



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Estudio del efecto de diferentes mezclas solventes etanol-metanol-acetona/agua sobre la extracción de antocianinas-flavonoides a partir de bayas de Murta y evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos

Tesis para optar al título de Ingeniera en Alimentos

Carolina Andrea Busch Carvajal

Financiado por Proyecto Fondecyt Regular 1210429

Profesor Patrocinante y Director de Tesis

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

Co-directora de Tesis

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

Índice

Resumen	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. Objetivos	17
General	17
Específicos.....	17
3. Materiales y Métodos	18
3.1. Material Vegetal	18
3.2 Reactivos Químicos	18
3.3 Métodos	19
3.3.1 Diseño experimental.....	19
3.3.2 Estimación de la polaridad de los solventes en la solución.....	19
3.3.3 Extractos de Murta con tres distintos solventes.....	20
3.3.4- Rendimiento de extracción.....	21
3.3.5.- Contenido de humedad de los extractos.....	21
3.3.6.- Actividad de agua.....	22
3.3.7.- Contenido de Antocianinas y flavonoides mediante HPLC.....	22
3.3.8.- Capacidad antioxidante.....	23
3.3.9 Análisis estadístico.....	27
4. Resultados y discusión	28
4.1 Polaridad mezcla solventes	28
4.2 Caracterización extractos mediante Aw, Humedad y rendimiento para los distintos solvente	29
4.3 Concentración de antocianinas y flavonoides de los extractos de murta mediante HPLC..	31
4.4 Capacidad antioxidante mediante técnica ABTS Y ORAC para extractos de murta	37
5. Conclusiones	44
6. Referencias	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Principales flavonoides encontrados en fruta de murta mediante HPLC/ESI-MS.	8
Tabla 2 Principales antocianinas encontrados en extracto de murta mediante HPLC/ESI-MS.	8
Tabla 3 Clasificación de los ensayos según su modo de reacción (ET o HAT)	14
Tabla 4 Características de extracción [rendimiento y contenido de fenoles totales] en extractos de murta. Extracción en equipo Soxhlet.	16
Tabla 5 Tabla Diseño experimental aleatorio obtenido para el estudio	19
Tabla 6 Tabla resumen de la denominación de los extractos y su respectiva proporción de solvente	20
Tabla 7 Condiciones de gradiente equipo HPLC	22
Tabla 8 Caracterización extractos murta para distintos solventes	29
Tabla 9 . Concentración de flavonoides (mg eq quercetina-3-glucósido/ml) y Antocianinas (mg eq cianidina-3-glucósido/ml) obtenidos en extractos liofilizados de murta para distintas mezclas de solventes	33
Tabla 10 Comparación concentración flavonoides y antocianinas con otros autores.	35
Tabla 11.- Comparación de contenido de flavonoides y antocianinas con otros berries chilenos	36
Tabla 12. Comparación valores ORAC [umol trolox eq/g extracto] para murta con otros autores y con otros berries	38
Tabla 13. Tabla resumen para Orac, Rendimiento, Antocianinas, Flavonoides y Tipo de solvente según la FDA para cada extracto	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Efecto de la alimentación en la EII (Enfermedad inflamatoria intestinal)	9
Figura 2 Imagen del fruto y árbol de la murta o murtila	10
Figura 3 Imagen de la murta (Panguipulli, Los Ríos, Chile)	10
Figura 4 Estructura química de (A) Quercetina 3-O-glucósido y (B) Delfinidina 3-O-glucósido	12
Figura 5 Contenido de fenoles totales vs % inhibición del radical DPPH (5ppm) para 7 ecotipos evaluados de <i>U. molinae</i>	13
Figura 6. Mecanismos de reacción por Transferencia de electrones y Transferencia de átomos de hidrógeno.	14
Figura 7 Esquema resumen del proceso de obtención de extractos de murta	21
Figura 8 Esquema resumen ensayo ORAC	25
Figura 9 Esquema resumen ensayo ABTS	27
Figura 10 Polaridad relativa de las mezclas de solventes a distintas concentraciones.	28
Figura 11 Prueba de múltiples rangos para rendimiento por tipo de solvente (A) Y por porcentaje de solvente (B)	30
Figura 12 Cromatograma obtenido para Antocianinas mediante HPLC.	32
Figura 13 Cromatograma obtenido para flavonoides mediante HPLC	33
Figura 14 Extracción flavonoides mg eq-quercetina-3-glucósido/ml con respecto a la polaridad del solvente	35
Figura 15 Capacidad antioxidante mediante método ORAC [$\mu\text{mol trolox eq/g m.s.}$].	38
Figura 16 Capacidad antioxidante mediante método ABTS [%] de los extractos para tres solventes al 80% y 50%	39
Figura 17 Interacción.entre %ABTS y tipo de solvente	40
Figura 18 Capacidad antioxidante mediante ORAC (A) y ABTS (B) con respecto a la polaridad relativa del solvente	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: Acetona

CD: Enfermedad de Crohn

EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal

ET: Etanol

GAE: Equivalente ácido gálico

ME: Metanol

M.f: Masa fresca

M.s: Masa seca

Mu: Murta

TE: Trolox equivalente

UC: Colitis Ulcerativa

Summary

IBD consists of a group of inflammatory diseases that include the small intestine and colon. The main ones are UC and CD. The causes of this disease are still unknown, with diet playing an important role in the development of this disease. One of the alternatives for its treatment is the use of phenolic compounds which have anti-inflammatory, anticancer and antioxidant properties. Murta corresponds to an endemic shrub species that grows in southern Chile, contains anti-inflammatory properties and has been used to treat diabetes. The aim of this study was to find the best solvent mixture for the greatest obtaining of flavonoids and anthocyanins quantified by HPLC and the greatest antioxidant capacity by ORAC and ABTS. Extracts were made with three solvents (Ethanol, Methanol and Acetone) at concentrations of 50 and 80% in water, which were characterized by yield (%), flavonoid content (mg eq-quercetin-3-glucoside/g d.m) and anthocyanins content (mg eq-cyanidin-3-glucoside/g d.m) and antioxidant capacity by ORAC ($\mu\text{molTE/g d.m}$) and ABTS (%) method. There were no significant differences for yield, the values were between 28-39%. Regarding flavonoids and anthocyanins, the highest value was obtained with 50% methanol, with values of 2,44 mg eq-quercetina-3-glucósido (ml and 0,17 mg eq-cyanidine-3-glucósido/ml with no significant differences between the three solvents. For antioxidant capacity, there were significant differences for ABTS, the best value was obtained with 80% acetone. ORAC had no significant differences but the highest value was 317 $\mu\text{mol TE/g d.m}$ for 50% ethanol. In conclusion, an extract with a high antioxidant capacity and high content of anthocyanins and flavonoids could be obtained with the three solvents under study, with 50% ethanol being the one that obtained the highest value in antioxidant capacity

Resumen

La EII consiste en un conjunto de enfermedades inflamatorias que incluyen el intestino delgado y el colon. Los principales son la UC y CD. Las causas de esta enfermedad aún son desconocidas, siendo la dieta un rol importante en el desarrollo de esta enfermedad. Una de las alternativas para su tratamiento es el uso de compuestos fenólicos los cuales poseen propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes. La murta corresponde a una especie arbustiva endémica que crece en el sur de Chile, contiene propiedades antiinflamatorias y ha sido utilizado para tratar diabetes. En este trabajo se quiso estudiar la mejor mezcla de solvente para la mayor obtención de flavonoides y antocianinas cuantificadas por HPLC y la mayor capacidad antioxidante mediante ORAC y ABTS.

Se realizaron extractos con tres solventes (Etanol, Metanol y Acetona) a concentraciones de 50 y 80% en agua, los cuales fueron caracterizados mediante rendimiento, cantidad de flavonoides (mg eq-quercetina-3-glucósido/g m.s) y antocianinas (mg eq-cianidina-3-glucósido/g m.s), capacidad antioxidante ORAC (umol TE/g m.s) y ABTS (%).

No hubieron diferencias significativas para rendimiento, los valores estuvieron entre 28-39%. En cuanto a flavonoides y antocianinas, el valor más alto se obtuvo con metanol al 50% los cuales fueron de 2,44 mg eq-quercetina-3-glucósido/ml y 0,17 mg eq-cianidina-3-glucósido/ml, no habiendo diferencias significativas entre los tres solventes. Para capacidad antioxidante si hubieron diferencias significativas para ABTS en donde el mejor valor se obtuvo con acetona al 80%, a diferencia de ORAC ya que no hubieron diferencias significativas pero el valor más alto fue de 317 umol TE/g m.s para etanol al 50%.

En conclusión se pudo obtener un extracto con una alta capacidad antioxidante y alto contenido de antocianinas y flavonoides con los tres solventes en estudio, siendo el etanol al 50% el que obtuvo valor más alto en capacidad antioxidante.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) consiste en un conjunto de enfermedades inflamatorias que incluyen el intestino delgado y el colon. Los principales son la colitis ulcerativa (UC) y la enfermedad de Crohn (CD) (Bruner et al., 2023). La primera se caracteriza por la inflamación superficial continua localizada en el colon y el recto, la segunda por lesiones intestinales con inflamación transmural que pueden ocurrir en cualquier parte del tracto gastrointestinal.

A nivel mundial, se observa que esta enfermedad es más prominente en América del Norte en donde se reporta 6 a 23 casos por 100.000 habitantes para enfermedad de Crohn y 8 a 23 casos por 100.000 habitantes para colitis ulcerosa con una alta prevalencia reportándose 98 a 318 casos por 100.000 habitantes para CD y 139 a 286 casos por 100000 habitantes para UC (Slimming, 2019).

Existen pocos datos de esta enfermedad en Chile, sin embargo un estudio realizado indica que en la región Metropolitana de Chile un 28,6% de la población indicó síntomas para IBD mediante los criterios de Roma II (Madrid-Silva et al., 2013)

Las causas de esta enfermedad aún son desconocidas, los investigadores han llegado a la hipótesis de que es el resultado de la interacción entre susceptibilidad genética y las exposiciones ambientales. Dentro de estos últimos la dieta tiene un rol importante en el desarrollo de esta enfermedad ya que es fundamental en la composición de la microbiota intestinal, y además se ha demostrado que la composición de la dieta regula las funciones de las barreras de las mucosas, un factor crucial en la patogénesis de EII. (Cavalcante et al., 2020). El manejo de esta enfermedad requiere de prolongadas intervenciones con fármacos que producen efectos adversos y puede agravar la calidad de vida de los pacientes, es por esto que se ha estudiado el uso de terapias alternativas. Dentro de estas alternativas se ha estudiado el uso de fitoquímicos para la prevención de EII. Los fitoquímicos corresponden a un grupo de compuestos químicos producidos como metabolitos por las plantas, dentro de este grupo los más prometedores corresponden a los polifenoles, lignanos, terpenoides, y alcaloides .

Desde el punto de vista clínico se define el índice de la actividad de la enfermedad (DAI, su sigla en inglés), el DAI es el promedio total del cambio de porcentaje de peso corporal, consistencia de las heces, sangrado y prolapso rectal.

En una revisión reciente se han evaluado 64 fitoquímicos de diferentes estructuras químicas, dentro de ellos 34 dieron resultado positivo al DAI. Dentro de estos 34, 19 pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos, es decir 2/3 de todos los fitoquímicos evaluados. Los compuestos fenólicos corresponden a un grupo de compuestos químicos que incluyen principalmente a los flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos, y taninos. Estos se encuentran presentes en frutas y vegetales como manzanas, berries, uvas, y zanahoria. Poseen propiedades antiinflamatorias, anti carcinógenas y antioxidantes (Hossen et al., 2020).

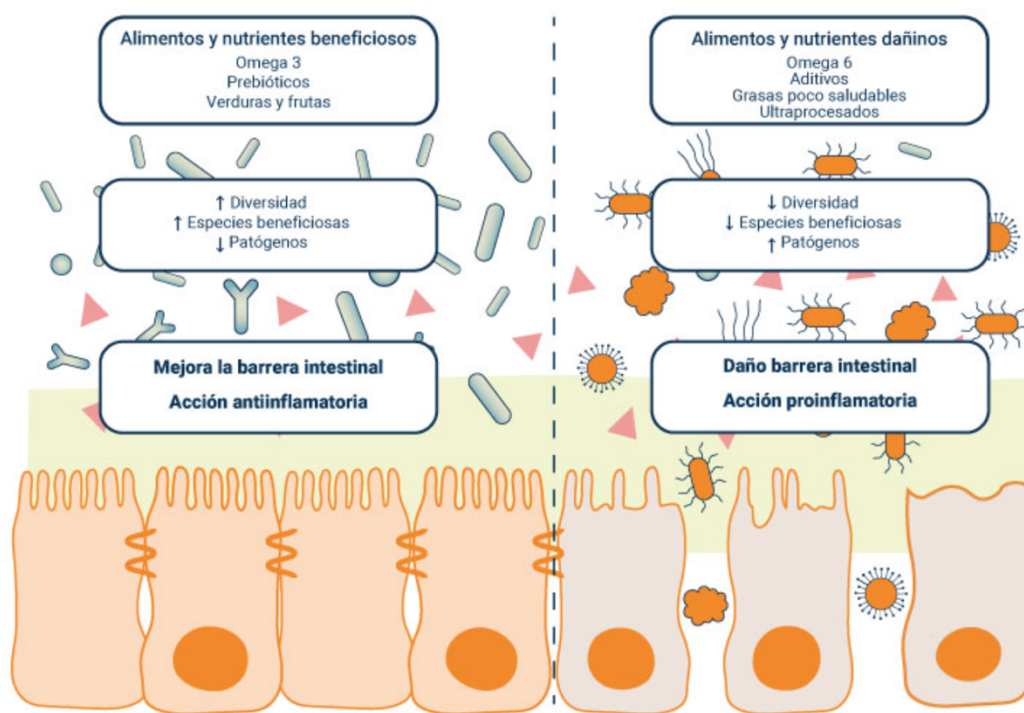


Figura 1. Efecto de la alimentación en la EII (Enfermedad inflamatoria intestinal) Fuente: (Nutribiotica, s.f)

El consumo de berries se ha vuelto importante los últimos años debido al contenido de compuestos fenólicos que contienen, incluida la murta que ha mostrado ser una buena fuente polifenoles antioxidantes.

La murta o murtila (*Ugni molinae* Turcz.) corresponde a una especie arbustiva endémica de Chile, es un arbusto de 1,8 m de altura de gran follaje que crece en el sur de Chile. Ha sido



Figura 2. Imagen del fruto y árbol de la murta o murtila



Figura 3. Imagen de la murta (Panguipulli, Los Ríos, Chile)

utilizadas a lo largo del tiempo como una planta medicinal, el fruto ha sido utilizado para tratar desórdenes digestivos, inflamaciones, diabetes e infecciones urinarias. Estas propiedades se deben al contenido de compuestos fenólicos que se encuentran en la murta

(Cabrera-Barjas et al., 2020). Se distinguen tres clases de compuestos fenólicos en la murta: ácidos fenólicos, flavonoides y taninos, siendo el compuesto quercetina 3-β-D-glucósido el más predominante (55,88 mg/100 g masa seca) correspondiendo a un 75,4% de los compuestos identificados, el ácido gálico es también uno de los compuestos fenólicos predominantes (López et al., 2021). En cuanto a las antocianinas se ha encontrado en mayor concentración la delfinidina-3-O-glucósido (73%). Estos compuestos principalmente contribuyen a la capacidad antioxidante total en berries por su habilidad para donar átomos de hidrógenos y atrapar el electrón desapareado (López et al., 2021).

Tabla 1. Principales flavonoides encontrados en fruta de murta mediante HPLC/ESI-MS

Fuente	Compuesto	Contenido [mg/100 g m.s]
Fruta Murta	Quercetina	0,66
Fruta Murta	Kaempferol	0,84
Fruta Murta	Quercetina-3-O-glucósido	157,17
Fruta Murta	Miricetina	14,07

Fuente:(López et al., 2021)

Tabla 2. Principales antocianinas encontrados en extracto de murta mediante HPLC/ESI-MS.

Fuente	Compuesto	Porcentaje en el extracto [%]
Fruta Murta	Delfinidina 3-O-glu	73
Fruta Murta	Petunidina 3-O-glu	5
Fruta Murta	Peonidina 3-O-glu	3
Fruta Murta	Malvidina 3-O-glu	0,1
Fruta Murta	Cianidina 3-O-glu	4,3
Fruta Murta	Cianidina 3-O-gal	2,6
Fruta Murta	Delfinidina 3-O-ara	10,0
Fruta Murta	Pelargonidina 3-O-ara	1,0
Fruta Murta	Cianidina 3-O-ara	1,0
Fruta Murta	Peonidina-malvidina 3 O-glu	3,0

Fuente: (Junqueira-Gonçalves et al., 2015)

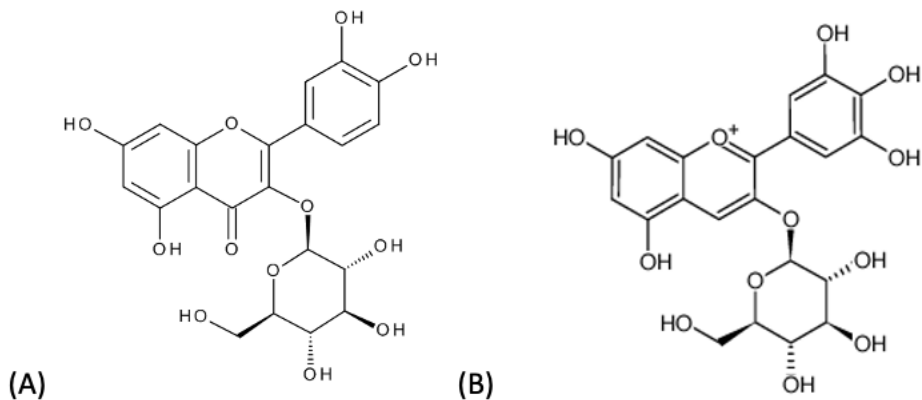


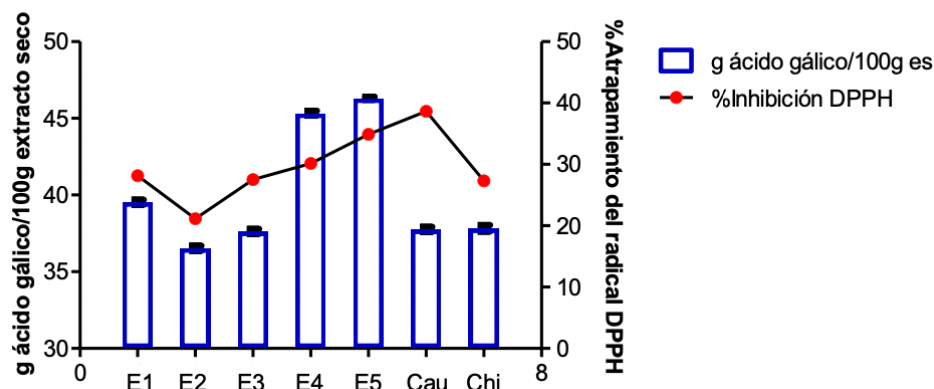
Figura 4. Estructura química del principal flavonoide (A) Quercetina 3-O-glucósido y antocianina (B) Delfinidina 3-O-glucósido presente en bayas de murta

En la tabla 1 podemos observar los principales flavonoides encontrados en murta, siendo los principales la quercetina glicosilada la más predominante, seguida de miricetina y kaempferol. En la tabla 2 podemos observar la presencia de antocianinas en extracto etanólico de la baya de murta, en donde la delfinidina 3-O-glu se encontró con mayor porcentaje (73%). Brito et al., 2014 Estudió el contenido de antocianinas en tres berries chilenos (Murtilla, Arrayán y Calafate) con valores de 6,9, 15,2 y 51,6 (mg cianidina-3-O-glucosido/ g m.s) respectivamente. La estructura química del principal flavonoide (A) y principal antocianina (B) presente en la murta se muestra en la figura 4.

Los niveles de antocianinas en murta comparado con otros berries como el calafate y el maqui es mucho menor, explicando el color rosado de esta fruta a diferencia del color negro y morado de los otros berries (López et al., 2021).

Estudios han demostrado el alto contenido de compuestos fenólicos en murta, con una cantidad de 32 $\mu\text{mol GAE/g m.f}$ o 6 mg GAE/g m.f mediante el método de Folin-Ciocalteu, a diferencia de la mora comercial que presentó 17 $\mu\text{mol GAE/g m.f}$ o 3,2 mg GAE/g m.f , sin embargo, otros estudios mostraron una cantidad de 9,2 mg GAE/g m.f , esto debido a que va a depender de la zona geográfica de donde se obtuvo la fruta (López et al., 2021). Piña, 2011 estudió la actividad antioxidante y fenoles totales en diversos extractos de Murta de diferentes localidades del Sur de Chile en donde se encontraron diferencias significativas en la capacidad antioxidante, ver figura 5 obteniéndose el mejor resultado para la murta de la región de los Ríos de la localidad de Queule.

Figura 5.- Contenido de fenoles totales vs % inhibición del radical DPPH (5ppm) para 7 ecotipos evaluados de *U. molinae*



Fuente: (Piña, 2011)

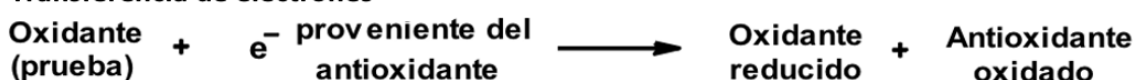
Distintas técnicas se utilizan para medir capacidad antioxidante, tales como ORAC y ABTS y DPPH.

La diferencia de estos tres métodos es la diferencia del tipo de radical libre que utilizan para ser neutralizado por los antioxidantes y si corresponden a ensayos basados en la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno, ver tabla 3 y figura 6. Además métodos como ABTS y DPPH no emplean especies radicales de significado biológico a diferencia de ORAC que utilizan radicales peróxido o hidroxilo que añade un significado biológico, ya que estas son las especies radicalarias más importantes a nivel fisiológico (Fernández et al., 2006) Estas especies cuando se encuentran en niveles elevados o también llamado estrés oxidativo dañan las proteínas, membranas y ácidos nucleicos a nivel celular y perturban el balance redox celular (Tovar, 2013). López et al., 2018 estudió la capacidad antioxidante en murta mediante distintos métodos en donde se obtuvieron valores para ORAC entre 860-2380 (umol E.T/100g). Las desventajas del método DPPH es que el radical es de larga vida por lo que no guarda similitud con los radicales peróxido altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica (Tovar, 2013).

Tabla 3. Clasificación de los ensayos según su modo de reacción (ET o HAT)

ENSAYO	CATEGORÍA
Acido 2,2'-azino-bis-3- etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)	Ensayo basado en la transferencia de electrones (ET)
1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH)	
Capacidad absorción del radical oxígeno (ORAC) 2,2'-azobis-(2- amidinopropanohidroclorida) (AAPH)	Ensayo basado en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)

Transferencia de electrones



Transferencia de átomos de hidrógeno

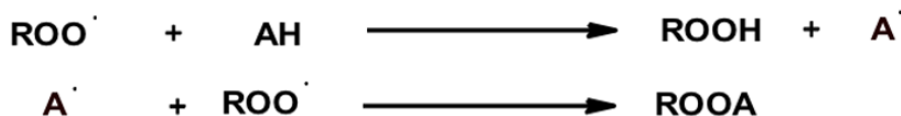


Figura 6. Mecanismos de reacción por Transferencia de electrones y Transferencia de átomos de hidrógeno.

Debido a que los compuestos bioactivos de la murta no se encuentran disponibles durante todo el año, es decir, solamente de marzo a mayo, la extracción y secado de estos compuestos es una buena alternativa para poder preservar sus propiedades benéficas.

Estudios han mostrado que la retención de los compuestos polifenólicos y la capacidad antioxidante va a depender de la técnica aplicada (Alfaro et al., 2014).

Alfaro et al., 2014 estudió dos métodos de secados (liofilización y secado por convección con aire caliente a 65 y 80°C) en el contenido total de polifenoles y de antocianinas. Se observó que el método de liofilización obtuvo los mejores resultados manteniendo un mayor

contenido de estos compuestos debido al cambio en la pared celular y la degradación química asociada al congelamiento y sublimación, pudiendo haber una mayor extracción de esos compuestos. Además estudió la actividad antioxidante mediante DPPH y ABTS obteniéndose mejores resultados para ambos métodos con la liofilización.

Existen distintos tipos de extracción, sin embargo la extracción sólido-líquido corresponde a la técnica más comúnmente reportada. Se basa en el transporte de masa, en donde los analitos contenidos en una matriz migran a una fase de solvente que está en contacto con la matriz. Los factores que afectan a la extracción son el método de extracción, tipo de disolvente, tamaño de partícula, temperatura y tiempo de extracción (D'Amario, 2018).

Se ha descrito que los solventes más adecuados para la extracción de compuestos fenólicos corresponden a metanol, etanol y acetona (siendo la acetona el menos polar y el metanol el más polar) según un estudio realizado por (Rezaie et al., 2015), en donde la acetona pudo extraer mayoritariamente fenoles no glicosilados a diferencia de metanol y etanol los cuales extrajeron tanto no glicosilados como glicosilados. Sin embargo, se han visto mejores resultados en cuanto a la cantidad de polifenoles totales extraídos cuando el solvente orgánico es mezclado con agua al 50% a diferencia de los sistemas de solvente mono componente en distintos extractos tanto de hojas y frutos encontrados en literatura debido a la mayor polaridad que da con respecto a algunos compuestos fenólicos como los flavonoides glicosilados los cuales no pueden ser extraídos con solventes orgánicos puros ((Hauser et al., 2014; Liberal et al., 2022)). En la tabla 4 podemos observar tres condiciones de solvente para extraer murta, el mejor rendimiento se obtuvo con 100% de MeOH, sin embargo el mejor resultado para fenoles totales se obtuvo con la mezcla MeOH-Agua (60/40). Se ha descrito que la presencia de agua en la mezcla aumenta la permeabilidad del tejido celular, permitiendo una mejor transferencia de masa y una mayor recuperación de compuestos solubles en agua (D'Amario, 2018).

Tabla 4. Características de extracción [rendimiento y contenido de fenoles totales] en extractos de murta. Extracción en equipo Soxhlet.

Muestra Especie	Solvente extracción	Rendimiento [%]	Fenoles totales [mg EAG/g m.s]
<i>U. molinae</i>	MeOH 100%	37,9	5,89
	MeOH 60%-H ₂ O 40%	16,3	6,65
	H ₂ O 100%	11,4	6,08

Fuente:(Avello et al., 2009)

La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos, clasifica a los solventes en tres clases de acuerdo a la toxicidad.

Clase 1: Benceno, Tetracloruro de carbono, entre otros. Estos solventes no deben usarse como ingredientes dietéticos, fármacos debido a su toxicidad inaceptable.

Clase 2: Metanol, Hexano o Acetonitrilo, estos requieren de un manejo especial debido a su toxicidad.

Clase 3: Etanol, Acetona y Acetato de etilo pueden ser utilizados en alimentos bajo el marco de las buenas prácticas de manufactura, son reconocidos como GRAS (Generally Recognized as Safe).

En este trabajo se usaron mezclas con agua de solventes clase 2 (metanol) y clase 3 (etanol y acetona), con el objeto de encontrar la relación solvente/agua que permita obtener un alto rendimiento en masa de extracto, con un alto contenido de antocianinas y flavonoides y elevada capacidad antioxidante.

2. Objetivos

General

- Determinar la mezcla solvente que permita obtener un extracto de murta enriquecido en flavonoides y antocianinas, con un rendimiento en masa superior al 20% y con una capacidad antioxidante de al menos un 50% superior a la baya liofilizada

Específicos

- Realizar un diseño experimental que evalúa el efecto de mezclas de solventes (etanol, metano, acetona) en dos proporciones (50% y 80% respecto al agua) sobre tres variables de respuesta (rendimiento, actividad antioxidante, contenido de antocianinas y flavonoides)
- Implementación y validación de un método para determinar el contenido de antocianinas y flavonoides mediante HPLC
- Determinación de la capacidad antioxidante mediante técnicas ORAC y ABTS

3. Materiales y Métodos

3.1. Material Vegetal

Murta liofilizada adquirida por Isla Natura de Chiloé-Chile, se mantuvo almacenada en su envase original en un lugar seco y oscuro en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile

3.2 Reactivos Químicos

Los reactivos utilizados fueron cianidina-3-glucósido; quercetina-3-glucósido; acetonitrilo grado HPLC; 2,2-Azino-bis (3-etilbenzotizolina-6-sulfónico (ABTS); 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (TROLOX); 2,2'-Azobis [2-methylpropionamide]dihydrochloride (AAPH).

3.3 Métodos

3.3.1 Diseño experimental

El diseño experimental para el estudio fue de tipo factorial con 3 factores ((A) Berrie, (B) Solvente, (C) Concentración) con 1 replica. Se evaluaron 3 respuestas (Rendimiento en masa, [mg eq-quercetina-3-glucósido/ml extracto], [mg eq-cianidina-3-glucósido/ml extracto], ORAC [umol TE/g m.s], ABTS [%])

Los niveles por factores fueron:

A: 1 (Murta)

B: 3 (Etanol, Metanol, Acetona)

C: 2 (50 y 80%)

Tabla 5. Tabla Diseño experimental aleatorio obtenido para el estudio.

Corridas	A	B	C
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	1
4	1	3	2
5	1	2	1
6	1	1	2

3.3.2 Estimación de la polaridad de los solventes en la solución

Se calculó la polaridad de la mezcla de solventes con respecto a la polaridad del agua.

Se tomaron los valores teóricos de los tres solventes y se multiplicaron por la fracción molar de cada solvente en las mezclas (agua y solvente orgánico)

$$\text{Polaridad relativa} = (\text{Polaridad teórica del solvente orgánico} \times \text{Fracción molar} + \text{Polaridad teórica del agua} \times \text{Fracción molar})$$

Los resultados se expresan en una escala de 0 a 1 en donde el máximo corresponde a la polaridad del agua.

3.3.3 Extractos de Murta con tres distintos solventes

Para la obtención del extracto se pesaron 3 g de murta y se disolvieron en 30 ml de solvente. Los tres sistemas de solventes a utilizar fueron (metanol/agua, etanol/agua y acetona/agua) en distintas proporciones (20:80, 50:50 y 80:20) para cada mezcla. En la tabla 6 se puede ver la denominación asignada para cada muestra.

La mezcla se homogenizó con un Ultra-Turrax (homogeneizador IKA T-25; IKA. Staufen, Alemania) a 18.000 rpm durante 5 minutos. Se centrifugó a 3.000 rpm durante 7 min a 4°C y el sobrenadante se filtró con un filtro de 0,45 μ m (Durapore, PVDF Millipore, EE.UU) a una presión de 0,2 atm (20 kPa). El sobrenadante filtrado se llevó a un rotavapor R-205 (Büchi, RE-120, Suiza) hasta sequedad por 1 hora aproximadamente a 50°C. Al producto obtenido se le añadió 10 ml de agua mili-q para traspasarlo a un tubo falcon de 50 ml, teniendo la precaución de no llenar más de 1/3 del tubo y se almacenó a -20°C en oscuridad por un mínimo de 24 horas para luego ser liofilizado a -52°C por 3-4 días a 0,005 bar (500 kPa).

Tabla 6.- Tabla resumen de la denominación de los extractos y su respectiva proporción de solvente

Solvente	Concentración 80%	Concentración 50%
Metanol	Mu/Me:80	Mu/Me:50
Etanol	Mu/Et:80	Mu/Et:50
Acetona	Mu/Ac:80	Mu/Ac:50

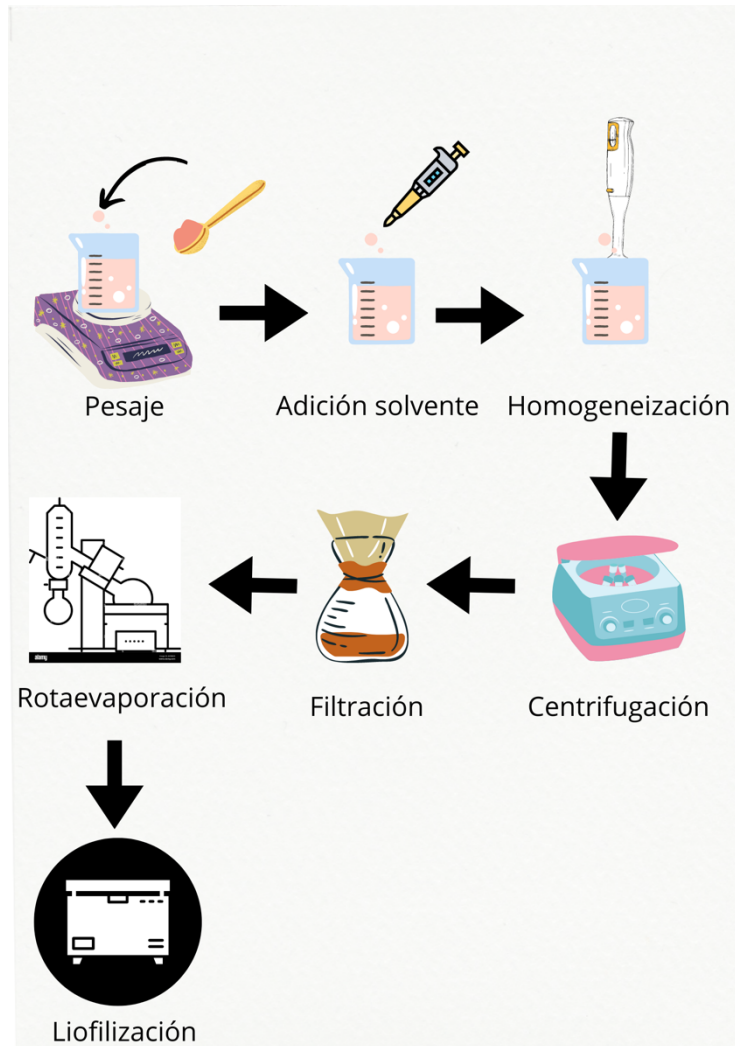


Figura 7. Esquema resumen del proceso de obtención de extractos de murta

3.3.4- Rendimiento de extracción

Se determina el rendimiento de la liofilización mediante diferencia de peso antes y después del proceso de liofilizado. Las mediciones se realizan por triplicado y los resultados se expresan como % con el valor medio \pm DE

$$\text{Rendimiento} = (\text{Peso Final} / \text{Peso Inicial}) \times 100$$

3.3.5.- Contenido de humedad de los extractos

Se pesa entre 20-30 mg del extracto liofilizado y se deja en estufa a 106°C por 24 horas. Luego se calcula la humedad por diferencia de peso. Las mediciones se realizan por triplicado y los resultados se expresan como % con el valor medio \pm DE

$$\text{Humedad} = (\text{Peso Final} / \text{Peso Inicial}) \times 100$$

3.3.6.- Actividad de agua

Se pesa aproximadamente 30 mg del extracto liofilizado y se mide en el equipo Aqualab (Serie 4TEV, Kansas, USA ; Los Cárpatos, Transilvania) a 25°C, las mediciones se realizan por triplicado y los resultados se expresan con el valor medio \pm DE

3.3.7.- Contenido de Antocianinas y flavonoides mediante HPLC

Para la caracterización del extracto de murta, se analizó las muestras según lo descrito por Genskowsky et al. (2016) para conocer la concentración de antocianinas y flavonoides presentes en los extractos

Preparación de muestra: La muestra liofilizada se prepara pesando aproximadamente 20 mg disuelto en una mezcla 50:50 de ácido acético y acetonitrilo, se inyectan 50 ul de muestra en el equipo.

Condiciones del método: El análisis se realizó en un equipo cromatógrafo (Waters, Alliance 2695), con una columna C18 con medidas de 250mm x 4,6 mm con un tamaño de poro de 5 micrones. La detección se realizó mediante arreglo de fotodiodo PDA 996 Waters.

Se realizó en un sistema de gradiente lineal como se ve en la tabla 2. Los compuestos polifenólicos se monitorearon a 280nm y las antocianinas se monitorearon a 525 nm. Se utilizó una fase móvil de Acido acético 1% (A) y Acetonitrilo (B), ver tabla 7 para condiciones de gradiente. El tiempo de corrida fue de 40 minutos a un flujo de 1ml/min con un volumen de inyección de 50 ul.

Tabla 7. Condiciones de gradiente equipo HPLC

Tiempo (minutos)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	0	100
2	0	100
15	20	80
20	30	70
30	40	60
37	40	60
38	0	100
40	0	100

Curva de calibración cianidina-3-glucósido: Se estableció una curva de calibración estándar ($R=0,99$) en donde se preparó una solución stock de cianidina-3-glucósido. Se disolvieron 0,733 mg de estándar en 0,5 ml de ácido acético. Luego de esto se diluyeron 0,2 ml del stock en 2 ml de ácido acético y desde esta última dilución se tomaron alícuotas de 0,1; 0,2; 0,4; 0,5 y 1 ml los cuales fueron trasladados a matraces ámbar de 5 ml y se completó el volumen de 1 ml con ácido acético 1%(v/v).

Curva de calibración quercetina-3-glucósido: Se estableció una curva de calibración estándar ($R=0,99$) en donde se preparó una solución stock de quercetina-3-glucósido. Se disolvieron 5 mg de estándar en 5 ml de solución (2,5 ml ACN + 1 2,5 HAc 1%) y desde esta última dilución se tomaron alícuotas de 0,02; 0,04; 0,06; 0,1; 0,16 y 0,2 los cuales fueron trasladadas a matraces ámbar completándose un volumen de 2 ml con ácido acético 1%.

El método fue lineal con un coeficiente de correlación y determinación de $R^2=0,9998$. El test de varianza mostró que el intercepto no fue significativo en 0 ($p=0,49$). De esta manera pasa por el origen. La desviación estándar relativa fue menor al 2,0% durante todo el rango de las concentraciones analíticas.

Se realizaron 6 muestras por experimento y 2 inyecciones por muestra. Los resultados se expresan en mg eq quercetina-3-glucósido/ml y mg eq cianidina-3-glucósido/ml como el valor medio \pm DE

3.3.8.- Capacidad antioxidante

Metodología ORAC

Preparación de reactivos: Se preparó una solución buffer fosfato 75 mM pesando 2,1187 g de Fosfato de sodio dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) y 0,5278 g de Fosfato de Sodio Dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Se llevó a volumen en un balón volumétrico de 250 ml. Se preparó una solución de Fluoresceína 30 nM preparando inicialmente una solución de fluoresceína 0,5 mM para llegar a 0,03 μM . Por último se preparó una solución de AAPH (2,2'-Azobis [2-methyl-propionamide]dihydrochloride) 96 mM pesando 130,17 mg y llevando a volumen de 5 ml de buffer fosfato

Desarrollo del método

Preparación del trolox: Se pesó 5 mg de trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), se disolvió con 1 ml de etanol y se llevó a balón volumétrico de 10 ml con

agua MiliQ. Se realizaron diluciones respectivas para la curva de trolox tomando 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 ul de la solución de trolox y llevar a volumen de 1 ml con la solución buffer.

Preparación de las muestras: Se pesó 10 mg de muestra liofilizada y se disolvió en 1 ml de solvente a la proporción correspondiente de cada muestra. Se tomaron 50 ul de la muestra disuelta y se disolvió en 1200 ul de la solución buffer de fosfato. Esta última solución se denominó (A). Esta solución (A) se diluyó en 100, 300 y 400 ul de buffer fosfato, como se muestra en la tabla

Procedimiento ensayo ORAC: En una placa (Flatblack 96 pocillos), se adicionó en orden, 150 ul de fluoresceína más 25 ul de la dilución respectiva de trolox en las primeras 3 columnas de la placa, dejando los 3 últimos pozos para el blanco en donde se agregan 25 ul de buffer fosfato. En los siguientes pozos se agregó 25 ul de las diluciones de muestras en su orden respectivo por triplicado. Se pre incubó por 25 min a 37°. Posterior a la incubación, se adicionó a cada pozo 25 ul de solución AAPH 96 mM. Finalmente se leyó la intensidad de la fluoresceína es medida cada 2 min durante 2 horas con longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm respectivamente en un lector de placas (Infinite M200 pro, TECAN). Los resultados se expresan en umol trolox eq/g como el valor medio \pm DE

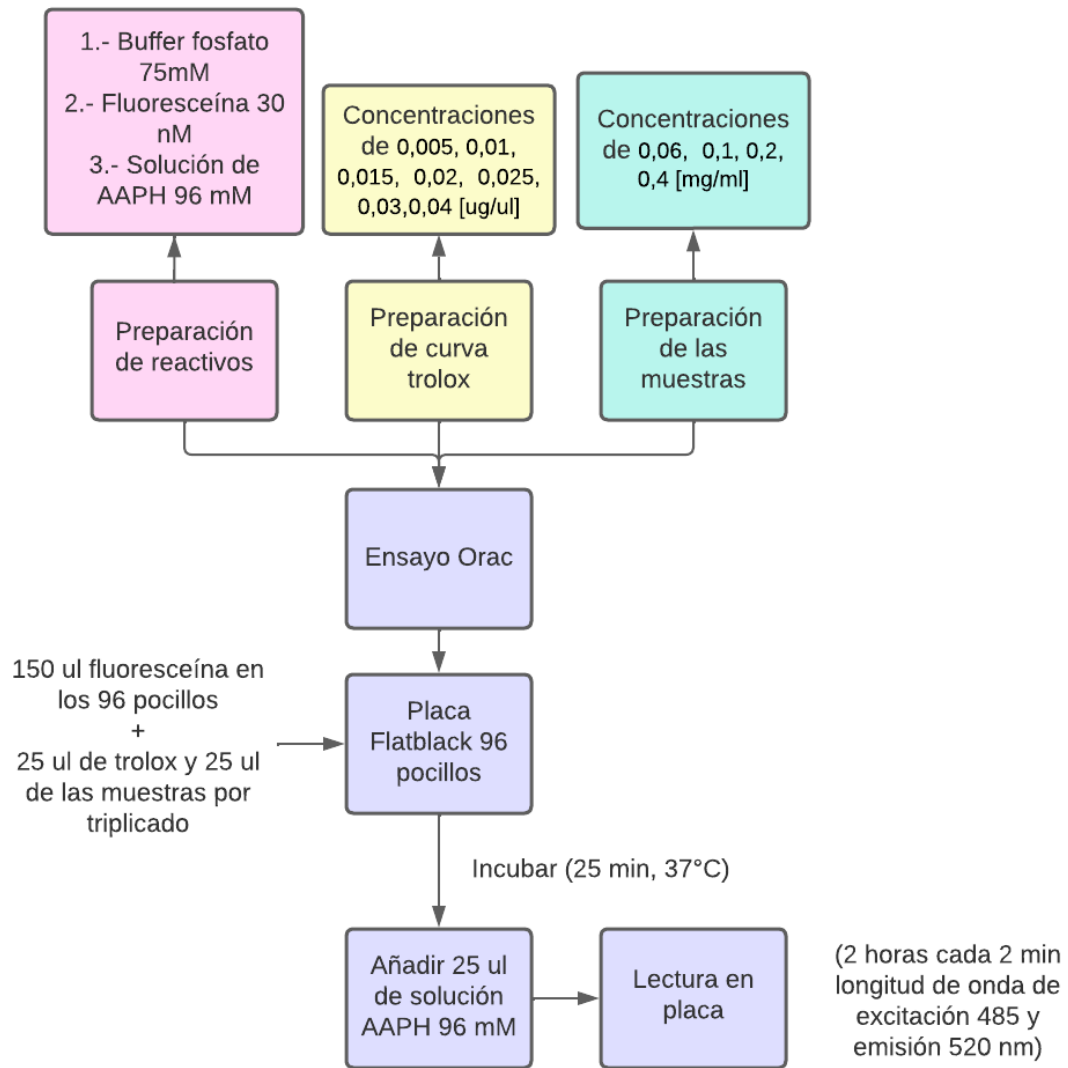


Figura 8 . Esquema resumen ensayo ORAC

Metodología ABTS

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

Preparación de las muestras: Se pesó 10 mg de muestra liofilizada y se disolvió en 1 ml de solvente a la misma proporción de la muestra original. Se realizó la dilución de la muestra de 10mg/ml a 0,5mg/ml tomando 50 ul de la muestra ya disuelta y agregando 950 ul de solvente a la misma proporción de la muestra original.

Procedimiento ABTS: Se colocó 20 ul de muestra en una placa (Flatblack 96 pocillos) por triplicado y 200 ul del radical ABTS activado, que fue incubado previamente por 7 min y leído a 734 nm en un lector de microplacas (Infinite M200 pro, TECAN).

Curva de calibración con trolox: Se pesaron 5 mg de trolox, se disolvieron en 1 ml de etanol y se llevó a balón volumétrico de 10 ml en agua MiliQ. Se tomaron 30, 70, 110, 150, 190, 230 y 270 ul de solución trolox y se diluyó hasta completar 1000 ul de solución con etanol al 20%. Se colocó 20 ul de solución trolox por triplicado y sobre eso 200 ul del radical ABTS activado, fue incubado por 7 min y leído a 734 nm en un lector de microplacas (Infinite M200 pro, TECAN). Los resultados se expresan en % como el valor medio \pm DE.

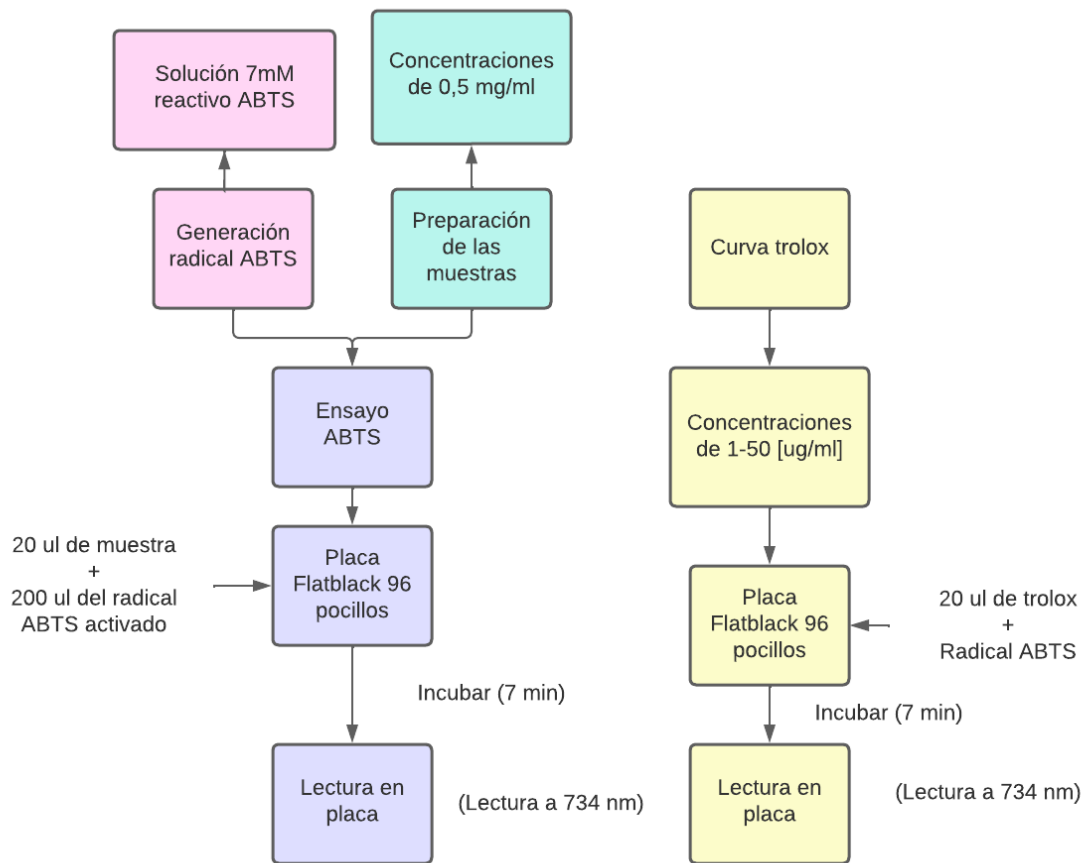


Figura 9. Esquema resumen ensayo ABTS

3.3.9 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante análisis ANOVA multifactorial usando el software STATGRAPHICS Centurion XV, versión II (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA)

Las respuestas usadas fueron ORAC [$\mu\text{mol eq-trolox}/100\text{g}$], Rendimiento [%], Concentración de Flavonoides y Antocianina [$\text{mg eq-quercetina-3-glucósido}/\text{g m.s.}$; $\text{mg eq-cianidina-3-glucósido}/\text{g m.s.}$], ABTS [%], Humedad [%] y Actividad de agua para los siguientes factores: Tipo de Solvente [Solvente 1, Solvente 2, Solvente 3] y Concentración [50 y 80%]

4. Resultados y discusión

4.1 Polaridad mezcla solventes

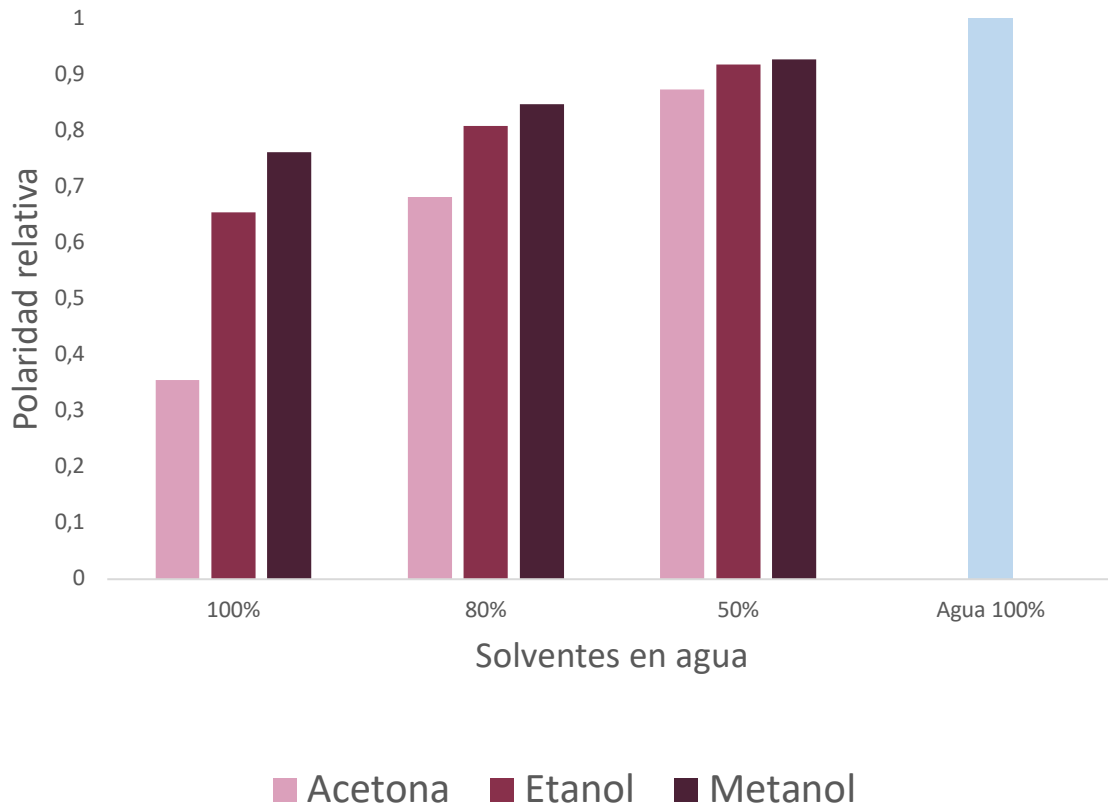


Figura 10. Polaridad relativa de las mezclas de solventes a distintas concentraciones

En la figura 10 podemos observar la polaridad relativa al agua para las distintas mezclas de solvente la cual se calculó como se señala en el punto 3.3.2 para etanol-agua, metanol-agua y acetona-agua al 80 y 50% y además para los solventes puros, es decir agua y el solvente orgánico. Para los tres solventes escogidos podemos ver que, al agregar agua al solvente orgánico puro, la polaridad va en aumento siendo la acetona el solvente menos polar y el metanol el solvente más polar dentro del estudio.

4.2 Caracterización extractos mediante Aw, Humedad y rendimiento para los distintos solvente

La caracterización de los extractos se realizó mediante el método descrito en el punto 4.2, 4.3 y 4.4

Tabla 8. Caracterización extractos murta para distintos solventes

Extracto	Polaridad relativa mezcla	Aw	Humedad (%)	Rendimiento (%)
Mu/Ac:50	0,87	0,29 ± 0,02 ^a	22,99 ± 2,14 ^a	38,57 ± 2,31 ^a
Mu/Ac:80	0,68	0,28 ± 0,04 ^a	25,11 ± 1,40 ^a	35,9 ± 3,3 ^a
Mu/Me:50	0,92	0,25 ± 0,00 ^a	21,30 ± 3,83 ^a	32,10 ± 0,29 ^a
Mu/Me:80	0,84	0,26 ± 0,03 ^a	23,85 ± 0,06 ^a	32,4 ± 5,2 ^a
Mu/Et:50	0,91	0,30 ± 0,01 ^a	21,45 ± 2,62 ^a	32,17 ± 3,92 ^a
Mu/Et:80	0,80	0,31 ± 0,03 ^a	21,40 ± 0,57 ^a	28,67 ± 3,44 ^a

Valores expresados como el promedio ± DS de las muestras. Mismas letras no indican diferencias significativas entre filas, $p < 0,05$

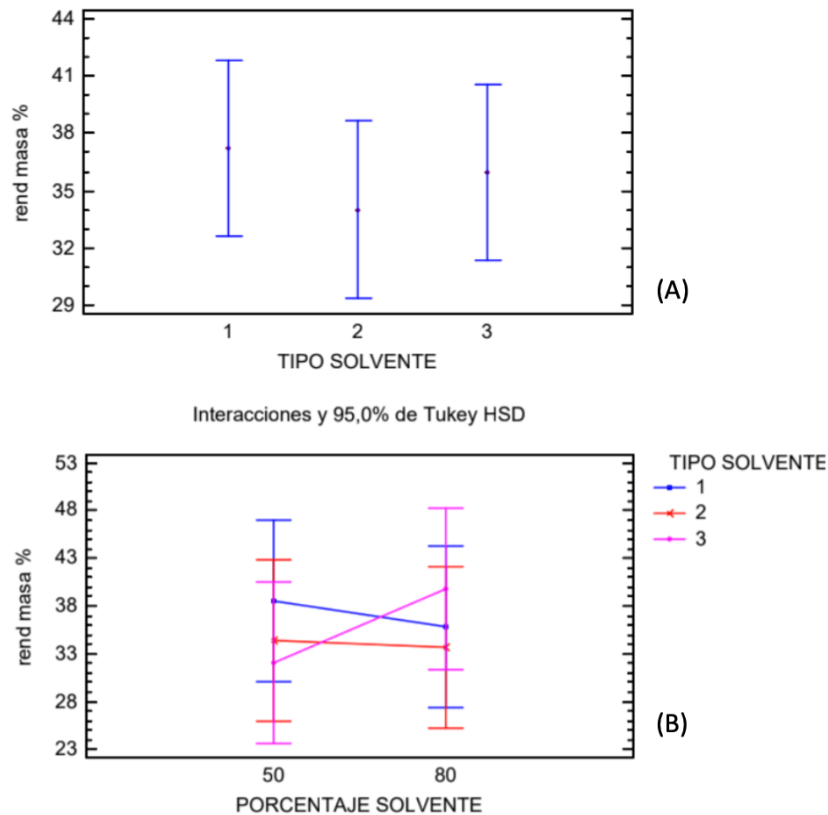


Figura 11.- Prueba de múltiples rangos para rendimiento por tipo de solvente (A) y por porcentaje de solvente (B)

En la tabla 8 podemos encontrar los resultados para actividad de agua, humedad y rendimiento para los extractos obtenidos con los distintas concentraciones de solvente.

En cuanto al rendimiento de la extracción, se indica que fluctuó entre 28 y 39%.

Estos resultados son más altos que los obtenidos por Pérez, 2020 quien realizó extractos liofilizados de bayas de murta y obtuvo rendimientos de 24,3%, las diferencias se pueden deber a que utilizó solvente etanol puro y no mezclado con agua ya que se ha descrito que solventes orgánicos en mezclas entre 50-90% con agua es el mejor solvente para la extracción de compuestos fenólicos en masa de distinta procedencia natural, especialmente de matrices proteicas ya que esta mezcla es capaz de degradar complejos polifenoles-proteinas(Meneses et al., 2013)

Un estudio donde se evaluó la extracción de compuestos fenólicos, obtuvo el mejor rendimiento en masa con 50% etanol obteniendo resultado de 24,95% (Soto-García & Rosales-Castro, 2016).

En la figura 11 (A) y (B) podemos ver que no hay diferencias significativas para el tipo de solvente a utilizar y el rendimiento pero si podemos decir que se obtuvieron mejores rendimientos para las mezclas con 50% de solvente.

Con respecto a los resultados de actividad de agua y humedad, ver tabla 8, podemos observar que no hay diferencias en el resultado con respecto a la mezcla solvente estudiada sin embargo, podemos ver que el solvente más polar con lleva a extractos con menor actividad de agua y humedad. Estos dos términos están relacionados pero no son lo mismo, la humedad hace referencia a la cantidad de agua total que contiene el alimento, en cambio la actividad de agua hace referencia a qué fracción del agua está ligada a otras sustancias las cuales pueden reaccionar y provocar un crecimiento microbiano. Al conocer la humedad se puede estimar la actividad de agua, es decir una humedad baja va a tender una actividad de agua baja. Los resultados obtenidos van en línea con lo antes mencionado, ya que la menor actividad de agua se obtuvo junto con el menor porcentaje de humedad.

4.3 Concentración de antocianinas y flavonoides de los extractos de murta mediante HPLC

La concentración de antocianinas y flavonoides se realizó mediante el método descrito en el punto 3.3.7.

En la figura 12 y 13 podemos ver los cromatograma obtenidos para flavonoides y antocianinas en extracto de murta liofilizado. Para flavonoides se obtuvo un tiempo de retención de 22 minutos y para antocianinas de 18 minutos. En comparación con el método de Genskowsky et al., 2016 el cual obtuvo tiempos de retención de 23,86 y 14,86 minutos respectivamente.

Con las curvas de calibración y las áreas obtenidas se calculó la concentración para flavonoides y antocianinas, estos resultados se muestran en la tabla 9, el factor de dilución utilizado fue de 13,3.

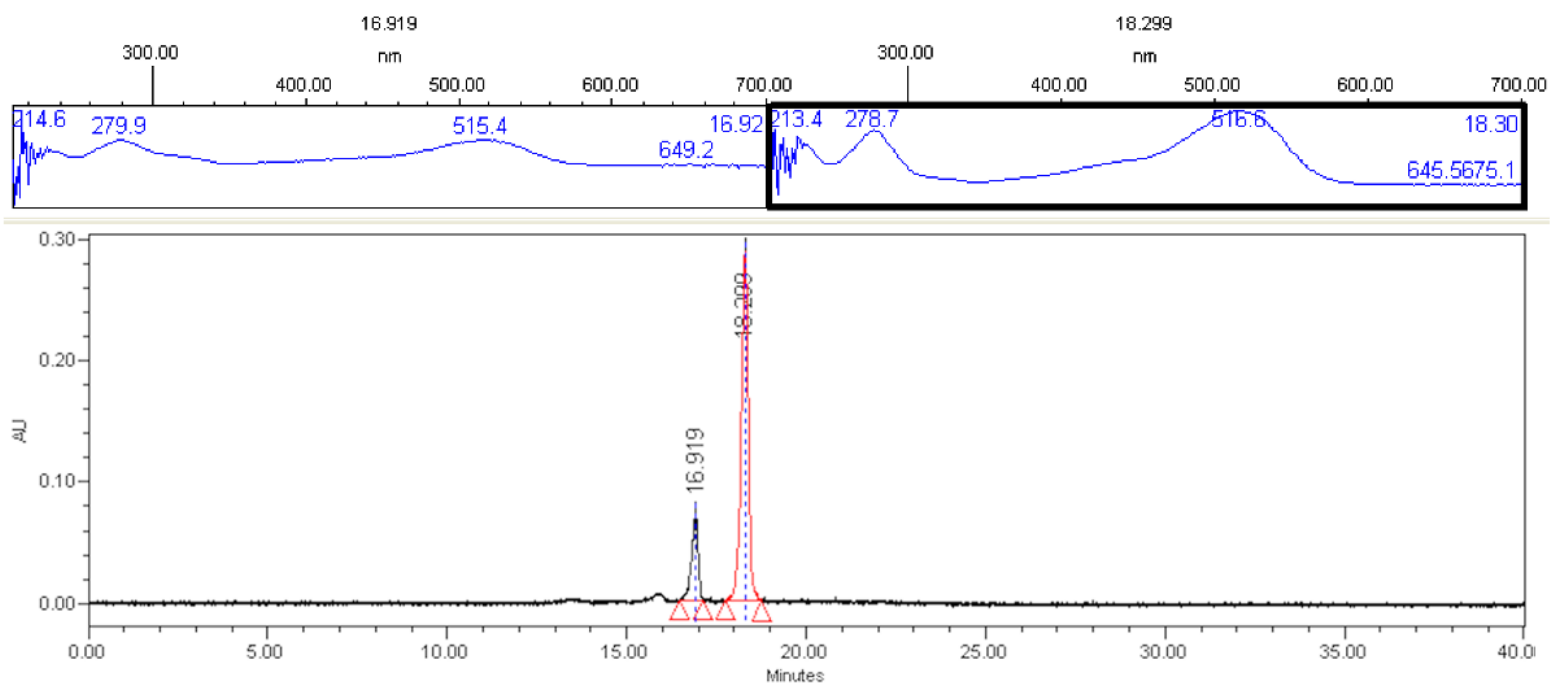


Figura 12. Cromatograma obtenido para Antocianinas mediante HPLC.

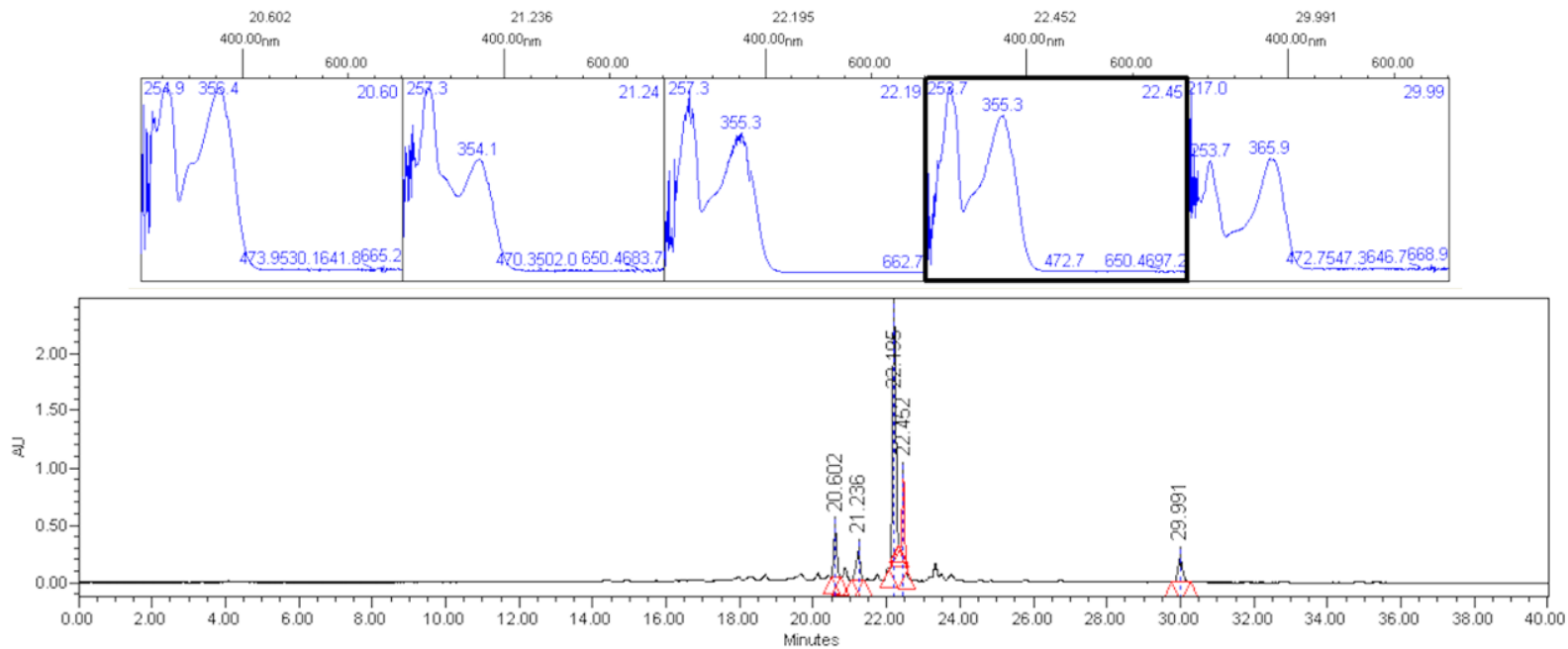


Figura 13. Cromatograma obtenido para Flavonoides mediante HPLC.

Tabla 9. Concentración de flavonoides (mg eq quercetina-3-glucósido/ml) y antocianinas (mg eq cianidina-3-glucósido/ml) obtenidos en extractos liofilizados de murta para distintas mezclas de solventes

Extracto	Concentración flavonoides (mg eq quercetina-3-glucósido/ml)	Contenido antocianinas (mg eq cianidina-3-glucósido/ml)
Mu/Ac:50	1,97±0,30 ^a	0,12±0,02 ^a
Mu/Ac:80	1,98±0,13 ^a	0,12±0,03 ^a
Mu/Me:50	2,44±0,01 ^a	0,17±0,01 ^a
Mu/Me:80	1,88±0,04 ^a	0,12±0,04 ^a
Mu/Et:50	2,13±0,50 ^a	0,15±0,02 ^a
Mu/Et:80	2,09±0,16 ^a	0,15±0,00 ^a

Valores expresados como el promedio ± DS de las muestras. Mismas letras no indican diferencias significativas entre filas, $p < 0,05$.

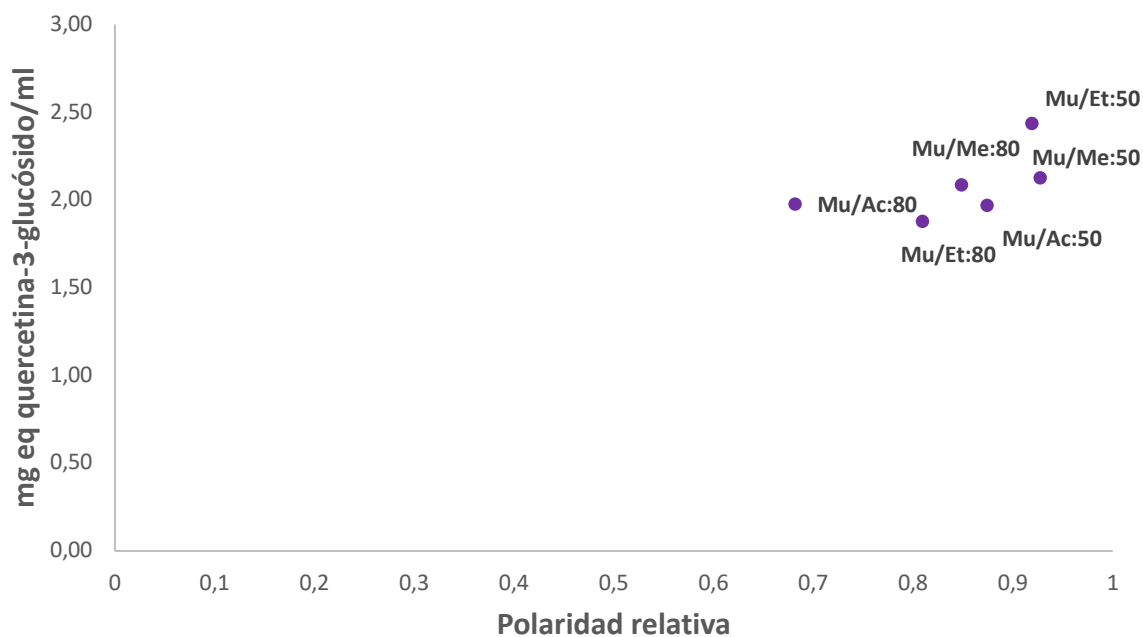


Figura 14. Extracción flavonoides mg eq quercetina-3-glucósido/ml con respecto a la polaridad del solvente

En la tabla 9 podemos encontrar la diferencia de concentración encontrada en los extractos usando diferentes mezclas de solventes, para antocianinas y flavonoides, podemos observar que la cantidad de las antocianinas expresada como mg cianidina-3-glucósido/ml es menor que para los flavonoides expresada como quercetina-3-glucósido/ml, esto es porque la murta se caracteriza por la cantidad de flavonoides presentes, específicamente la quercetina-3-glucósido (López de Dicastillo et al., 2017). Para flavonoides el mayor valor fue de 2,44 mg eq quercetina-3-glucósido/ml o 13,07 mg eq quercetina-3-glucósido/g m.s y para las antocianinas un valor de 0,17 mg eq cianidina-3-glucósido/ml o 0,91 mg eq cianidina-3-glucósido/g m.s. Los valores de antocianinas en este estudio fueron menores que los encontrados por Brito et al., 2014 el cual obtuvo 6,85 mg cianidina-3-glucósido/g m.s, estas diferencias se pueden deber al tipo de murta utilizada y el método de extracción quien utilizó metanol puro con 0,1% HCl, esto se puede deber a que las antocianinas presentan una estabilidad a pH ácidos, Bedoya-Cataño et al., 2022 estudió tres solventes distintos para la

extracción de antocianinas en arándanos en donde el mayor valor se obtuvo con solvente acidificado. A diferencia de Cedeño, 2017 quien obtuvo 0,0257 mg cianidina-3-glucósido/g m.s

Lillo et al., 2016 realizó un estudio de la extracción de compuestos bioactivos en la murta y los comparó con diferentes berries nativos chilenos. También encontró una menor cantidad de antocianinas comparado con flavonoides, con una concentración de 0,076 mg cianidina-3-glucósido/g m.s y 6,12 mg quercetina/g m.s

Comparado con el grupo de estudio, Quintanilla et al., estudió sobre el fruto maqui, encontrando una concentración de antocianinas de 29,47 mg cianidina-3-glucósido/g m.s.

Tabla 10. Comparación concentración flavonoides y antocianinas con otros autores

Especie	Flavonoides [mg eq-quercetina-3- glucósido/g m.s]	Antocianinas [mg eq-cianidina-3- glucósido/g m.s]	Referencias
Ugni molinae	13,07	0,19	Este estudio
	-	0,0257	(Cedeño, 2017)
	-	0,109	(García-Díaz et al., 2019)
	7,61	-	(Chacón-Fuentes et al., 2015)

En la figura 14 podemos observar como a medida que la polaridad aumenta, tiende a aumentar la extracción de flavonoides. Pastrana-Puche et al., menciona que el poder de extracción de compuestos fenólicos aumenta cuando se aumenta un 20% de agua a solventes como metanol, etanol y acetona. Se ha descrito que flavonoides como la quercetina-3-glucósido presenta mayor solubilidad en etanol y por ende mayor poder de extracción sobre todo en mezclas sobre el 70% con agua (Oreopoulou et al., 2019).

Se compararon los valores obtenidos en este trabajo con los descritos por otros autores en la tabla 10. Podemos observar que este estudio obtuvo valores más altos que los obtenidos por Chacón-Fuentes et al., 2015, quienes obtuvieron 0,316 mg eq-quercetina-3-glucósido/ml o

7,61 mg eq-quercetina-3-glucósido/g m.s. Las diferencias se pueden deber a que utilizaron como solvente etanol al 50% y el tipo de extracción, el cual fue a 30°C por 20 minutos en un agitador magnético a 170 rpm.

Con respecto a las antocianinas, podemos observar que los resultados se asemejan a los obtenidos por Garcia-Diaz et al., 2019 a comparación de Cedeño, 2017 quien obtuvo un menor valor de 0,0257 mg eq-cianidina-3-glucósido/g m.s, esto se puede deber al método de extracción utilizado, el cual fue con metanol puro dejando la fruta en reposo por 1 hora.

Tabla 11.- Comparación de contenido de flavonoides y antocianinas con otros berries chilenos

Fruto	Flavonoides (mg eq quercetina- 3-glucósido/g m.s)	Antocianinas (mg cianidina-3- glucósido/g m.s)	Referencia
Murta	13,07	0,91	Este trabajo
Maqui	7,64	3,41	(Lillo et al., 2016)
Arrayán	3,31	0,18	(Lillo et al., 2016)
Arándano	1,82	0,20	(Lillo et al., 2016)

En la tabla 11 podemos ver la comparación entre la murta con tres berries chilenos en un estudio por Lillo et al., 2016, en donde podemos observar que la murta contiene la mayor cantidad de quercetina-3-glucósido a diferencia de las antocianinas en donde el maqui es el que mayor contenido tiene, es por eso el color característico de este fruto.

4.4 Capacidad antioxidante mediante técnica ABTS Y ORAC para extractos de murta

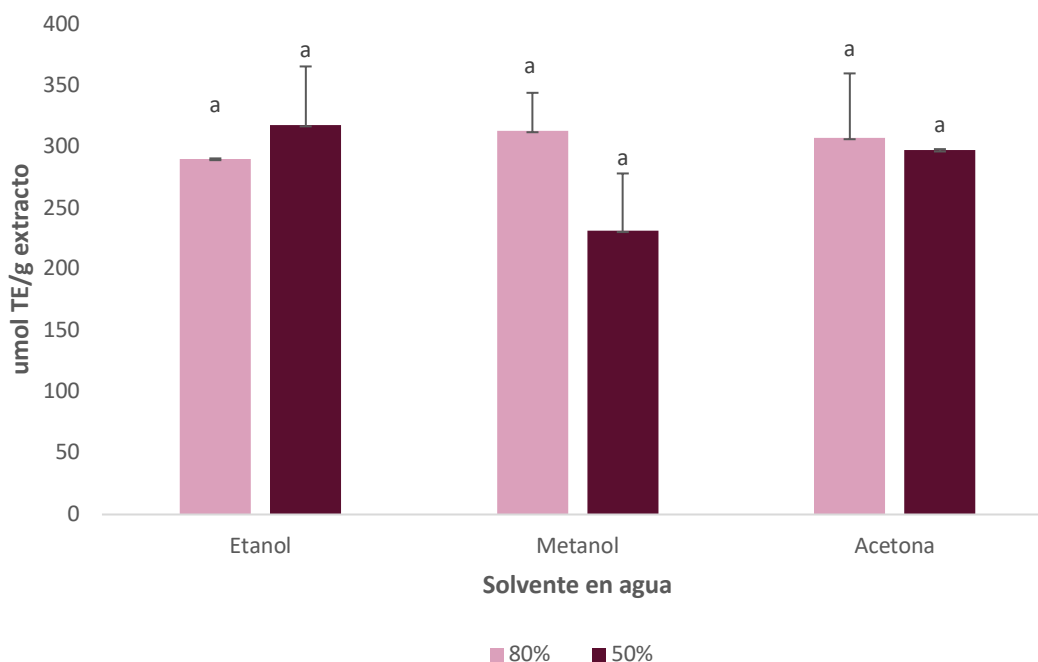


Figura 15. Capacidad antioxidante mediante método ORAC [umol trolox eq/ g m.s]

Valores expresados como el promedio \pm DS de las muestras. Mismas letras no indican diferencias significativas entre filas, $p < 0,05$.

En cuanto a los resultados de capacidad antioxidante mediante el método ORAC, podemos observar en la figura 15 que no existen diferencias significativas para la concentración ni entre solventes.

El valor más alto obtenido fue de 317,9 [umol Trolox eq / g m.s] en etanol al 50% y el menor valor fue de 231,6 [umol Trolox eq /g m.s] en metanol al 50%. Estos valores se asemejan a los encontrados por López de Dicastillo et al., 2017 en donde el valor mayor en ORAC encontrado fue de [80 mg Trolox eq/g m.s] o [320 umol Trolox eq / g m.s] en etanol al 50% el cual fue mayor en comparación a los otros resultados, en donde para etanol puro se obtuvo 240 umol Trolox eq/g m.s] y para agua 200[umol Trolox eq/g m.s].

Tabla 12. Comparación valores ORAC [umol trolox eq/g extracto] para murta con otros autores y con otros berries

Especie	ORAC [umol TE/g m.s]	Referencia
<i>Ugni Molinae</i>	317,9	Este trabajo
<i>Ugni Molinae</i>	50	(Riquelme, 2016)
<i>Ugni Molinae</i>	406	(Junqueira-Gonçalves et al., 2015)
<i>Ugni Molinae</i>	435,74	(Fuentes et al., 2019)
<i>Berberis Microphylla</i>	724,25	(Fuentes et al., 2019)
<i>Aristotelis Chilensis</i>	371	(Fuentes et al., 2019)
<i>Luma Apiculata</i>	625	(Fuentes et al., 2019)
<i>Vaccinium Corymbosum</i>	54,8	(Muñoz-Fariña et al., 2023)

En la tabla 12 encontramos los resultados de ORAC en murta comparado con otros autores y con otros berries chilenos. Podemos ver que los valores encontrados en este trabajo fueron mayor que los obtenidos por Riquelme,2016 y menores a los encontrados por Junqueira-Gonçalves et al., 2015 y Fuentes et al., 2019. Sin embargo los valores se encuentran dentro de los rangos encontrados en literatura. Las diferencias se pueden deber a la localidad de donde se obtuvo la murta y también el solvente utilizado, Junqueira-Gonçalves et al., 2015 utilizó etanol al 87% y obtuvo un 21% más en ORAC que este estudio.

Comparando con la baya de murta liofilizada, Cedeño, 2017 evaluó la capacidad antioxidante en murta liofilizada y obtuvo un valor aproximado de 122 umol TE/g m.s, es decir, en este estudio se obtuvo un 61% más de capacidad antioxidante en extractos con etanol al 80%.

Comparando *Ugni Molinae* con otros berries, podemos ver que *Berberis Microphylla* (Calafate), contiene valores más altos de capacidad antioxidante, es por esto la diferencia de color en el fruto, al igual que con *Luma Apiculata* (Arrayán). Por el contrario podemos observar que *Vaccinium Corymbosum* (Arándano) contiene una capacidad antioxidante mucho menor que la murta, esto tiene relación con la tabla 11 en donde podemos observar que el arándano contiene mejor cantidad de antocianinas.

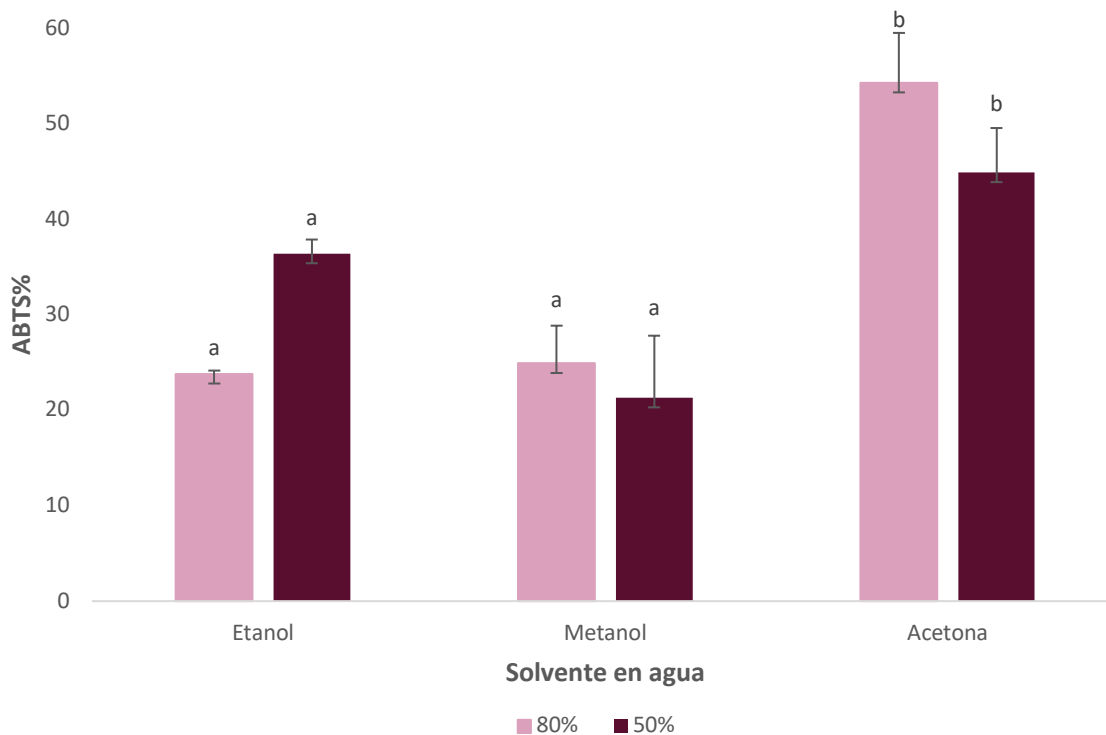


Figura 16. Capacidad antioxidante mediante método ABTS [%] de los extractos para tres solventes al 80% y 50%. Valores expresados como el promedio \pm DS de las muestras. Diferentes letras indican diferencias significativas entre filas, $p < 0,05$

En la figura 16 se ve un %ABTS significativamente mayor para mezclas acetona-agua al 50% y 80% con un porcentaje de 44,9 y 54,3%, con respecto a las mezclas etanol-agua y metanol-agua a los mismos porcentajes. En la figura 17 podemos ver un gráfico de interacción entre el tipo de solvente y el porcentaje de solvente orgánico presente en la mezcla sobre el porcentaje de ABTS. Al 50% no hay diferencias significativas respecto al tipo de solvente usado (acetona, etanol, metanol), pero en una proporción al 80% se observa un %ABTS significativamente mayor para acetona, respecto a metanol y etanol. Los resultados coinciden con los de Lillo et al., en donde se realizó el ensayo de ABTS en distintos frutos de berries en donde para murta se obtuvo un resultado de 49,6% para extractos con etanol al 70%.

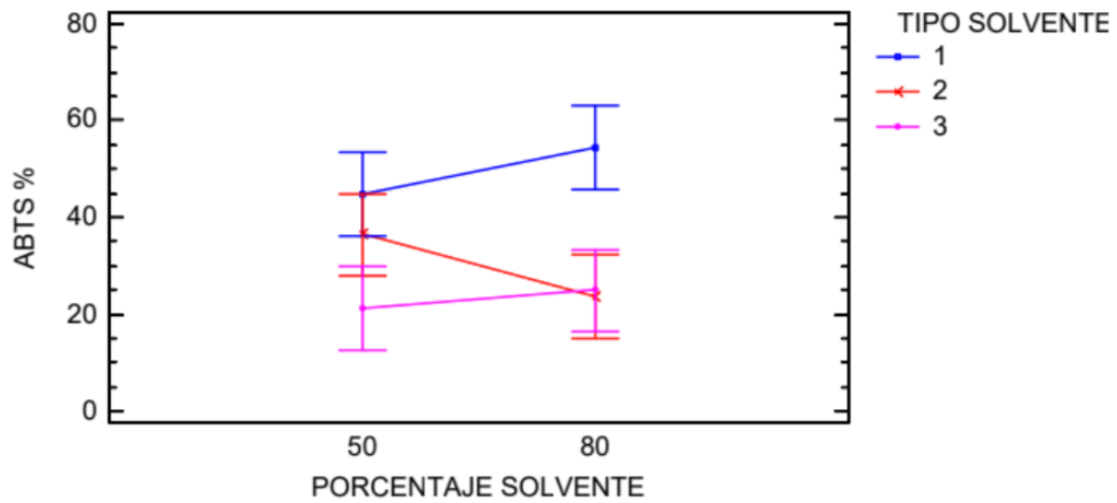


Figura 17.- Interacción entre %ABTS y tipo de solvente

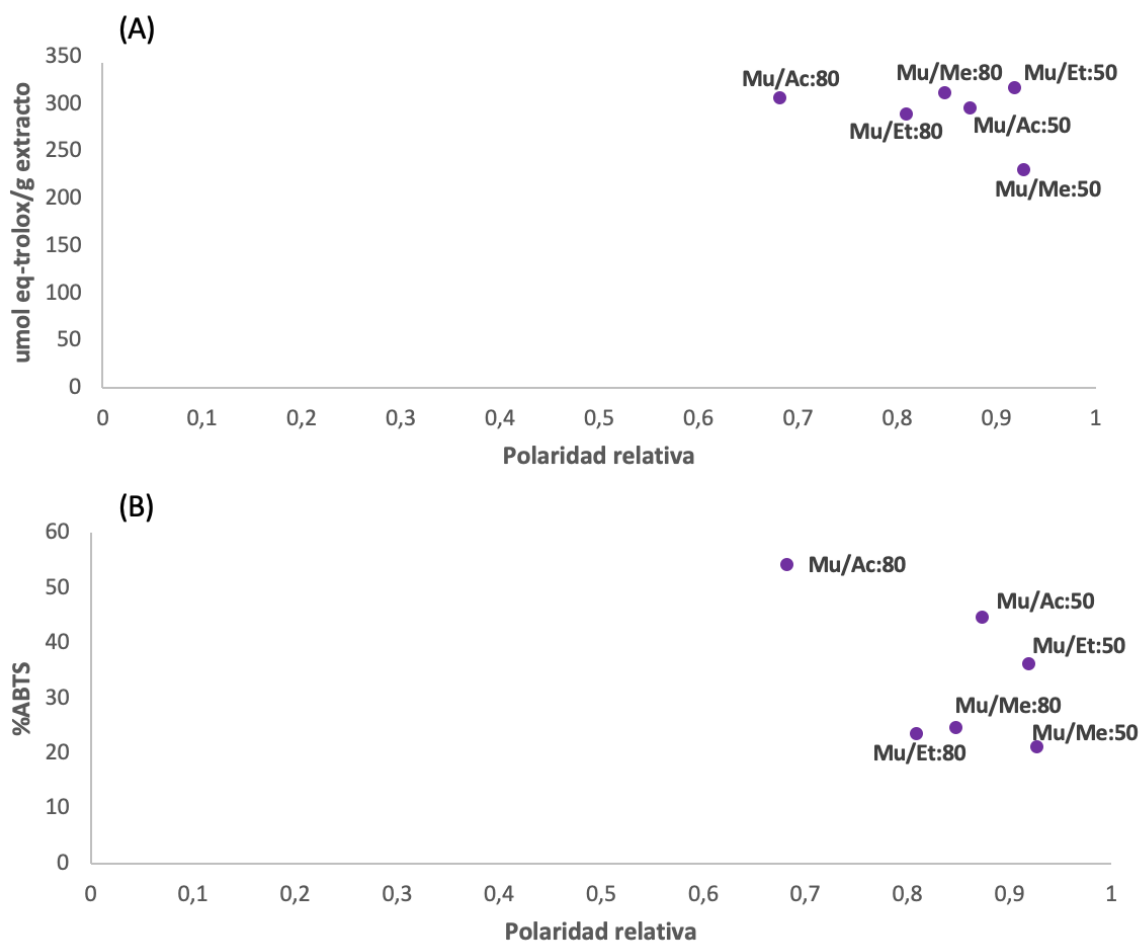


Figura 18. Capacidad antioxidante mediante ORAC (A) y ABTS (B) con respecto a la polaridad relativa del solvente

En la figura 18 podemos observar que a medida que aumenta la polaridad, la capacidad antioxidante tanto para ABTS y ORAC disminuye, por ende el metanol al 50% fue el que obtuvo el menor resultado con un 21,3%. Para ABTS y 231,6 umol TE/g extracto para ORAC.

Esto puede deberse a que los flavonoides tienden a ser más solubles en solventes polares menores al agua, y dentro de los tres solventes, el metanol es el más polar.

Estos dos métodos no pueden ser comparados entre sí ya que el método de reacción que tienen es diferente, como fue mencionado anteriormente, ORAC tiene la ventaja de combinar el porcentaje de inhibición y el tiempo de duración de la inhibición de los radicales libres de la acción en una sola cantidad, teniendo en cuenta fases con retardo, lo cual es super relevante en ensayos con extractos ya que los antioxidantes son muestras complejas que pueden ser de

acción lenta y rápida, a comparación de ABTS el cual es un ensayo colorimétrico en el que los radicales ABTS•+ simplemente decoloran en la presencia de antioxidantes (Mesa et al., 2015)

Tabla 13. Tabla resumen para Orac, Rendimiento, Antocianinas, Flavonoides y Tipo de solvente según la FDA para cada extracto

Variable	Mu/Ac:50	Mu/Ac:80	Mu/Me:50	Mu/Me:80	Mu/Et:50	Mu/Et:80
ORAC [umol trolox eq/g]	297,40	307,40	231,60	313,10	317,90	290,30
ABTS [%]	44,9	54,3	21,3	24,9	36,45	23,75
RENDIMIENTO [%]	38,57	35,90	32,10	32,40	32,17	28,67
ANTOCIANINAS [mg cianidina-3-glucósido/ml]	0,12	0,12	0,15	0,15	0,17	0,12
FLAVONOIDES [mg eq quercetina-3-glucósido/ml]	1,97	1,98	2,13	2,09	2,44	1,88
Tipo de solvente según la FDA	Clase III	Clase III	Clase II	Clase II	Clase III	Clase III

En la tabla 13 podemos ver los datos resúmenes para cada solvente en el estudio.

Para poder definir el solvente adecuado es importante observar distintos aspectos, en primer lugar podemos observar que los solventes Acetona y Etanol se encuentran dentro de la Clase III, es decir, alimentos seguros para el consumo, por lo tanto el solvente Metanol al ser de Clase II y requiere de un manejo especial por su toxicidad, se descarta dentro de la selección.

Analizando los solventes seleccionados (Acetona y Metanol), podemos ver con respecto al rendimiento que el valor más alto se obtuvo con Acetona al 50%. En cuanto a Flavonoides y Antocianinas el valor más alto fue obtenido con el solvente Etanol al 50% con un valor de

2,44mg eq-quercetina-3-glucósido/ml y 0,15 mg eq-cianidina-3-glucósido/ml respectivamente. Para capacidad antioxidante en ORAC el valor más alto se obtuvo con Etanol al 50% con 317 $\mu\text{mol TE/g m.s}$ y en ABTS fue con Acetona al 80% con 54,3%. No se ha descrito en literatura cual es el mejor solvente ya que va a depender de distintos factores como método de extracción, proporción, método de secado, etc. Pero, en base a los resultados obtenidos en este trabajo y que en capacidad antioxidante, el método ORAC nos entrega una información más cercana al comportamiento de los antioxidantes frente a los radicales libres a diferencia de ABTS, podemos decir que la mejor mezcla de solvente es Etanol-Agua al 50%.

5. Conclusiones

- Se pudo determinar la mezcla solvente que permite obtener un extracto de murta enriquecido con flavonoides y antocianinas, con un rendimiento en masa superior al 30% y capacidad antioxidante de un 61% superior a la baya liofilizada
- Mediante el diseño experimental se pudo evaluar el mejor solvente para la obtención de mayor capacidad antioxidante siendo el etanol al 50% el seleccionado
- Se implementó y validó un método por HPLC para la determinación de quercetina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido, obteniéndose valores comparables con otros autores
- Los extractos obtenidos de murta pueden ser un potencial para la prevención del colon irritable debido a los valores obtenidos para capacidad antioxidante mediante método ORAC y ABTS.

6. Referencias

- Alfaro, S., Mutis, A., Quiroz, A., Seguel, I., & Scheuermann, E. (2014). Effects of Drying Techniques on Murtilla Fruit Polyphenols and Antioxidant Activity. *Journal of Food Research*, 3(5), 73. <https://doi.org/10.5539/jfr.v3n5p73>
- Avello, M., Valdivia, R., Sanzana, R., Mondaca, M. A., Mennickent, S., Aeschlimann, V., Bittner, M., & Becerra, J. (2009). *Extractos antioxidantes y antimicrobianos de Aristotelia chilensis y Ugni molinae y sus aplicaciones como preservantes en productos cosméticos*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85617461004>
- Bedoya-Cataño, J. F., Ramón-Palacio, C., Gil-Garzón, M. A., & Ramírez-Sánchez, C. (2022). Extracción de antioxidantes de los arándanos (*Vaccinium corymbosum*): efecto de solventes verdes sobre polifenoles totales, capacidad antioxidante y comportamiento electroquímico. *Tecnológicas*, 25(53), e2277. <https://doi.org/10.22430/22565337.2277>
- Brito, A., Areche, C., Sepúlveda, B., Kennelly, E. J., & Simirgiotis, M. J. (2014). Anthocyanin characterization, total phenolic quantification and antioxidant features of some chilean edible berry extracts. *Molecules*, 19(8), 10936–10955. <https://doi.org/10.3390/molecules190810936>
- Cavalcante, R. M. S., Lima, M. M., Parente, J. M. L., de Moura, M. S. B., & do Nascimento Nogueira, N. (2020). Inflammatory bowel diseases and diet: An integrative review. In *Revista da Associação Médica Brasileira* (Vol. 66, Issue 10, pp. 1449–1454). Associação Médica Brasileira. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.66.10.1449>
- Cedeño, S. (2017). *Efecto de los diferentes procesos de secado en los compuestos bioactivos de murtilla (Ugni Molinae Turcz) y su bioaccesibilidad*.
- Chacón-Fuentes, M., Parra, L., Rodríguez-Saona, C., Seguel, I., Ceballos, R., & Quiroz, A. (2015). Domestication in murtilla (*Ugni molinae*) reduced defensive flavonol levels but increased resistance against a native herbivorous insect. *Environmental Entomology*, 44(3), 627–637. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv040>
- D'Amario, M. A. (2018). *Extracción y Caracterización de Compuestos Bioactivos Remanentes En Orujos y Su Utilización En La Industria Alimentaria Con Fines Tecnológicos*.
- Fernández, M. S., Villaño, D., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, C. (2006). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo*. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222006000200...
- Fuentes, L., Figueroa, C. R., Valdenegro, M., & Vinet, R. (2019). Patagonian berries: Healthy potential and the path to becoming functional foods. In *Foods* (Vol. 8, Issue 8). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/foods8080289>
- García-Díaz, D. F., Jiménez, P., Reyes-Farías, M., Soto-Covasich, J., & Costa, A. G. V. (2019). A Review of the Potential of Chilean Native Berries in the Treatment of Obesity and its Related Features. In *Plant Foods for Human Nutrition* (Vol. 74, Issue 3, pp. 277–286). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00746-6>

- Genskowsky, E., Puente, L. A., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., Muñoz, L. A., & Viuda-Martos, M. (2016). Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(12), 4235–4242. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7628>
- Hauser, C., Peñalosa, A., Rodríguez, F., Guarda, A., & Galotto, M. J. (2014). Promising antimicrobial and antioxidant extracts of Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz): Shelf-life extension and food safety. *Food Packaging and Shelf Life*, *1*(1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.01.003>
- Hossen, I., Hua, W., Ting, L., Mehmood, A., Jingyi, S., Duoxia, X., Yanping, C., Hongqing, W., Zhipeng, G., Kaiqi, Z., Fang, Y., & Junsong, X. (2020). Phytochemicals and inflammatory bowel disease: a review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 60, Issue 8, pp. 1321–1345). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1570913>
- Junqueira-Gonçalves, M. P., Yáñez, L., Morales, C., Navarro, M., Contreras, R. A., & Zúñiga, G. E. (2015). Isolation and characterization of phenolic compounds and anthocyanins from murta (*Ugni molinae* Turcz.) fruits. Assessment of antioxidant and antibacterial activity. *Molecules*, *20*(4), 5698–5713. <https://doi.org/10.3390/molecules20045698>
- Liberal, Â., Molina, A. K., Pereira, C., Dias, M. I., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2022). Solid-liquid extraction of polyphenols. In *Technologies to Recover Polyphenols from AgroFood By-products and Wastes* (pp. 73–112). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85273-9.00004-1>
- Lillo, A., Carvajal-Caiconte, F., Nuñez, D., Balboa, N., & Alvear Zamora, M. (2016, August). Cuantificación espectrofotométrica de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en distintos berries nativos del Cono Sur de América. *Agosto*, 168–174.
- López de Dicastillo, C., Bustos, F., Valenzuela, X., López-Carballo, G., Vilariño, J. M., & Galotto, M. J. (2017). Chilean berry *Ugni molinae* Turcz. fruit and leaves extracts with interesting antioxidant, antimicrobial and tyrosinase inhibitory properties. *Food Research International*, *102*, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.073>
- López, J., Vega-Gálvez, A., Rodríguez, A., Uribe, E., & Bilbao-Sainz, C. (2018). Review MURTA (*Ugni molinae* Turcz.): A REVIEW ON CHEMICAL COMPOSITION, FUNCTIONAL COMPONENTS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF LEAVES AND FRUITS Revisión MURTA (*Ugni molinae* Turcz.). *Chilean J. Agric. Anim. Sci., Ex Agro-Ciencia*, *34*(1), 43–56.
- López, J., Vera, C., Bustos, R., & Florez-Mendez, J. (2021). Native berries of Chile: a comprehensive review on nutritional aspects, functional properties, and potential health benefits. In *Journal of Food Measurement and Characterization* (Vol. 15, Issue 2, pp. 1139–1160). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00699-4>
- Madrid-Silva, A. M., Defilippi-Caffri, C., Landskron-Ramos, G., Olguin-Herrera, F., Reyes-Ponce, A., Castro-Lara, A., Larrain-Corp, S., Martinez-Roje, N., & Cortés-Espinoza, J. (2013). Prevalencia de síntomas de intestino irritable en población asistente a centros comerciales de Santiago de Chile. *Revista de Gastroenterología de México*, *78*(4), 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.rgmex.2013.07.004>
- Mesa, A. M., Zapata Uribe, S., Arana, L. M., Zapata, I. C., Monsalve, Z., & Rojano, B. (2015). Actividad Antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides*

- L. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1).
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85632845001>
- Muñoz-Fariña, O., López-Casanova, V., García-Figueroa, O., Roman-Benn, A., Ah-Hen, K., Bastias-Montes, J. M., Quevedo-León, R., & Ravanal-Espinosa, M. C. (2023). Bioaccessibility of phenolic compounds in fresh and dehydrated blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry Advances*, 2.
<https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100171>
- Pérez, R. (2020). *Evaluación del efecto de extractos obtenidos desde frutos de Ugni molinae Turcz. sobre la agregación proteica asociada a enfermedades neurodegenerativas.*
- Piña, Y. (2011). *Evaluación comparativa de la actividad antioxidante y fenoles totales en diversos extractos de ecotipos de Ugni molinae Turcz.*
- Rezaie, M., Farhoosh, R., Iranshahi, M., Sharif, A., & Golmohammadzadeh, S. (2015). Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties. *Food Chemistry*, 173, 577–583.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.081>
- Riquelme, G. (2016). *Determinación de bioaccesibilidad de polifenoles en murta fresca y jugo de murta (Ugni Molinae Turcz).*
- Slimming, J. (2019). ACHIEVEMENTS AND CHALLENGES OF THE TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE IN CHILE. *Revista Medica Clinica Las Condes*, 30(5), 344–348. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2019.07.005>
- Tovar, J. (2013). *DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH Y ABTS DE 30 PLANTAS RECOLECTADAS EN LA ECOREGION CAFETERA.*