.		92,89 <sup>(8)</sup>
Carbohidratos	64,63 <sup>(8)</sup>	83,55 <sup>(8)</sup>
Fibra soluble	<b>30,47±1,29 (FDT<sup>10</sup>)</b>	9,34 <sup>(8)</sup> } 11,16 (FDT)
Fibra cruda		1,82 }
Cenizas	<b>1,44±0,004</b>	2,73

<sup>8</sup> Datos calculados teóricamente. <sup>9</sup> Datos bibliográficos en base seca para el fruto fresco extraído de Schmidt-Hebbel, et al. (1992). <sup>10</sup> FDT: Fibra dietaria total, sumatoria de fibra soluble e insoluble (o cruda).

Los resultados obtenidos en este estudio fueron comparados con aquellos reportados por Schmidt-Hebbel, et al. (1992), los cuales corresponden a valores obtenidos para el maqui fresco y expresados en base húmeda, por lo tanto sus valores fueron re calculados para obtenerlos en base seca y de esta forma, hacer comparables ambos estudios.

En primer lugar, se realizó una estandarización del contenido de humedad. Esto es, se trabajó con el contenido de agua del liofilizado, es por ello que ambos datos poseen el mismo valor (0,74 g). A partir de ello, el contenido calórico que posee el liofilizado de 273,90 kcal dista de aquel obtenido en base seca de la referencia (341,48kcal), lo cual podría ser explicado con la diferencia en el contenido de carbohidratos de ambas muestras, ya que éstos influyen directamente en el cálculo de energía. El contenido de proteínas y fibra cruda solamente fue posible obtenerlos de datos bibliográficos, ya que al ser éstos los últimos análisis en realizarse, la muestra fue insuficiente para sus realizaciones. Para el contenido de materia grasa, la literatura consultada reporta como valor “traza” la cantidad de grasa en el fruto, por lo cual es difícil realizar una comparativa certera entre ambos resultados, sin embargo el contenido registrado en la presente investigación de 0,9 g denota la baja cantidad de materias grasas presentes en el liofilizado de maqui. El contenido de carbohidratos estimados fue menor (64,63 g) en comparación al valor de la referencia (83,55 g), sin embargo ambas cifras son teóricas, por lo tanto se precisarían análisis químicos para determinar dichos valores en forma experimental. En el caso de la fibra dietaria total (suma de la fibra soluble e insoluble (o cruda)), se obtuvo experimentalmente un valor mayor (30,47 g) a aquel obtenido de dicha sumatoria para el caso de la referencia (11,16 g), lo cual podría ser explicado porque el análisis de fibra cruda es una aproximación grosera del contenido de fibra total, ya que con el método gravimétrico que se utiliza para analizar fibra cruda se subvalora en forma importante el contenido de FDT ya que se disuelve gran parte de la hemicelulosa y lignina, cantidades variables de celulosa y toda la fibra soluble (Pak, 2007), es por ello que el valor que reporta Schmidt-Hebbel, et al. (1992) es menor al obtenido en la presente investigación, lo

cual es avalado por Morón et al. (1997), donde los autores reportaron que los valores de fibra dietaria son por lo general de 3 a 5 veces mayores que los valores de fibra cruda. En cuanto al E.N.N. (extracto no nitrogenado) que consta de carbohidratos solubles (carbohidratos y fibra soluble, la cual incluye pectinas, gomas, mucílagos, entre otros) pero que incluye una cantidad variable de carbohidratos no digeribles, solo fue posible estimarlo teóricamente para la referencia. En cuanto al valor obtenido de cenizas, el valor de la literatura de 2,7 g fue prácticamente el doble al obtenido de 1,44 g, lo cual supone que el proceso de deshidratación por liofilización altera significativamente el contenido de cenizas.

## 6.2. Resultados para los films

### 6.2.1. Capacidad antioxidante

Tabla 9: Capacidad antioxidante de los films elaborados mediante DPPH, FRAP y FIC.

Muestras	DPPH (mg ET/g film)	FRAP (mg ET/g film)	FIC ( $\mu$ g EDTA/g film)
quitosano control (q)	N.A. <sup>10</sup>	0,16 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	107,81 $\pm$ 3,71 <sup>a</sup>
q+maqui 0,5 %	2,06 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	4,26 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	109,99 $\pm$ 4,25 <sup>a</sup>
q+maqui 1 %	2,80 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	9,36 $\pm$ 1,11 <sup>c</sup>	111,15 $\pm$ 3,38 <sup>a</sup>

<sup>10</sup> N.A.: No activo.

En la tabla 9 se observan los resultados para los tres análisis de capacidad antioxidante realizados a las muestras estudiadas. En primer lugar, el análisis de capacidad antioxidante mediante DPPH sólo pudo ser estudiado en las muestras con liofilizado incorporado, ya que en ausencia de éste, la muestra de extracto de quitosano control (q) no logró decolorar la solución metanólica de DPPH. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las dos muestras restantes, obteniéndose un valor mayor para el film con mayor concentración de liofilizado incorporado (q+maqui 1 %), por el contrario, el menor valor de actividad antioxidante fue obtenido por el film con menor concentración de liofilizado agregado (q+maqui 0,5 %). En el análisis anteriormente descrito, la concentración del liofilizado agregado guarda relación con la cuantificación realizada, lo cual concuerda con datos bibliográficos para el mismo método de capacidad antioxidante por DPPH (Moradi, et al. 2012, Ruiz-Navajas, et al. 2013, Siripatrawan and Harte, 2010), quienes obtuvieron la misma tendencia que en esta investigación: a mayor concentración agregada, mayor fue la cuantificación obtenida.

En el segundo análisis de capacidad antioxidante mediante FRAP, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las tres muestras estudiadas, siendo la muestra más concentrada (q+maqui 1 %) aquella que registró la mayor capacidad antioxidante, de 9,36 mg ET/g film. En contraste, la menor capacidad antioxidante mediante dicho método la obtuvo la muestra control sin liofilizado incorporado (q) de 0,16 mg ET/g film, lo cual concuerda con el resultado obtenido por Ruiz-Navajas, et al. (2013) de 0,21 mg ET/g film. De los resultados anteriores, también se observó que la tendencia concentración/cuantificación es similar; a mayor concentración, mayor es la cuantificación de antioxidantes. Así mismo, Ruiz-Navajas, et al. (2013) consiguió la misma relación entre la concentración de extracto agregado con la cuantificación realizada.

En el tercer caso, la capacidad antioxidante fue medida por el método FIC, donde no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ), es decir, las tres muestras analizadas poseen la misma efectividad para quelar al ión metálico ferroso ( $Fe^{+2}$ ). A pesar de no encontrar diferencias estadísticas entre las tres muestras, existe una tendencia similar a los análisis anteriores respecto de la concentración de liofilizado agregado y la cuantificación realizada.

### 6.2.2. Contenido de polifenoles totales

Tabla 10: Resultados de la cuantificación de polifenoles totales de las tres películas elaboradas.

Muestras	CPT (mg EAG/g film)
q	0,04±0,01 <sup>a</sup>
q+maqui 0,5 %	4,74±0,45 <sup>b</sup>
q+maqui 1 %	8,44±1,14 <sup>c</sup>

La tabla 10 expone los resultados obtenidos de cuantificación del contenido de polifenoles totales. De dichos resultados se desprende que hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las tres muestras, obteniendo el mayor contenido de polifenoles aquella muestra con mayor concentración de liofilizado agregado (q+maqui 1 %) de 8,44 mg EAG/g film y el menor contenido de polifenoles la muestra control, que carecía de liofilizado (q), la cual registró 0,04 mg EAG/g film. La tendencia de estos resultados concuerdan con la tendencia de los datos bibliográficos de Moradi, et al. (2012); Ruiz-Navajas, et al. (2013) y Siripatrawan and Harte (2010), donde el contenido de polifenoles totales para las muestras de quitosano control (q) fue menor a las muestras que contenían extractos añadidos. Por otro lado, tanto el presente análisis como los anteriores, dan cuenta de una posible correlación entre la concentración de liofilizado incorporado y la cuantificación realizada, ya sea de antioxidantes o polifenoles totales.

### 6.2.3. Contenido de flavonoides totales

Tabla 11: Resultados obtenidos de la cuantificación de flavonoides totales.

Muestras	CFT (mg ER/g film)
q	0,40±0,01 <sup>a</sup>
q+maqui 0,5 %	16,39±0,23 <sup>b</sup>
q+maqui 1 %	24,13±2,27 <sup>c</sup>

El análisis de flavonoides totales registró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las tres muestras. Se desprende de la tabla 11 el mismo comportamiento que en el análisis anterior: a mayor concentración incorporada, mayor es la cuantificación realizada. De acuerdo a ello, el mayor contenido de flavonoides totales lo obtuvo la muestra más concentrada (q+maqui 1 %) de 24,13mg ER/g film, por el contrario, la muestra que registró el más bajo valor de flavonoides totales fue quitosano control (q) de 0,40 mg ER/g film, la cual

carecía de liofilizado de maqui incorporado. El análisis en discusión carece de datos referenciales, lo cual dificulta la realización de una comparación entre muestras similares.

#### 6.2.4. Actividad antimicrobiana

Se realizó el ensayo de actividad antimicrobiana en las muestras de películas comestibles elaboradas basadas en el método de difusión en disco de agar contra ocho cepas bacterianas relacionadas al deterioro de los alimentos.

Tabla 12: Efecto antimicrobiano de los films elaborados (q, q+maqui 0,5% y q+maqui 1%).

Cepa bacteriana	Diámetro halo de Inhibición (mm)		
	q	q+maqui 0,5%	q+maqui 1%
<i>Listeria innocua</i>	N.A.	N.A.	N.A.
<i>Alcaligenes faecalis</i>	N.A.	20,05±0,96 <sup>aA</sup>	21,03±0,59 <sup>aAC</sup>
<i>Serratia marcescens</i>	N.A.	14,65±0,86 <sup>aB</sup>	17,07±0,36 <sup>aB</sup>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	N.A.	16,82±0,24 <sup>aBC</sup>	18,59±0,75 <sup>aBC</sup>
<i>Citrobacter freundii</i>	N.A.	17,10±0,64 <sup>aBC</sup>	18,67±0,00 <sup>aBC</sup>
<i>Shewanella putrefaciens</i>	14,32±0,13 <sup>aA</sup>	20,43±0,89 <sup>bA</sup>	21,89±0,13 <sup>bA</sup>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12,86±0,00 <sup>aB</sup>	19,13±0,87 <sup>bAC</sup>	22,03±1,28 <sup>bA</sup>
<i>Achromobacter denitrificans</i>	N.A.	21,43±0,33 <sup>aA</sup>	22,94±0,10 <sup>bA</sup>

Para la misma bacteria, las mismas letras minúsculas no poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) según la prueba de Múltiples Rangos de Tukey.

Para la misma muestra de film, las mismas letras mayúsculas, no poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) según la prueba de Múltiples Rangos de Tukey.

De la tabla 12 se desprende que los films de quitosano control (q) no fueron efectivos contra seis de los ocho microorganismos testeados. Sin embargo, mostró

efecto inhibitorio contra *S. putrefaciens* generando un halo de inhibición de 14,32 mm y también contra *P. fluorescens* formando un halo de 12,86 mm, estos resultados son avalados también por estudios anteriores que revelan la actividad antimicrobiana del quitosano. Tal es el caso de (Li, et al. 2008) en cuya investigación el quitosano fue capaz de inhibir a la bacteria patógena *Xanthomonas*, y también (Du, et al. 2009), reportó que el quitosano mostró actividad inhibitoria contra los microorganismos *Bacillus subtilis*, *E. Coli* y *S. aureus*. Por otro lado, los films de quitosano con maqui incorporado inhibieron a siete de las ocho bacterias testeadas. Dicha inhibición fue dependiente de la concentración. Para *L. innocua*, ninguna de las tres muestras fue capaz de inhibir la proliferación microbiana. Para *A. faecalis*, los halos de inhibición van desde los 20,05 mm a los 21,03 mm sin diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre las muestras de q+maqui 0,5 % y q+maqui 1 %. Para *S. marcescens*, los halos de inhibición están dentro del rango de 14,65 mm a 17,07 mm ( $p > 0,05$ ) para ambas muestras con liofilizado de maqui incorporado. El microorganismo *A. hydrophila* presentó halos de inhibición de 16,82 mm a 18,59 mm, sin diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre ambas muestras con liofilizado de maqui agregado. Para *C. freundii* tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) para ambas muestras con liofilizado, y los halos de inhibición se encuentran dentro del rango de 17,10 mm a 18,67 mm. El microorganismo *S. putrefaciens* fue inhibido por todas las muestras, dentro de las cuales hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre “q” y las dos muestras con liofilizado incorporado, sin embargo entre éstas últimas no hubo diferencias ( $p > 0,05$ ) y los halos de inhibición van desde los 14,32 mm a los 21,89 mm. Para *P. fluorescens* los halos de inhibición se encuentran dentro del rango de 12,86 mm a 22,03 mm, habiéndose encontrado diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los films “q” con ambas muestras con liofilizado agregado, sin embargo entre éstas dos últimas no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Para la bacteria *A. denitrificans*, los halos de inhibición fueron los más grandes, los cuales van desde los 21,43 mm a los 22,94 mm, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre ambas



muestras de films con liofilizado de maqui incorporado. Como se mencionó anteriormente, la actividad antimicrobiana de los flavonoides está ampliamente demostrada en estudios de Cushnie and Lamb (2005); Tian, et al. (2009); Boulekbache-Makhlouf, et al. (2013) y Kaur and Singh (2008). Debido a las condiciones experimentales en que se realizó el análisis, podría atribuirse un efecto bactericida y no bacteriostático al comportamiento de los flavonoides del maqui sobre los microorganismos testeados. Debido a que los films fueron colocados sobre las cepas bacterianas, la formación del halo de inhibición sería explicado mediante el efecto bactericida que logró colapsar la estructura celular de cada bacteria, sin embargo se precisarían más análisis para poder avalar científicamente dicha información.

## 7. CONCLUSIONES

- Se comprobó que el liofilizado de maqui conservó sus componentes bioactivos después del proceso de deshidratación. El liofilizado posee una alta capacidad antioxidante, así como también alto contenido de polifenoles totales y alto contenido de flavonoides totales. Además, posee actividad antimicrobiana contra ocho cepas bacterianas relacionadas al deterioro de los alimentos.
- Los resultados de los análisis químicos del liofilizado de maqui muestran el potencial uso de éste en la industria alimentaria por sus propiedades tecnológicas y funcionales, las cuales pueden influir positivamente en la salud. Se confirma que el liofilizado de maqui podría ser utilizado como fuente de antioxidantes naturales, ya que son activos incluso después del tratamiento de deshidratación por liofilización.
- En cuanto al potencial antimicrobiano, el liofilizado de maqui podría ser utilizado como fuente de preservantes naturales, sin embargo se precisan más análisis que establezcan su biodisponibilidad o si existe interacción con otros componentes alimenticios.
- De los tres tipos de films elaborados, se reveló una posible correlación directamente proporcional entre la concentración de liofilizado agregado con la cuantificación de distintos parámetros químicos (capacidad antioxidante mediante DPPH, FRAP y FIC, contenido de polifenoles y flavonoides totales).
- La incorporación de liofilizado de maqui a películas comestibles de quitosano puede tener aplicaciones complementarias en el envasado de alimentos, ya que los resultados mostraron que los films de quitosano con liofilizado incorporado podrían ser utilizados como parte de un envasado activo debido a su excelente actividad antimicrobiana *in vitro* y a su capacidad antioxidante. Sin embargo hacen falta más estudios que revelen si el quitosano con liofilizado de maqui incorporado corresponde a una herramienta de interés en la conservación de alimentos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Abascal, K., L. Ganora and E. Yarnell (2005). "The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review." Phytotherapy Research **19**: 655-660.

Abate, G., R. N. Mshana and H. Miörner (1998). "Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." International Journal of Tuberculosis and Lung Disease **2**(12): 1011-1016.

Abdel Ghani, S. B., L. Weaver, Z. H. Zidan, H. M. Ali, C. W. Keevil and R. C. D. Brown (2008). "Microwave-assisted synthesis and antimicrobial activities of flavonoid derivatives." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **18**(2): 518-522.

Abdollahi, M., M. Rezaei and G. Farzi (2012). "A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan." Journal of Food Engineering **111**: 343-350.

Aider, M. (2010). "Chitosan application for active bio-based films and potential in the food industry." Food Science and Technology **43**(6): 837-842.

Alonso, J. (2012). "Maqui (*Aristotelia chilensis*): un nutraceutico de relevancia medicinal." Revista Farmacológica de Chile **5**: 95 - 100.

AOAC (1997). Officials Methods of Analysis of AOAC International. Washington, DC, Association of Official Analytical Chemists.

Araya, F. (2012). "El maqui avanza para convertirse en cultivo." [en línea] <<http://www.agromeat.com/85997/el-maqui-avanza-para-convertirse-en-cultivo>> [consulta: Febrero, 2014]

Benedetti, S. (2012). "Información tecnológica de productos forestales no madereros del bosque nativo en Chile: Monografía de maqui (*Aristotelia chilensis*)."  
[en línea]  
<[http://www.pfnm.cl/paqtecnologicos/maqui/monografia\\_maqui.pdf](http://www.pfnm.cl/paqtecnologicos/maqui/monografia_maqui.pdf)> [consulta: Marzo, 2014]

Blasa, M., M. Candiracci, A. Accorsi, M. P. Piacentini, M. C. Albertini and E. Piatti (2006). "Raw *Millefiori* honey is packed full of antioxidants." Food Chemistry **96**: 217-222.

Boulekbache-Makhlouf, L., S. Slimani and K. Madani (2013). "Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria." Industrial Crops and Products **41**(0): 85-89.

Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier and C. Berset (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." LWT - Food Science and Technology **28**(1): 25-30.

Bunea, A., D. Rugină, Z. Sconța, R. M. Pop, A. Pinte, C. Socaciu, F. Tăbăran, C. Grootaert, K. Struijs and J. VanCamp (2013). "Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells." Phytochemistry **95**(0): 436-444.

Carter, P. (1971). "Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine)." Analytical Biochemistry **40**(2): 450-458.

Céspedes, C. L., M. El-Hafidi, N. Pavon and J. Alarcon (2008). "Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (*Elaeocarpaceae*), Maqui." Food Chemistry **107**(2): 820-829.

Cushnie, T. and A. J. Lamb (2005). "Antimicrobial activity of flavonoids." International Journal of Antimicrobial Agents **26**: 343-356.

Cushnie, T. P. T. and A. J. Lamb (2011). "Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids." International Journal of Antimicrobial Agents **38**(2): 99-107.

Chaves López, C., G. Mazzarrino, A. Rodríguez, J. Fernández-López, J. A. Pérez-Álvarez and M. Viuda-Martos (2015). "Assessment of antioxidant and antibacterial potential of borojo fruit (*Borojoa patinoi* Cuatrecasas) from the rainforest of South America." Industrial Crops and Products **63**: 79-86.

Donoso, C. (2006). Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina: autoecología. Valdivia, Chile.

Du, Y., Y. Zhao, S. Dai and B. Yang (2009). "Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity." Innovative Food Science & Emerging Technologies **10**(1): 103-107.

Escobar, D., A. Sala, C. Silvera, R. Harispe and R. Márquez (2009). "Películas biodegradables y comestibles desarrolladas en base a aislado de proteínas de suero lácteo: estudio de dos métodos de elaboración del uso de sorbato de potasio como conservador." Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay **4**: 33-38.

Escribano-Bailón, M.T., C. Alcalde-Eon, O. Muñoz, J.C. Rivas-Gonzalo and C. Santos-Buelga (2006). "Anthocyanins in berries of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz)." Phytochemistry Analysis: PCA **17** (1): 8-14.

Pak, N. Capítulo 16: Análisis de fibra dietética. En su: Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. 1° ed. Estados Unidos, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2007. pp.177-188.

Fredes, C., G. Montenegro, J. P. Zoffoli, M. Gómez and P. Robert (2012). "Polyphenol content and antioxidant activity of maqui (*Aristotelia chilensis* [Molina] Stuntz) during fruit development and maturation in central Chile." Chilean Journal of Agricultural Research **72**(4): 582 - 589.

Fredes, C., G. Montenegro, J. P. Zoffoli, F. Santander and P. Robert (2014). "Comparison of the phenolic content, total anthocyanin content and antioxidant capacity of polyphenol-rich fruits grown in Chile." Ciencia e Investigación Agraria **41**(1): 49-61.

Fredes, C., G. Yousef, P. Robert, M. H. Grace, M. A. Lila, M. Gómez, M. Gebauer and G. Montenegro. (2013). "Anthocyanin profiling of wild maqui berries (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) from different geographical regions in Chile." Wiley Online Library

George, S., F. Tourniaire, H. Gautier, P. Goupy, E. Rock and C. Caris-Veyrat (2011). "Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilization of red and yellow tomatoes." Food Chemistry **124**: 1603-1611.

Giosafatto, C. V. L., P. Di Pierro, P. Gunning, A. Mackie, R. Porta and L. Mariniello (2014). "Characterization of Citrus pectin edible films containing transglutaminase-modified phaseolin." Carbohydrate Polymers **106**(0): 200-208.

Gironés-Vilaplana, A., N. Baenas, D. Villaño, H. Speisky, C. García-Viguera and D. A. Moreno (2014). "Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects." Journal of Functional Foods **7**(0): 599-608.

Gironés-Vilaplana, A., P. Mena, C. García-Viguera and D. A. Moreno (2012). "A novel beverage rich in antioxidant phenolics: Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice." LWT - Food Science and Technology **47**(2): 279-286.

Guiselli, A., M. Nardini, A. Baldi and C. Scaccini (1998). "Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine." Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**(2): 361-367.

Harborne, J. B. and H. Baxter (1999). The handbook of natural flavonoids, Vols 1 and 2. The handbook of natural flavonoids. J. W. a. Sons. Chichester, UK.

Harborne, J. B. and C. A. Williams (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." Phytochemistry **55**(6): 481-504.

Havsteen, B. H. (2002). "The biochemistry and medical significance of the flavonoids." Pharmacology & Therapeutics **96**(2–3): 67-202.

Hoffmann, E. (1997). Flora Silvestre de Chile: Zona Araucana. Santiago, Chile.

Kang, J., K. M. Thakali, C. Xie, M. Kondo, Y. Tong, B. Ou, G. Jensen, M. B. Medina, A. G. Schauss and X. Wu (2012). "Bioactive of açai (*Euterpe precatória* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart." Food Chemistry **133**: 671 - 677.

Kaur, G. and R. P. Singh (2008). "Antibacterial and membrane damaging activity of *Livistona chinensis* fruit extract." Food and Chemical Toxicology **46**(7): 2429-2434.

Krokida, M. and Z. Maroulis (2000). Quality changes during drying of food materials. Drying technology in agriculture and food sciences. A. S. M. (Ed.). Enfield, NH, USA, Science Publishers, Inc.: 61-106.

Kulkarni, A. P. and S. M. Aradhya (2005). "Chemical changes and antioxidant activity in pomegrate arils during fruit development." Food Chemistry **93**: 319-324.

Li, B., X. Wang, R. Chen, W. Huangfu and G. Xie (2008). "Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*." Carbohydrate Polymers **72**(2): 287-292.

Li, J.-H., J. Miao, J.-L. Wu, S.-F. Chen and Q.-Q. Zhang (2014). "Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants." Food Hydrocolloids **37**(0): 166-173.

López-Vargas, J. H., F. Fernández-López, J. A. Pérez-Álvarez and M. Viuda-Martos (2013). "Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products." Food Research International **51**: 756-763.

Marques, L. G., A. M. Silveira and J. T. Freire (2006). "Freeze-drying characteristics of tropical fruits." Drying Technology **24**(4): 457-463.



Materska, M. (2014). "Bioactive phenolics of fresh and freeze-dried sweet and semi-spicy pepper fruits (*Capsicum annuum* L.)." Journal of Functional Foods **7**: 269-277.

Middleton, E. J., C. Kandaswami and T. Theoharides (2000). "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer." Pharmacological reviews **54**(4): 673-751.

Miranda - Rottmann, S., A. A. Aspillaga, D. D. Pérez, L. Vásquez, Á. L. F. Martínez and F. Leighton (2002). "Juice and Phenolic Fractions of the Berry *Aristotelia chilensis* Inhibit LDL Oxidation *in Vitro* and Protect Human Endothelial Cells against Oxidative Stress." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**: 7542-7547.

Miyazawa, T., K. Nakagawa, M. Kudo, K. Muraishi and K. Someya (1999). "Direct intestinal absorption of red fruits anthocyanins, cyaniding-3-glucoside and cyaniding-3,5-glucoside, into tracts humans." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**: 1083-1091.

Moradi, M., H. Tajik, S. M. R. Rohani, A. R. Oromiehie, H. Malekinejad, J. Aliakbarlu and M. Hadian (2012). "Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract." Food Science and Technology **46**: 477-484.

Morón, C., Zacarías, I., Pablo, S. (Editores). *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición*. FAO. Dirección de Alimentación y Nutrición. Oficina Regional para América Latina y el Caribe. INTA. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp. 177-187. (1997).

Muñoz, L. A., J. M. Aguilera, L. Rodríguez-Turienzo, A. Cobos and O. Díaz (2012). "Characterization and microstructure of films made from mucilage of *Salvia*

*hispanica* and whey protein concentrate." Journal of Food Engineering **111**(3): 511-518.

Muñoz, O., M. Montes and T. Wilkomirsky (2004). Plantas medicinales de uso en Chile: Química y Farmacología. Santiago, Chile.

Nakamura, S., J. Tanaka, T. Imada, H. Shimoda and K. Tsubota (2014). "Delphinidin 3,5-O-diglucoside, a constituent of the maqui berry (*Aristotelia chilensis*) anthocyanin, restores tear secretion in a rat dry eye model." Journal of Functional Foods **10**: 346-354.

Ojagh, S. M., M. Rezaei, S. H. Razavi and S. M. H. Hosseini (2010). "Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water." Food Chemistry **122**: 161-166.

Oliva, M. (2010). "Liofilización (aspectos técnicos)." [en línea] <<http://ocw.ub.edu/farmacia/tecnologia-farmaceutica-i/fitxers/temes/T.11-Liofilb7litzacio.pdf>> [consulta: Abril, 2015]

Oyaizu, M. (1986). "Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine." Japan Journal of Nutrition **44**: 307-315.

Ponce, A. G., S. I. Roura, C. E. del Valle and M. R. Moreira (2008). "Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies." Postharvest Biology and Technology **49**: 294-300.

Ramírez, C., H. Figueroa, R. Carrillo and D. Contreras (1983). Estudio fitosociológico de los estratos inferiores en un bosque de pino.

Ratti, C. (2001). "Hot air and freeze-dried of high-value foods: a review." Journal of Food Engineering **49**: 311-319.

Rinaudo, M. (2006). "Chitin and chitosan: properties and applications." Progress in Polymere Science **31**: 603-632.

Rodrigues, E., N. Poerner, I. I. Rockenbach, L. V. Gonzaga, C. R. Mendes and R. Fett (2011). "Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil." Food Science and Technology (Campinas) **31**: 911-917.

Rodríguez, R., O. Matthei and M. Quezada (1983). Flora arbórea de Chile. Concepción, Chile.

Rubilar, M. n., C. Jara, Y. Poo, F. Acevedo, C. Gutierrez, J. Sineiro and C. Shene (2011). "Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz.): Sources of Antioxidant Compounds and  $\alpha$ -Glucosidase/ $\alpha$ -Amylase Inhibitors." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(5): 1630-1637.

Ruiz-Navajas, Y. (2014). Caracterización de aceites esenciales de plantas aromáticas mediterráneas y su aplicación a films de quitosano para la conservación de productos cárnicos. Tesis Doctoral, Universidad Miguel Hernández.

Ruiz-Navajas, Y., M. Viuda-Martos, E. Sendra, J. A. Pérez-Alvarez and J. Fernández-López (2013). "*In vitro* antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils." Food Control **30**: 386-392.

Sayas-Barberá, E., J. Quesada, E. Sánchez-Zapata, M. Viuda-Martos, F. Fernández-López, J. A. Pérez-Alvarez and E. Sendra (2011). "Effect of the

molecular weight and concentration of chitosan in pork model burgers." Meat Science **88**(4): 740-749.

Schmidt-Hebbel, H., I. Pennacchiotti, L. Masson and M. A. Mella (1992). Tabla de composición química de alimentos chilenos.

Schreckinger, M. E., J. Wang, G. Yousef, M. A. Lila and E. Gonzalez de Mejia (2010). "Antioxidant Capacity and *in Vitro* Inhibition of Adipogenesis and Inflammation by Phenolic Extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(16): 8966-8976.

Singleton, V., R. Orthofer and R. Lamuela-Raventós (1999). "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent." Methods in Enzymology **299**: 152-178.

Siripatrawan, U. and B. R. Harte (2010). "Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract." Food Hydrocolloids **24**: 770-775.

Speisky, H. (2015). Antioxidantes en alimentos: principales fuentes y sus contenidos. [en línea] <<http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes-en-alimentos/>> [consulta: Julio, 2015]

Stapleton, P. D., S. Shah, J. M. T. Hamilton-Miller, Y. Hara, Y. Nagaoka, A. Kumagai, S. Uesato and P. W. Taylor (2004). "Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins." International Journal of Antimicrobial Agents **24**(4): 374-380.

Strack, D. and V. Wray (1989). Anthocyanins: Methods in plant biochemistry, plants phenolics.

Tepe, B., D. Daferera, A. Sokmen, M. Sokmen and M. Polissiou (2005). "Antimicrobial and antioxidants activities of the essential oils and various extracts of *Salvia tormentosa* Miller (Lamiaceae)." Food Chemistry **90**: 333-340.

Tian, F., B. Li, B. Ji, G. Zhang and Y. Luo (2009). "Identification and structure–activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*." LWT - Food Science and Technology **42**(7): 1289-1295.

Vashisth, T., R. K. Singh and R. B. Pegg (2011). "Effects of drying on the phenolic content and antioxidant activity of muscadine pomace." LWT - Food Science and Technology **44**: 1649-1657.

Viuda-Martos, M., Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, E. Sendra, E. Sayas-Barberá and J. A. Pérez-Álvarez (2011). "Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction." Food Research International **44**: 1217-1223.

Vogel, H. (2012). "El maqui avanza para convertirse en cultivo." [en línea] <<http://www.agromeat.com/85997/el-maqui-avanza-para-convertirse-en-cultivo>> [consulta: Febrero, 2014]

Vvedenskaya, I. and N. Vorsa (2004). "Flavonoid composition over fruit development and maturation in American cranberry, *Vaccinium macrocarpon* Ait." Plant Science **167**: 1043-1054.

Wang, S. Y., C.-T. Chen and C. Y. Wang (2009). "The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of the red raspberries." Food Chemistry **112**: 676-684.

Wojdyło, A., A. Figiel and J. Oszmiański (2009). "Effect of Drying Methods with the Application of Vacuum Microwaves on the Bioactive Compounds, Color,

and Antioxidant Activity of Strawberry Fruits." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(4): 1337-1343.

Wu, J., S. Chen, S. Ge, J. Miao, J. Li and Q. Zhang (2013). "Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract." Food Hydrocolloids **32**(1): 42-51.

Wu, R., B. Frei, J. A. Kennedy and Y. Zhao (2010). "Effects of refrigerated storage and processing technologies on the bioactive compounds and antioxidants capacities of Marion and Evergreen blackberries." LWT - Food Science and Technology **43**: 1253-1264.

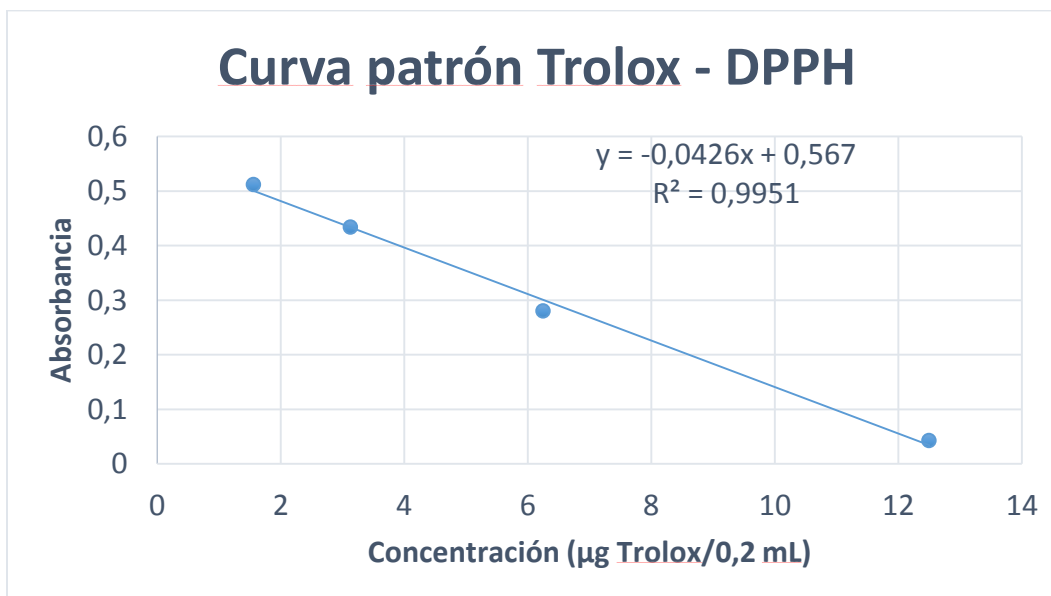
You, Q., B. Wang, F. Chen, Z. Huang, X. Wang and P. G. Luo (2011). "Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars." Food Chemistry **125**(1): 201-208.

Zivanovic, S., S. Chi and A. F. Draughon (2005). "Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils." Food Microbiology and Safety **70**(1): 45-51.

## 9. ANEXOS

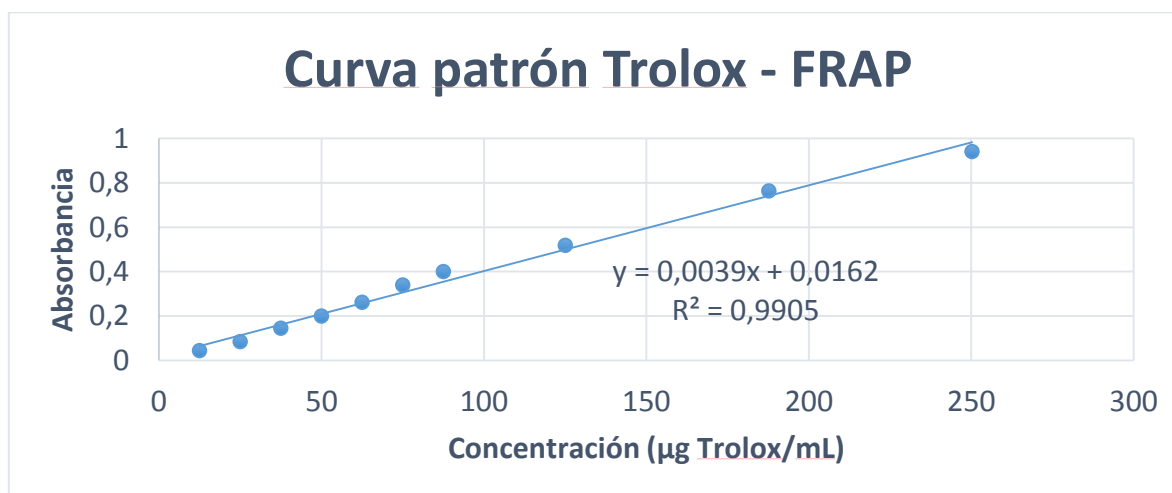
### ANEXO 1 – Curva patrón Trolox, capacidad antioxidante por DPPH.

Para obtener el resultado en equivalentes Trolox, se preparó una curva patrón. La metodología del análisis fue establecida previamente en el punto 5.3.2.1.



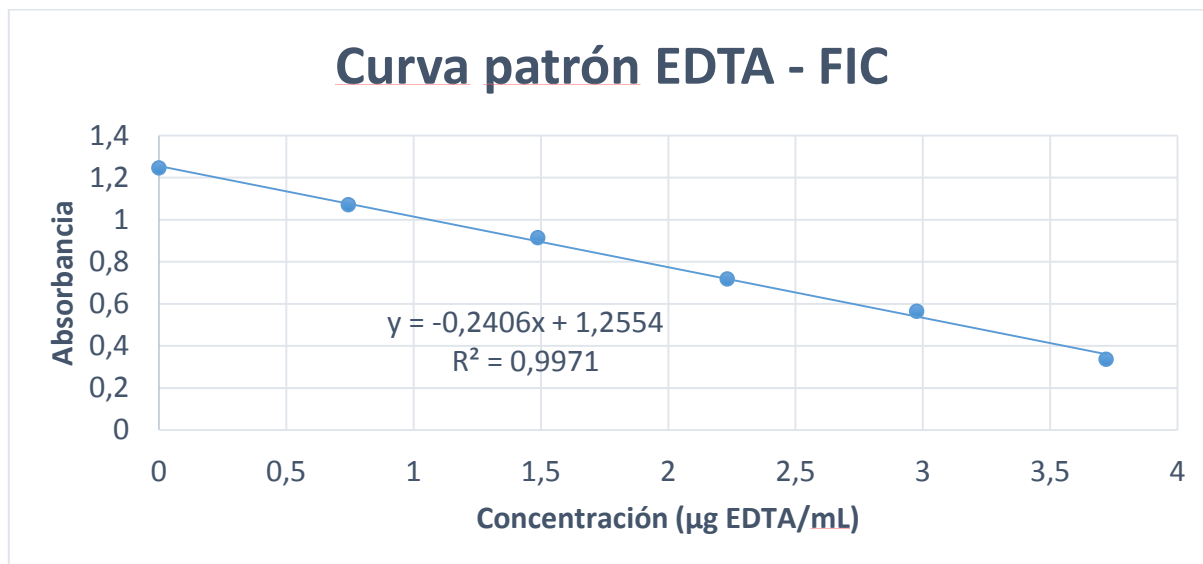
### ANEXO 2 – Curva patrón Trolox, capacidad antioxidante por FRAP.

Para obtener el resultado en equivalentes Trolox, se preparó una curva patrón. La metodología del análisis fue establecida previamente en el punto 5.3.2.2.



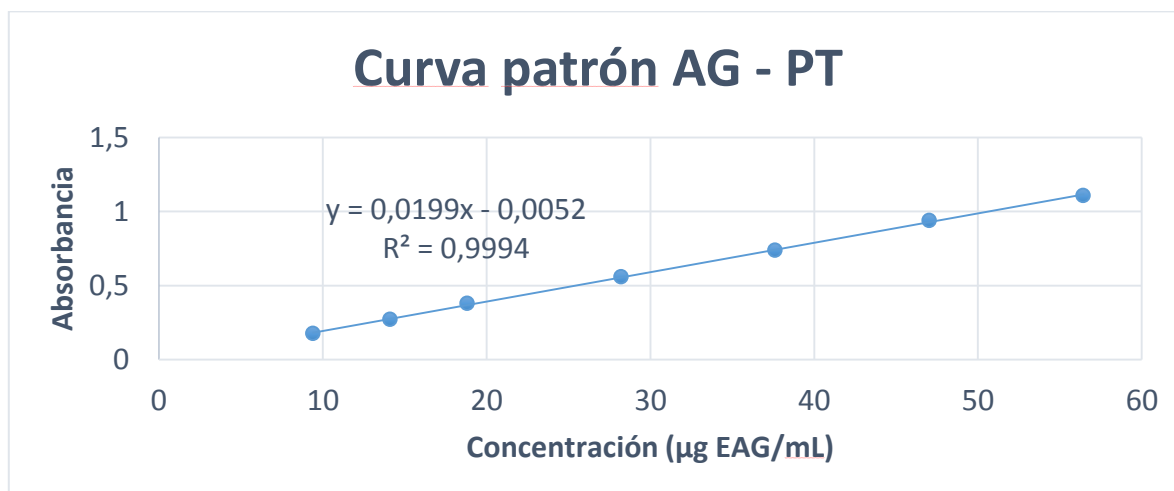
### ANEXO 3 – Curva patrón EDTA, capacidad antioxidante por FIC

Para obtener el resultado en equivalentes EDTA, se preparó una curva patrón. La metodología del análisis fue establecida previamente en el punto 5.3.2.3.



### ANEXO 4 – Curva patrón Ácido gálico (AG), polifenoles totales.

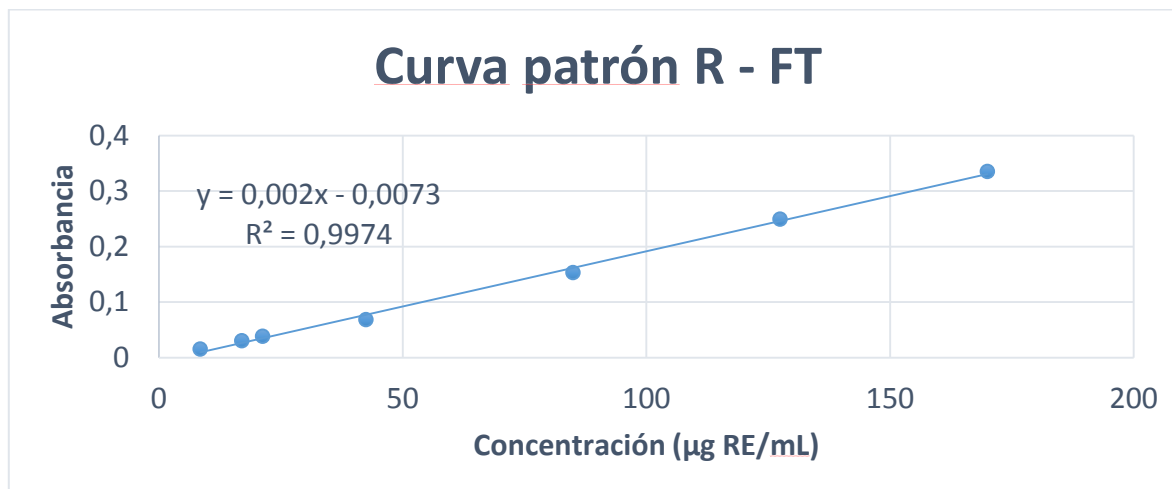
Para obtener el resultado en equivalentes Ácido Gálico, se preparó una curva patrón. La metodología del análisis fue establecida previamente en el punto 5.3.3.





## ANEXO 5 – Curva patrón Rutina (R), flavonoides totales.

Para obtener el resultado en equivalentes Rutina, se preparó una curva patrón. La metodología del análisis fue establecida previamente en el punto 5.3.4.



## ANEXO 6 – Cálculos del análisis proximal (apartado 6.1.5.)

Los datos expuestos por Schmidt-Hebbel, et al. (1992) se encuentran en base húmeda, por lo tanto se realizaron cálculos matemáticos para obtenerlos en base seca (b.s.) y así hacerlos comparables con aquellos datos obtenidos en la presente tesis.

### II. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE ALIMENTOS CHILENOS (cont. 12)

NOMBRE ALIMENTOS	N° Muestras	g/100 g parte comestible								mg/100 g parte comestible							
		Calorías	Humedad	Proteínas (N x 6,25)	Lípidos	E.N.N.* (por dif.)	Fibra cruda	Cenizas	Calcio	Fósforo	Hierro	Sodio	Potasio	Tiamina	Riboflavina	Niacina	Ácido ascórbico Total
<b>Frutas Deshidratadas</b>																	
10.26 Higo	10	250	24,0	3,8	1,1	63,3	5,2	2,6	180	71	2,7	-	-	0,09	0,08	0,7	2,3
10.27 Huesillo cocido	10	30	92,2	0,4	1,1	5,5	0,4	0,4	14	11	0,4	-	-	0,04	0,03	0,6	-
10.28 Pasa	10	259	25,5	1,8	0,6	68,9	1,7	1,5	64	58	1,3	-	-	0,12	0,07	0,3	7,7
<b>Frutas Autóctonas (64)</b>																	
10.29 Arrayán	-	78	79,0	1,3	1,7	16,6	0,6	0,8	78	36	8,0	-	228	-	-	-	-
10.30 Boldo	-	81	76,5	0,9	tr.	21,6	0,3	0,7	21	28	52,6	-	300	-	-	-	-
10.31 Corcolón	-	90	75,6	1,4	3,0	16,7	2,4	0,9	67	47	9,6	-	308	-	-	-	-
10.32 Maqui	-	150	56,4	0,8	tr.	40,8	0,8	1,2	87	44	30,5	-	296	-	-	-	-
10.33																	

Primero, se calculó el porcentaje de materia seca (M.S.) en el fruto:

$$\text{Materia seca (M.S.)} = 100 - \% \text{Humedad}$$

$$M.S. = 100 - 56,4 = 43,6\%$$

Con dicho dato se procede a re calcular en base seca (b.s.) utilizando el contenido de materia seca del liofilizado de 99,26 g:

$$\text{Proteínas} \rightarrow \frac{43,6 \text{ g M.S.}}{0,8 \text{ g P}} = \frac{99,26 \text{ g M.S.}}{x} \rightarrow x = 1,82 \text{ g P (b.s.)}$$

$$\text{E.N.N.} \rightarrow \frac{43,6 \text{ g M.S.}}{40,8 \text{ g E.N.N.}} = \frac{99,26 \text{ g M.S.}}{x} \rightarrow x = 92,89 \text{ g E.N.N. (b.s.)}$$

$$\text{Fibra cruda} \rightarrow \frac{43,6 \text{ g M.S.}}{0,8 \text{ g F.c.}} = \frac{99,26 \text{ g M.S.}}{x} \rightarrow x = 1,82 \text{ g F.c. (b.s.)}$$

$$\text{Cenizas} \rightarrow \frac{43,6 \text{ g M.S.}}{1,2 \text{ g Ce}} = \frac{99,26 \text{ g M.S.}}{x} \rightarrow x = 2,73 \text{ g Ce. (b.s.)}$$

Con ayuda de la tabla expuesta anteriormente, se estimarán las cantidades de Carbohidratos (HdeC) y Fibra soluble (FS) utilizando los valores conocidos de energía, proteínas y lípidos, en base húmeda (b.h.):

$$\text{Energía} = \text{Proteínas} \times 4 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} + \text{Carbohidratos} \times 4 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} + \text{Lípidos} \times 9 \frac{\text{kcal}}{\text{g}}$$

$$150 \text{ kcal} = \left[ \left( 0,8 \text{ g} \times 4 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} \right) + \left( \text{HdeC} \text{ g} \times 4 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} \right) + \left( 0 \text{ g} \times 9 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} \right) \right]$$

$$\text{HdeC} = 36,7 \text{ g (b.h.)}$$

Aquel valor ya estimado se transforma a base seca:

$$\text{HdeC} \rightarrow \frac{43,6 \text{ g M.S.}}{36,7 \text{ g HdeC}} = \frac{99,26 \text{ g M.S.}}{x} \rightarrow x = 83,55 \text{ g HdeC (b.s.)}$$

Para conocer la cantidad de FS, se utilizan los valores ya determinados de E.N.N. y Carbohidratos:

$$\text{E.N.N.} = \text{FS} + \text{HdeC}$$

$$\text{FS} = 92,89 - 83,55 \rightarrow 9,34 \text{ g FS (b.s.)}$$

Con el valor de FS recién calculado, y el valor conocido de Fibra cruda (FC) que representa la porción insoluble en agua compuesta principalmente por carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina), se puede estimar el valor de Fibra dietaria total (FDT)

$$\text{FDT} = \text{FS} + \text{FI} \rightarrow 9,34 \text{ g} + 1,82 \text{ g} \rightarrow 11,16 \text{ g FDT (b.s.)}$$

Finalmente, se calculó la energía en base seca:

$$\text{Energía} = \left[ \left( 1,82 \text{ g} \times 4 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} \right) + \left( 83,55 \text{ g} \times 4 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} \right) + \left( 0 \text{ g} \times 9 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} \right) \right]$$

$$\text{Energía} = 341,48 \text{ kcal (b.s.)}$$

Por otro lado, se calcularon teóricamente las cantidades de E.N.N. y Carbohidratos del análisis realizado en la presente tesis. Para ello:

$$E.N.N. = 100 - (\% \text{Humedad} + \% \text{Proteínas} + \% \text{Lípidos} + \% \text{Fibra cruda} + \% \text{Cenizas})$$

$$E.N.N. = 100 - (0,74 + 1,82 + 0,9 + 1,82 + 1,44) \rightarrow 93,28 \text{ g E.N.N. (b.s.)}$$

La cantidad de Carbohidratos se estimó de la misma forma anterior:

$$E.N.N. = FDT + HdeC$$

$$HdeC = 93,28 - 30,47 \rightarrow 62,81 \text{ g HdeC (b.s.)}$$

Para conocer la energía se procedió de la siguiente manera:

$$\text{Energía} = \left[ \left( 1,82 \text{ g} \times 4 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} \right) + \left( 62,81 \text{ g} \times 4 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} \right) + \left( 0,9 \text{ g} \times 9 \frac{\text{kcal}}{\text{g}} \right) \right]$$

$$\text{Energía} = 266,62 \text{ kcal (b.s.)}$$

**ANEXO 7 – Análisis estadístico de los films elaborados. Análisis de varianza (ANOVA de una cola) y prueba de Múltiples Rangos de Tukey.**

c. Análisis capacidad antioxidante por DPPH (apartado 6.2.1.)

**Tabla ANOVA para DPPH por Muestras**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,5476	1	0,5476	18,69	0,0496
Intra grupos	0,0586	2	0,0293		
Total (Corr.)	0,6062	3			

### Pruebas de Múltiple Rangos para DPPH por Muestras

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	2	2,06	X
2	2	2,8	X

d. Análisis capacidad antioxidante por FRAP (apartado 6.2.1.)

### Tabla ANOVA para FRAP por Muestras

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	84,7828	2	42,3914	102,25	0,0017
Intra grupos	1,24375	3	0,414583		
Total (Corr.)	86,0266	5			

### Pruebas de Múltiple Rangos para FRAP por Muestras

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	2	0,165	X
2	2	4,265	X
3	2	9,355	X

c. Análisis capacidad antioxidante por FIC (apartado 6.2.1.)

### Tabla ANOVA para FIC por Muestras

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9,8517	2	4,92585	0,24	0,7992
Intra grupos	61,1065	3	20,3688		
Total (Corr.)	70,9582	5			

### Pruebas de Múltiple Rangos para FIC por Muestras

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	2	108,045	X
3	2	109,995	X
2	2	111,15	X

d. Análisis contenido de polifenoles totales (apartado 6.2.2.)

### Tabla ANOVA para CPT por Muestras

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	70,8127	2	35,4063	70,31	0,0030
Intra grupos	1,5107	3	0,503567		
Total (Corr.)	72,3234	5			

### Pruebas de Múltiple Rangos para CPT por Muestras

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	2	0,045	X
2	2	4,745	X
3	2	8,44	X

e. Análisis contenido de flavonoides totales (apartado 6.2.3.)

### Tabla ANOVA para CFT por Muestras

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	585,646	2	292,823	168,72	0,0008
Intra grupos	5,2067	3	1,73557		
Total (Corr.)	590,852	5			

### Pruebas de Múltiple Rangos para CFT por Muestras

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	2	0,4	X
2	2	16,395	X
3	2	24,125	X

f. Análisis actividad antimicrobiana (apartado 6.2.4.)

- Por muestra de film (q)

#### Tabla ANOVA para quitosano control por Muestras

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,1316	1	2,1316	263,16	0,0038
Intra grupos	0,0162	2	0,0081		
Total (Corr.)	2,1478	3			

### Pruebas de Múltiple Rangos para quitosano control por Muestras

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2	2	12,86	X
1	2	14,32	X

- Por muestra de film (q+maqui 0,5 %)

#### Tabla ANOVA para q+maqui 0,5 % por Muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	69,366	6	11,561	21,51	0,0004
Intra grupos	3,76215	7	0,53745		
Total (Corr.)	73,1281	13			

### Pruebas de Múltiple Rangos para q+maqui 0,5 % por Muestra

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2	2	14,655	X
3	2	16,82	XX
4	2	17,1	XX
6	2	19,125	XX
1	2	20,055	X
5	2	20,43	X
7	2	21,43	X

- Por muestra de film (q+maqui 1 %)

### Tabla ANOVA para q+maqui 1 % por Muestras

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	57,9402	6	9,6567	24,94	0,0002
Intra grupos	2,71055	7	0,387221		
Total (Corr.)	60,6507	13			

### Pruebas de Múltiple Rangos para q+maqui 1 % por Muestras

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2	2	17,075	X
3	2	18,59	XX
4	2	18,67	XX
1	2	21,03	XX
5	2	21,885	X
6	2	22,025	X
7	2	22,94	X

- Por microorganismo testeado (*Alcaligenes faecalis*) (apartado 6.2.4.)

#### Tabla ANOVA para *Alcaligenes faecalis* por Muestras

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,950625	1	0,950625	1,50	0,3448
Intra grupos	1,26405	2	0,632025		
Total (Corr.)	2,21468	3			

#### Pruebas de Múltiple Rangos para *Alcaligenes faecalis* por Muestras

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	2	20,055	X
2	2	21,03	X

- Por microorganismo testeado (*Serratia marcescens*)

#### Tabla ANOVA para *Serratia marcescens* por Muestras

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5,8564	1	5,8564	13,59	0,0664
Intra grupos	0,8621	2	0,43105		
Total (Corr.)	6,7185	3			

#### Pruebas de Múltiple Rangos para *Serratia marcescens* por Muestras

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	2	14,655	X
2	2	17,075	X



- Por microorganismo testeado (*Aeromonas hydrophila*)

**Tabla ANOVA para *Aeromonas hydrophila* por Muestras**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3,1329	1	3,1329	10,11	0,0863
Intra grupos	0,6196	2	0,3098		
Total (Corr.)	3,7525	3			

**Pruebas de Múltiple Rangos para *Aeromonas hydrophila* por Muestras**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	2	16,82	X
2	2	18,59	X

- Por microorganismo testeado (*Citrobacter freundii*)

**Tabla ANOVA para *Citrobacter freundii* por Muestras**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,4649	1	2,4649	12,17	0,0732
Intra grupos	0,405	2	0,2025		
Total (Corr.)	2,8699	3			

**Pruebas de Múltiple Rangos para *Citrobacter freundii* por Muestras**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	2	17,1	X
2	2	18,67	X

- Por microorganismo testeado (*Shewanella putrefaciens*)

**Tabla ANOVA para *Shewanella putrefaciens* por Muestras**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	64,4522	2	32,2261	116,75	0,0014
Intra grupos	0,82805	3	0,276017		
Total (Corr.)	65,2803	5			

**Pruebas de Múltiple Rangos para *Shewanella putrefaciens* por Muestras**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	2	14,32	X
2	2	20,43	X
3	2	21,885	X

- Por microorganismo testeado (*Pseudomonas fluorescens*)

**Tabla ANOVA para *Pseudomonas fluorescens* por Muestras**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	87,7716	2	43,8858	54,98	0,0043
Intra grupos	2,3945	3	0,798167		
Total (Corr.)	90,1661	5			

**Pruebas de Múltiple Rangos para *Pseudomonas fluorescens* por Muestras**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	2	12,86	X
2	2	19,125	X
3	2	22,025	X

- Por microorganismo testeado (*Achromobacter denitrificans*)

**Tabla ANOVA para *Achromobacter denitrificans* por Muestras**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2,2801	1	2,2801	39,45	0,0244
Intra grupos	0,1156	2	0,0578		
Total (Corr.)	2,3957	3			

**Pruebas de Múltiple Rangos para *Achromobacter denitrificans* por Muestras**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestras</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	2	21,43	X
2	2	22,94	X