



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**Estabilidad de Pigmentos Naturales, Polifenoles y
Capacidad Antioxidante del Jugo de Murta (*Ugni
molinae* Turcz)**

TESIS DE MAGÍSTER

KAREN ARLETTE MATHIAS RETTIG

VALDIVIA – CHILE

2014

La Comisión evaluadora de Tesis comunica al Director de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Agrarias que la tesis de Magíster presentada por la candidata.

KAREN ARLETTE MATHIAS RETTIG

Ha sido aprobado en el examen de defensa de Tesis rendido el día 28 de agosto de 2014, como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencia de los Alimentos y, para que así conste para todos los efectos firman.

Patrocinante:

Kong Shun Ah-Hen

Ingeniero en Alimentos, Dipl.-Ing., Dr.-Ing.
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Austral de Chile

Profesor Co-Patrocinante:

Ociel Muñoz Fariña

Bioquímico, Dr. Ciencias Químicas.
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Austral de Chile

Profesor Informante:

Roberto Lemus Mondaca

Ingeniero en Alimentos, Mg. Dr. Ing.
Departamento de Ingeniería en Alimentos
Facultad de Ingeniería
Universidad de La Serena

**ESTABILIDAD DE PIGMENTOS NATURALES, POLIFENOLES Y
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL JUGO DE MURTA (*UGNI
MOLINAE TURCZ*)**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Magíster en Ciencia de los Alimentos.

Por

KAREN ARLETTE MATHIAS RETTIG

Valdivia - Chile

2014

A los sueños por cumplir y a los que se fueron al cielo

Tu libertad está en el límite de tus pensamientos

Agradecimientos

Esta tesis ha sido realizada gracias al soporte recibido por parte de los académicos Kong Shun Ah-Hen, Ociel Muñoz F., Roberto Lemus M., Fernando Figuerola R, Fernando Asenjo, Mariela Rademacher, Marcia Costa y a los funcionarios Marta Aranda y José Briceño del ICYTAL, sin el apoyo de todos ellos, no podría estar escribiendo estas palabras hoy.

Gracias al programa de Magíster en Ciencia de los Alimentos y a la Escuela de Graduados por otorgarme la beca de arancel, con la cual pude desarrollar mis estudios, a Vivi que más que una secretaria, es la orientadora académica de pasos a seguir incluso en la vida.

Al profesor Kong, por todo su apoyo y ánimos constantes, así como por toda la confianza que ha depositado en mí. Es difícil encontrar palabras de agradecimiento para expresar todo lo que me ha aportado. Su disponibilidad en todo momento y sus orientaciones, han ido más allá de un puro trabajo académico, siendo una experiencia muy positiva con tan excelente profesional y persona.

Al académico Haroldo Magariños, quien no sólo fue mi profesor sino que también orientador y amigo, siempre dándome los mejores consejos académicos y de la vida.

A todos los profesores que me hicieron clases a lo largo del programa, en especial a los profesores ya nombrados y Renate Schöbitz , Peter Seemann y Andrea Báez

A mis compañeros y amigos de estudios Yolanda, Anne, Gabriela, Andrés, Pedro, Alexandra, Susana y Olga con los cuales no sólo adquirí conocimiento, sino que fueron compañeros de aventuras y un soporte emocional sin igual.

A mi familia, papá, mamá y hermano que con su apoyo y amor, me han ayudado a no desanimarme en aquellos momentos difíciles y a seguir adelante. Parte de ella también mis perritos quienes me dan armonía y libertad en mi alma.

A Yonny Nannig Casanova, mi compañero de aventuras, decisiones, pasiones, de amor incondicional. Como no agradecer su apoyo, si fue quien me alentó a realizar el magister, busco, estudio y aprendí de los alimentos conmigo motivándome y haciéndome sentir que mi profesión es parte importante de la sociedad, y desde el cielo seguro me hizo barra y susurró en cada oído de los profesores un siete.

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
	RESUMEN	1
	ABSTRACT	2
1	INTRODUCCIÓN	3
2	MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1	Ubicación del estudio	11
2.2	Materiales	11
2.3	Diseño experimental	11
2.4	Extracción por arrastre de vapor	12
2.5	Balance de materia	13
2.6	Determinación de concentración de polifenoles totales	14
2.7	Determinación del contenido de antocianinas	15
2.8	Determinación de clorofila total y de carotenos	15
2.9	Capacidad antioxidante por método DPPH	16
2.10	Medición del color	17
2.11	Análisis estadísticos	18
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20

3.1	Balance de materia	20
3.2	Variación del contenido de pigmentos, de la actividad antioxidante y del color en función del tiempo de extracción	22
3.2.1	Pigmentos en función del tiempo de extracción	22
3.2.2	Variación del color del extracto en función del tiempo de extracción	26
3.3	Estabilidad de los pigmentos, de la capacidad antioxidante y del color, en función de las condiciones de almacenamiento	28
3.3.1	Estabilidad de los pigmentos y de la capacidad antioxidante	28
3.3.2	Variación del color del jugo de murta en función del tiempo de almacenamiento	37
4	CONCLUSIONES	43
5	BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		Página
1	Variables independientes del modelo (Factores)	12
2	Rendimiento, sólidos solubles, pH y residuo por cada tiempo de procesamiento	21
3	Composición de la murta residual a distintos tiempos de extracción	21
4	Comparación del sistema de extracción: contenido de pigmentos y DPPH	22
5	Comparación del sistema de extracción de acuerdo a la diferencia de color	27
6	Estabilidad de pigmentos y DPPH	28
7	Variación de color	38
8	Variación de color en función de la temperatura ANOVA	39
9	Regresión múltiple evaluada a 5 °C	42

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Estructura química de: a) Flavan-3-ol y b) Epicatequina	4
2	Compuestos fenólicos identificados en extractos etanólicos de hojas de murta	5
3	Fotos de <i>Ugni molinae</i> Turcz	6
4	Olla extractora de jugo por arrastre de vapor	12
5	Curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar a 765 nm	13
6	Curva de calibración capacidad antioxidante a 515 nm	16
7	Sólido de color del sistema Hunter Lab Sistema de color tridimensional	17
8	Diagrama de Pareto estandarizado para la variable de respuesta polifenoles	29
9	Efecto del factor tiempo de almacenamiento a 5 °C y tiempo de extracción en relación a los polifenoles totales.	30
10	Efecto del factor tiempo y temperatura de almacenamiento a un tiempo de extracción 30 min en relación a los polifenoles totales.	30
11	Diagrama de Pareto estandarizado para la variable de respuesta antocianinas	31
12	Efecto del factor tiempo de almacenamiento a 5 °C y tiempo de extracción en relación a la extracción de polifenoles totales (PFT) y antocianinas (ACN)	32

13	Efecto sobre la concentración de antocianinas de los factores tiempo y temperatura de almacenamiento en un jugo de murta obtenido con 30 min de extracción	32
14	Efecto sobre las antocianinas de los tiempos de almacenamiento y de extracción, en un jugo de murta almacenado a 5 °C	33
15	Efecto de los factores tiempo y temperatura de almacenamiento a 30 min de extracción en relación a los pigmentos fotosintéticos	34
16	Diagrama de Pareto estandarizado para las variables de respuestas: a) DPPH y b) Porcentaje de inhibición del radical DPPH (%IRL)	35
17	Efecto del factor tiempo de almacenamiento en relación al DPPH, para un tiempo de extracción de 30 min.	36
18	Efecto de las condiciones de almacenamiento en relación al DPPH, a) 30 min de extracción con vapor; b) 5 °C de almacenamiento	36
19	Efecto del factor condiciones de almacenamiento en relación al %IRL. a) 30 min de extracción con vapor; b) 5 °C de almacenamiento	37
20	Variación de color en jugos almacenados a 5°C sobre los PFT y ACN	40
21	Variación del color en jugos almacenados a 5°C sobre las CHL y CRT	41

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Et:	Tiempo de extracción por vapor (min)
TA:	Temperatura de almacenamiento (°C)
At:	Tiempo de almacenamiento (días)
PFT:	Polifenoles Totales
ACN:	Antocianinas Totales
CHL _a :	Clorofila a
CHL _b :	Clorofila b
CRT:	Carotenoides Totales
CHL _T :	Clorofila Total
ΔE :	Variación general de color
ΔL :	Variación de luminosidad o claridad
Δa :	Diferencial de la desviación del punto acromático correspondiente a la luminosidad hacia el rojo si a^* es positiva, y hacia el verde si a^* es negativa
Δb :	Variación la desviación hacia el amarillo si b^* es positiva, y hacia el azul si b^* es negativa
ΔC :	Diferencial del croma saturación del color
Δh :	Diferencial del tono
Lab:	Método de laboratorio para extractos vegetales
GAE:	Ácido gálico equivalente

TE:	Trolox equivalente
FC:	Folin-Ciocalteu
DPPH:	Radical 2,2 difenil-1-picril hidrazilo
SS:	Sólidos solubles
GLM:	Modelos lineales generalizados
DW:	Estadístico de Durbin-Watson

RESUMEN

Los jugos extraídos de bayas congeladas de murta (*Ugni molinae* Turcz) por condensación en un extractor de jugo a vapor, fueron analizados por sus contenidos de polifenoles, antocianinas, clorofilas, carotenoides, sus capacidades antioxidantes y color en muestras almacenadas a tres temperaturas (5, 20 y 35 °C). Los análisis de los extractos fueron realizados en triplicado en distintas instancias durante un periodo de 35 días. Los polifenoles fueron analizados por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, la actividad antioxidante fue determinada por la decoloración de radicales libres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), el contenido de antocianinas totales mediante el diferencial de pH, la clorofila y carotenoides totales por el método de AOAC 942.0 y el color a través de un colorímetro de líquidos con el sistema CIE-XYZ.

Los contenidos de pigmentos en los jugos de los distintos tiempos de extracción eran significativamente diferentes, siendo mayor en los jugos de 30 min de extracción y menor en los jugos de 45 min, por lo cual se presume que el tiempo de extracción no debe superar los 30 min. Durante el almacenamiento de los distintos jugos se observó un decrecimiento continuo del contenido de pigmentos. Por lo general, se observó una buena correlación entre el contenido de pigmentos y la actividad antioxidante. El color del jugo fue dado principalmente por las antocianinas, las cuales resultaron ser altamente inestables a la temperatura, siendo 5 °C la mejor temperatura de almacenamiento con la mayor retención. Por otra parte, la capacidad antioxidante no fue afectada significativamente por la temperatura, pero el almacenamiento causó una pérdida significativa en el día 26. Estos resultados pueden ser útiles para la industria de los jugos como punto de partida para el desarrollo de jugos de murta con altos niveles de compuestos bioactivos.

ABSTRACT

Juices extracted from frozen murtila berries (*Ugni molinae* Turcz) by steam condensation using a steam juicer operated at three different extraction times (15, 30 and 45 min) were analyzed for content of phenolic compounds, anthocyanins, chlorophylls, carotenoids, as well as for antioxidant activity and color. The samples were stored at three temperatures (5, 20 and 35 °C). Analysis on murtila juice extracts were performed in triplicate at different time intervals during a period of 35 days. Phenolics were analyzed using the colorimetric method of Folin-Ciocalteu, the antioxidant activity was determined by discoloration of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radicals, the contents of total anthocyanins through the method of pH differential, the chlorophyll and total carotenoids AOAC method 942.0 and color was measured using a colorimeter for liquids with CIE-XYZ system.

The pigment contents of the juices at different extraction times were significantly different from each other, being highest at 30 min of extraction and lowest at 45 min, which led to the assumption that extraction time should not be more than 30 minutes. During the storage of the different juice samples, a steady decrease of pigment contents was observed.

In general a good correlation between pigments content and antioxidant activity was obtained. The color of the juice was mainly due to anthocyanins, which were highly unstable to temperature, being 5 °C the best storage temperature with highest retention. On other hand, antioxidant capacity was not affected significantly by temperature, but during the storage a significant loss was observed on the day 26. These results can be useful for the juice industry as a starting point for the development of murtila juice with high levels of bioactive components.

1 INTRODUCCIÓN

Chile tiene una alta variedad de productos gastronómicos y entre ellos una gran diversidad de mirtáceas (familia de árboles o arbustos), las cuales incluyen la murta o murta (*Ugni molinae* T.), una especie endémica de Chile que se encuentra en forma silvestre en las zonas marginales costeras desde el centro al sur del país, entre la Región del Maule y la Región de Aysén. Se cosechan las bayas de la murta, en grandes predios boscosos, tienen un agradable aroma frutal y están siendo comercializadas, principalmente en estado fresco. El cultivo es hoy una alternativa productiva de exportación y se vende no sólo en el mercado informal, sino también se está comercializando en locales establecidos. La murta tiene una baja durabilidad en post-cosecha y en condiciones ambientales normales dura alrededor de 8 días. Es una baya globosa, utilizada en repostería y en la fabricación de mermeladas, postres, jugos y licores de forma artesanal. Es por ello la importancia de analizar nuevas alternativas de procesamiento y comercialización, potenciándola como alimento funcional, al tener una composición rica y diversificada de compuestos con propiedades curativas (Speisky *et al.*, 2008; Schreckinger *et al.*, 2010). Una alternativa de procesamiento son los jugos saludables, que son ricos en antioxidantes; se demostró que al incorporar jugos de frutas y hortalizas en la dieta de pacientes sanos, aumentó la capacidad antioxidante total y disminuyó el contenido de malondialdehído en el plasma sanguíneo (Yuan *et al.*, 2013), comprobando así el funcionamiento de los antioxidantes de las frutas y hortalizas en promover el mejoramiento de la salud. Aunque las acciones moleculares de la actividad antioxidante de los polifenoles, no se conocen con exactitud, uno de los mecanismos más aceptados es la capacidad de estos compuestos de insertarse en las membranas celulares y modificar la estructura y fluidez de los lípidos de membranas (Sakakibara *et al* 2003).

Los polifenoles son compuestos bio-sintetizados por las plantas, conformados por un grupo hidroxilo (OH) unido a uno o más anillos bencénicos, los cuales no sólo se caracterizan por ser antioxidantes; sino también por las actividades biológicas

potencialmente beneficiosas para la salud. En diversos estudios realizados en la baya de *Ugni molinae* T., se establece que contiene polifenoles, que al igual que las demás bayas son también flavonoides, taninos y ácidos fenólicos (Rodríguez *et al.*, 2014).

Los polifenoles presentes en la baya de murta se pueden dividir en dos grandes grupos (Shene *et al.*, 2009):

1. Glucósidos de flavonoides que son compuestos de flavonas y sus derivados. En la baya de murta se encuentran principalmente cuatro glucósidos: miricetina, quercetina, ramnósido y diramnósido.
2. Flavan-3-ol (monómero) derivado del flavano. Estos se encuentran en la murta en menor proporción que los glucósidos de flavonoides, el principal representante es la epicatequina (FIGURA 1).



FIGURA 1. Estructura química de: a) Flavan-3-ol.y b) Epicatequina

En general, el contenido en polifenoles es alrededor de los 32 ± 4 mg ácido gálico/100g masa seca (Ruiz *et al.*, 2010). Los polifenoles presentes en la hoja de murta se han descrito como: epicatequina, diramnósido de miricetina, ramnósido de miricetina, glucósido de miricetina, diramnósido de quercetina, ramnósido de quercetina, glucósido de quercetina y el glucósido de canferol (Rubilar *et al.*, 2006), cuyas estructuras se presentan en la FIGURA 2.

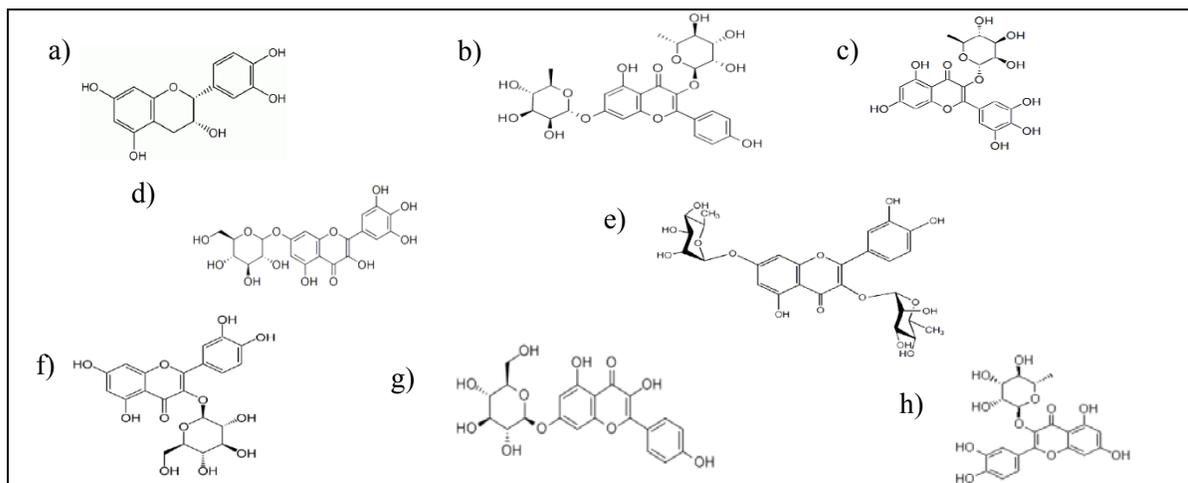


FIGURA 2. Compuestos fenólicos identificados en extractos etanólicos de hojas de murta
 a)Epicatequina , b)Di-ramnósido de miricetina, c) Ramnósido de miricetina, d) Glucósido de miricetina, e) Di-ramnósido de quercetina, f) Glucósido de quercetina , g) Glucósido de canferol, h) Ramnósido de quercetina

En las hojas también se encuentran derivados del ácido gálico en extractos alcohólicos y acuosos respectivamente (Rubilar *et al.*, 2006). Además, en extractos de diclorometano y acetato de etilo se han encontrado triterpenos como el ácido asiático y el ácido alfitólico, que han demostrado tener efecto antiinflamatorio tópico (Aguirre *et al.*, 2006; Delporte *et al.*, 2007).

Dentro de los polifenoles totales se encuentran las antocianinas, que son los principales pigmentos solubles en agua y a su vez una clase de flavonoides responsables de los colores en las frutas y la mayoría de las flores de las plantas superiores. Ellos han sido reportados por exhibir importantes funciones fisiológicas: antioxidantes, anti mutagénicas y anti cancerígenas (Wang *et al.*, 2013).

En la murta es complejo retirar sus peciolo y tallos para la elaboración de un jugo. Esta investigación apunta a la preparación de un jugo que considera el fruto con sus tallos y peciolo, preparado no sólo por la industria, sino por el consumidor común, considerando un procesamiento rápido y fácil, utilizando toda la materia prima, sin importar calibre, color, zona, variedad y frescura. Es por esto, que los compuestos bioactivos presentes en el jugo de murta van a ser tanto del fruto como de partes verdes (tallos y peciolo), dentro de

las cuales encontramos clorofila, que tiene un potencial beneficioso para la salud por su efecto protector frente al cáncer atribuido a su actividad antioxidante y antimutagénica (Ferruzzi, 2007). Por otra parte, las clorofilas también pueden provenir de la fruta sin madurez fisiológica, dado que en la maduración se producen también cambios de color, que se caracterizan por la desaparición de las clorofilas y la síntesis de pigmentos coloreados, fundamentalmente carotenoides y antocianos.



FIGURA 3. Fotos de *Ugni molinae* Turcz.

a) Hojas de murta: de forma perenne, lanceolada y de color verde oscuro; b) flores de murta: hermafroditas de forma acampanada, de color rosado; c) frutos de murta: baya globosa de color rojo intenso.

Dentro de los posibles pigmentos a encontrar en la murta están los carotenoides. Estos son compuestos ubicuos en la naturaleza, presentes en diversas estructuras de plantas y en gran variedad de animales, algas, hongos y bacterias. Estos pigmentos son responsables del color de flores y frutos, favoreciendo la polinización y dispersión de semillas. También, se encuentran en estructuras animales como las plumas y picos de algunos pájaros, el exoesqueleto de crustáceos y el músculo o la piel de algunos peces. Sin embargo, su función fundamental en la naturaleza es tener participación en procesos fotosintéticos (captación de luz, fotoprotección, disipación de excesos de energía, desactivación de oxígeno singlete, etc.) (Meléndez *et al.*, 2007).

Químicamente, los carotenoides son terpenoides, formados básicamente por ocho unidades de isopreno, de tal forma que la unión de cada unidad se invierte en el centro de la molécula. En los carotenoides naturales sólo se encuentran tres elementos: carbono, hidrógeno y oxígeno. El oxígeno puede estar presente como grupo hidroxilo, metoxilo, epoxi, carboxilo o carbonilo. Dentro de los carotenoides se puede distinguir dos grupos: los

carotenos, que son hidrocarburos, y las xantofilas, que poseen oxígeno en su molécula (Meléndez *et al.*, 2007). En cuanto a sus actividades biológicas, los carotenoides han sido relacionado con la reducción del riesgo de desarrollar enfermedades como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, las cataratas y la degeneración macular (Sánchez *et al.*, 2014).

En la elaboración de jugo de murta para consumo humano se utiliza agua, lo que indicaría mayor presencia de compuestos hidrosolubles, a diferencia de los estudios de identificación y cuantificación, en los que se utilizan diferentes metodologías de extracción con solventes orgánicos. Un parámetro a considerar en la elaboración del jugo es el color. Debido a que consumidores manifiestan una fuerte preferencia por aquellos productos de apariencia atractiva y el color es el primer atributo que se juzga.

El color es una cualidad organoléptica de los alimentos (FIGURA y Teixeira, 2007). A parte de ser un fenómeno psíquico o psicológico, es el resultado de la evaluación de la energía radiante (magnitud física) en términos de una correlación visual (psicológica) y está basada en las propiedades del ojo humano (fisiológicas). Según Bello (2008) el color es la propiedad que se aprecia por el sentido de la vista, cuando le estimula la luz reflejada por el alimento que contiene sustancias con grupos cromóforos, capaces de absorber parte de las radiaciones luminosas dentro de una determinada longitud de onda.

En el caso de un jugo natural sin aditivos ni colorantes, según Bello (2008) el color está dado por la radiación luminosa que refleja, la cual es en función de las moléculas de ciertos grupos funcionales orgánicos que integran sus estructuras químicas.

Para otorgar la propiedad de ser colorante necesita responder a tres requisitos esenciales:

- 1.- **Presencia de grupos cromóforos:** un cromóforo es una parte o conjunto de átomos de una molécula responsables del color. Estos se encuentran en sistemas conjugados π o complejos metálicos. En la primera forma, los niveles de energía que alcanzan los electrones son orbitales π generados a partir de series de enlaces

simples y dobles alternados, como sucede en los sistemas aromáticos. Entre los ejemplos más comunes podemos encontrar a los licopenos, β -carotenos, y antocianinas. Los cromóforos de complejos metálicos surgen de la división de orbitales d al vincular metales de transición con ligantes. Algunos ejemplos de estos cromóforos son: la clorofila, la hemoglobina y la hemocianina. Una característica común en bioquímica son los cromóforos formados por cuatro anillos de pirrol, que pueden ser de dos tipos, 1) pirroles en cadena abierta, no metálica: fitocromo, ficobilina, y bilirrubina y, 2) pirroles en anillo (porfirina), con un ion metálico en el medio: hemoglobina, clorofila.

2.- Combinación de los grupos cromóforos con estructuras cíclicas, tal como el radical bencilo ($C_6H_5\cdot$).

3.- Incluir en la estructura total grupos auxocromos, es decir, grupos ácidos (carboxilos) o básicos (aminos), capaces de estar ionizados según el pH del medio y ofrecer de este modo una coloración determinada.

El color es un factor determinante de la calidad en la industria alimentaria. Específicamente en jugos, puede ser un indicador de la calidad nutricional y funcional durante el almacenamiento. La calidad de un alimento con propiedades curativas se ha convertido en un problema importante de abordar, ya que no sólo debe considerar la inocuidad alimentaria, sino también la perduración de las propiedades benéficas para la salud. Por lo tanto, uno de los parámetros a evaluar es la degradación de los pigmentos (Burdurlu *et al.* 2006) que a la vez se relaciona con la capacidad antioxidante y la variabilidad del color.

La capacidad antioxidante o propiedades antioxidantes es una de las cualidades beneficiosas cada vez más valorada en las frutas y las hortalizas por los consumidores. Generalmente, un antioxidante es definido como aquella sustancia natural o artificial con capacidad para neutralizar y proteger a un sistema biológico frente a radicales libres, tales como los radicales de oxígeno, los de nitrógeno y los radicales lipídicos. En química, un radical (antes radical libre) es una especie química (orgánica o inorgánica), caracterizada

por poseer uno o más electrones desapareados. Se forma en el intermedio de reacciones químicas, a partir de la ruptura homolítica de una molécula y, en general, es extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo y de vida media muy corta (milisegundos). En esta investigación se estudia la relación existente entre la actividad antioxidante de los jugos de murta, desarrollando una evaluación preliminar del efecto de procesamiento sobre la murta en una extracción con vapor de agua, analizando el grado de extracción y la estabilidad de pigmentos naturales, polifenoles, antocianinas, clorofilas, carotenoides y capacidad antioxidante del jugo de murta, estableciendo la relación de los pigmentos con la variación del color y capacidad antioxidante, por lo cual se postula lo siguiente:

Hipótesis de trabajo Los compuestos bioactivos del jugo de murta (*Ugni molinae* T.) obtenido por extracción con el vapor son de distinta naturaleza y tienen distinta estabilidad durante el almacenamiento.

Objetivo General: Evaluar el proceso de degradación de los principales compuestos bioactivos de jugo de murta extraído con vapor, bajo distintas condiciones de operación y de almacenamiento.

Objetivos específicos:

- Cuantificar el contenido de polifenoles, antocianinas, clorofilas y carotenoides totales en el jugo, para cada condición de almacenamiento.
- Determinar la actividad antioxidante en el jugo, para cada condición de almacenamiento.
- Evaluar el efecto de procesamiento con vapor de agua sobre los compuestos bioactivos del extracto de murta.
- Evaluar el efecto del almacenamiento sobre los compuestos bioactivos del extracto de murta.
- Evaluar el color del jugo, en función de la concentración de pigmentos, para cada tiempo de procesamiento y para distintas condiciones de almacenamiento.

20 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Ubicación del estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, en la ciudad de Valdivia, Chile.

2.2 Materiales

Materia prima: La murta (*Ugni molinae* Turcz) fue adquirida en el mes de abril de 2013 en la ciudad de Valdivia-Chile y se mantuvo almacenada en un congelador a -20 °C hasta enero del 2014, momento en que se utilizó para realizar los ensayos.

Reactivos y equipos: Estufa (Mettler 100-800, Alemania), espectrofotómetro (Rayleigh, modelo UV-1601, CHINA), pH-metro Fischer Accumet modelo 210 y colorímetro electrónico analizador de líquidos LMT1 Dr. LANGE. Los reactivos utilizados fueron adquiridos de Merck, Chile, los cuales correspondieron a reactivo Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio anhidro p.a., ácido gálico (anhidro, para síntesis), Trolox, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), éter de petróleo 0.1 N, acetona 85 % v/v, carbonato de calcio precipitado.

2.3 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado consiste en un diseño factorial multinivel $3^1 \times 3^1 \times 11^1$ con tres repeticiones. En primer lugar, se utilizó el concepto de nivel, representado por los números 3, 3 y 11, que significan 3 tiempos de extracción, 3 temperaturas de almacenamiento y 11 días no correlativos de tiempos de almacenamiento. En la TABLA 1 se detallan los factores con sus respectivos niveles. A través de este diseño

se buscó evaluar la estabilidad y cantidad de los pigmentos del jugo de murta en el tiempo, considerando tres variables de respuesta: concentración de los pigmentos, capacidad antioxidante y color.

TABLA 1. Variables independientes del modelo (Factores)

Factor	Nivel
Tiempo de extracción por vapor (Et)	15- 30 - 45 min
Temperatura de almacenamiento (TA)	5- 20 -35 °C
Tiempo de almacenamiento (At)	1-2-5-8-12-14-20-23-16-30-34 días

Preparación de la muestra

Los ensayos consistieron en obtener extractos acuosos (jugos) desde la murta congelada. Esto se realizó por arrastre de vapor a tres tiempos de operación (15, 30 y 45 min) y posteriormente, los extractos fueron almacenados en frascos color ámbar a tres temperaturas (5, 20 y 35°C). Todas las muestras utilizadas para los análisis y los ensayos de almacenamiento tenían la calidad de un jugo apto para el consumo humano. El método por arrastre de vapor se describe en adelante (punto 2.4).

Como control se utilizó un método no térmico de laboratorio para extractos vegetales, que consiste en agregar 25 g de murta a 100 ml de agua y luego triturar en una licuadora. Se obtiene el filtrado o extracto, el cual se centrifuga durante 15 min a 4 °C y 3500 rpm. El extracto obtenido por este método, fue analizado del mismo modo que los extractos obtenidos en el proceso de extracción por arrastre de vapor. Este método se define a partir de ahora con la nomenclatura Lab.

2.4 Extracción por arrastre de vapor

Se basa en exponer la fruta a un flujo de vapor de agua, a temperatura de ebullición a presión atmosférica (± 100 °C), que fluye de manera ascendente, desde la base de un recipiente de aluminio, hasta alcanzar el contenedor con los frutos, provocando su

ablandamiento y iniciando la extracción. El vapor ascendente al entrar en contacto con la fruta, se condensa y el agua condensada desnaturaliza la fruta, permitiendo extraer el jugo, el cual se acumula en el receptáculo intermedio (receptáculo 2) y se mantiene caliente, por lo cual se logra un efecto de pasteurización y una condición de asepsia con el embotellado en caliente del producto pasteurizado (FIGURA 4).



FIGURA 4. Olla extractora de jugo por arrastre de vapor.

Funcionamiento:

- Receptáculo 1: Este recipiente contiene el agua para la producción de vapor a la temperatura de ebullición (100 °C, 1 atm) por contacto directo con una fuente de calor (p. ej. Un cocinilla a gas). El vapor generado atraviesa el receptáculo 2 y luego sube al receptáculo 3.
- Receptáculo 2: Este receptáculo es apilado sobre el receptáculo 1. Su función es acumular el jugo producto que escurre del tercer receptáculo donde ocurre la condensación del vapor sobre las frutas. Posee una válvula por donde se extrae el jugo listo para embotellar.
- Receptáculo 3: Este receptáculo tiene el diseño de un canasto apilado sobre el receptáculo 2. Su función es contener la fruta y permitir el paso del vapor a través del lecho de fruta.

2.5 Balance de materia

El balance establece que la masa de un sistema permanece siempre constante, debido a la ley de la conservación de la materia. En el experimento se realizaron los

balances de materia mediante la determinación de la masa inicial y final de cada proceso y un análisis proximal de las frutas residuales de la extracción. Para el análisis proximal se liofilizaron las muestras. Las **cenizas totales** se determinaron en la muestra calcinada según el método AOAC (N° 942.05, AOAC 1996). La **proteína bruta** se determinó según el método AOAC (N° 990.03, AOAC 1996). La **fibra cruda** se determinó según el método AOAC (N° 978.10, AOAC 1996). La **materia seca** se determinó según el método AOAC (N° 930.15, AOAC 1996).

2.8 'Determinación de concentración de polifenoles.

Los polifenoles fueron determinados como ácido gálico equivalente (GAE) por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (FC). A 40 μL de extracto se añadieron 3,16 ml de agua destilada, 200 μL de reactivo de FC y 600 μL de carbonato de sodio ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 20 %; la mezcla se agitó y se dejó en oscuridad por dos horas. Transcurrido el tiempo, se leyó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (Rayleigh UV-1601, China) (Chuah *et al.*, 2008). Para obtener la concentración de polifenoles por el método Folin-Ciocalteu se realizó una curva de calibración, utilizando ácido gálico a diferentes concentraciones y se midió en triplicado la absorbancia a 765 nm. Los valores se expresaron en ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de ácido gálico (FIGURA 5).

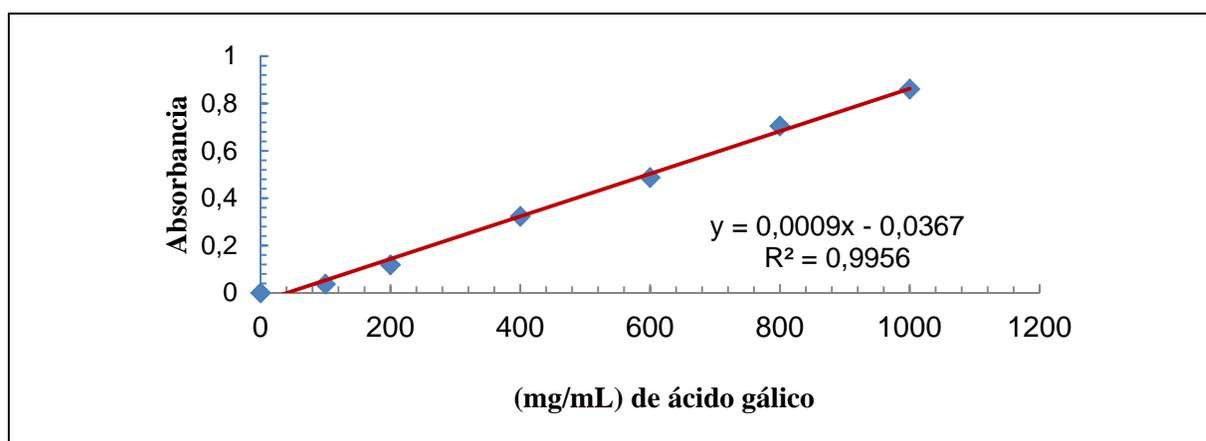


FIGURA 5. Curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar a 765 nm

2.7 Determinación del contenido de antocianinas

El contenido de antocianinas fue determinado según el método descrito por Wang *et al.* (2000); el extracto fue diluido con buffers de pH 1 y 4,5 para luego medir la absorbancia a 510 nm. Se eliminó la turbidez presente midiendo la absorbancia a 700 nm y sustrayendo este valor de la absorbancia a la longitud de onda de 510 nm (Ecuación 1).

$$A = [(A_{510} - A_{700})_{pH=1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH=4,5}] \quad \text{Ec. 1}$$

La concentración de antocianinas (C) se determinó mediante la siguiente fórmula expresada en ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

$$C = \frac{A \times PM \times FD}{\varepsilon \times L} \times 1000 \quad \text{Ec. 2}$$

Para el cálculo del contenido de antocianinas se utilizó el peso molecular (PM) y el coeficiente de extinción molar (ε) del pigmento antociano presente en mayor proporción. En la murta se encuentra cianidin-3-glucósido con PM de 449,2 g/mol y ε de 46230 mol cm^2 (RUIZ *et al.*, 2010). En la ecuación 2 A es la absorbancia, FD es el factor de dilución y L es la longitud en cm.

2.8 Determinación de clorofila total y de carotenos

Los pigmentos fotosintéticos y accesorios son componentes solubles en grasas por lo que su extracción puede realizarse con solventes orgánicos como acetona, metanol o etanol. En las extracciones de pigmentos hay que tomar en consideración la alta sensibilidad de los pigmentos fotosintéticos a la luz. Por esto, la extracción se realizó en condiciones de luz tenue, los pigmentos de la murta se determinaron a través de la espectrofotometría, con ecuaciones que relacionan la concentración de pigmentos en el extracto a muestrear con la absorbancia a distintas longitudes de onda.

El procedimiento se llevó a cabo a través del método oficial AOAC N° 942.04, (AOAC, 1996). Brevemente, a 10 ml de jugo de murta se le incorpora 0,4 g de carbonato de calcio, 10 ml de acetona al 85 % v/v, 5 ml de éter de petróleo de 0,1 N, y se agitó hasta que la separación completa de la pigmentación de la grasa y fibra soluble. Se incorporan 50 ml de agua destilada a la solución, que se filtró finalmente y se leyó la absorbancia del filtrado a 660, 642 y 470 nm con acetona como blanco. Las concentraciones en $\mu\text{g/ml}$ se calcularon con las siguientes fórmulas:

$$CHL_T = 7,12 A_{660} + 16.8 A_{642} \quad \text{Ec. 3}$$

$$CHL_a = 9,93 A_{660} - 0,777 A_{642} \quad \text{Ec.4}$$

$$CHL_b = 17,6 A_{642} - 2,81 A_{660} \quad \text{Ec.5}$$

$$CRT = (1000A_{470} - (1.82CHL_a) - (82.02 CHL_b))/ 198 \quad \text{Ec.6}$$

2.9 Capacidad antioxidante por método DPPH

Se determinó la capacidad antioxidante a través de la decoloración del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), propuesto por Brand-Williams *et al.*, (1995). La muestra del jugo almacenado se mezcló con 2,9 ml de DPPH en etanol con una absorbancia de 0,8. A la muestra se le miden los valores de absorbancia a 515 nm después de 20 min. La capacidad antioxidante se expresó en Trolox equivalente (mg TE/L). Para cuantificar la inhibición se desarrolló una curva de calibración, usando el reactivo de Trolox y aforado con metanol, logrando concentraciones de 25, 50, 75 y 100 ppm. Usando como blanco DPPH a una absorbancia de 0,8 equivalente a 4 mM. Se dejó reaccionar la solución durante 30 min, midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro a 515 nm a intervalos de 10 min. De esta forma se cuantificó la capacidad antioxidante en Trolox equivalente (FIGURA 6). El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{Abs_{t=0} - Abs_{t=final}}{Abs_{t=0}} \times 100 \quad \text{Ec.7}$$

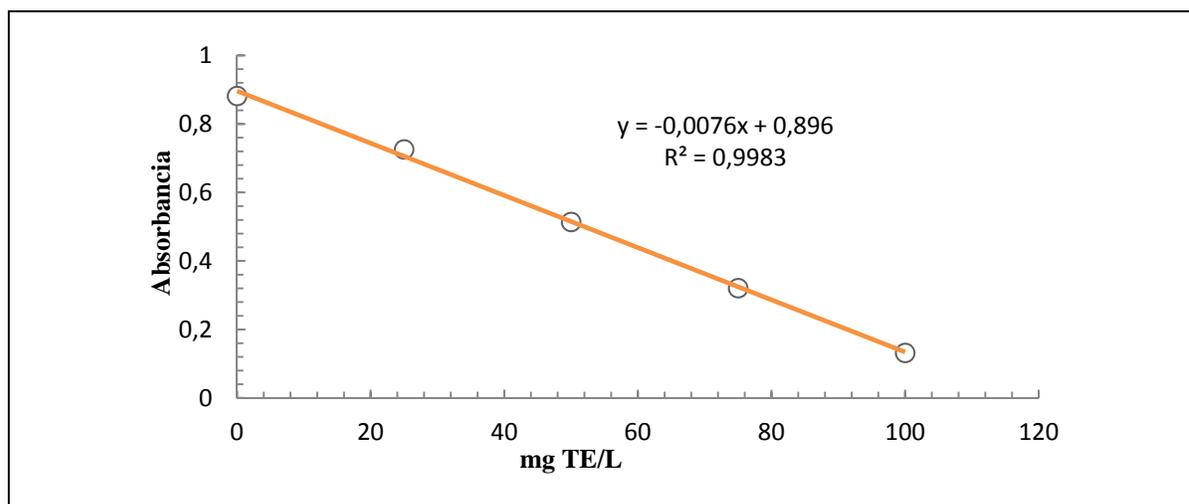


FIGURA 6. Curva de calibración capacidad antioxidante a 515 nm

2.10 Medición del color

El color se determinó a través del colorímetro de líquidos (Dr. Lange, Alemania), con características del observador normal 10°, iluminante estándar D65. El blanco de referencia utilizado fue de acuerdo a la norma DIN 5033 (modelo de referencia blanco estándar LZM 076 de Dr. Lange, Alemania) y los valores de referencia son $X_n = 78,2$, $Y_n = 83,1$, y $Z_n = 89,9$. Los valores CIE XYZ definidos fueron transformados al sistema esférico para obtener los valores L^* , a^* , b^* , H^* y C^* .

Las coordenadas L^* , a^* , b^* son magnitudes adimensionales y su equivalencia con el sistema CIE X, Y, Z es la siguiente:

$$L^* = 116 \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - 16 \quad \text{Ec.8}$$

$$a^* = 500 \left(\frac{X}{X_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} \quad \text{Ec.9}$$

$$b^* = 200 \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} \quad \text{Ec.10}$$

Donde X, Y, Z son los valores triestímulo de la muestra y X_n , Y_n , Z_n los del punto acromático correspondiente al iluminante empleado.

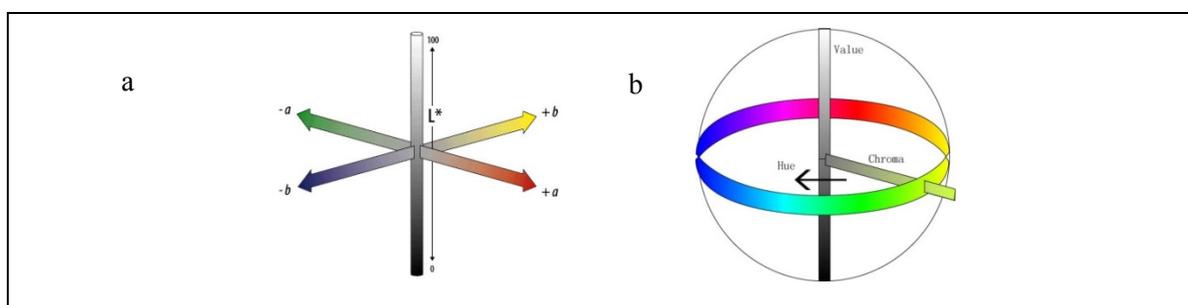


FIGURA 7. Sólido de color del sistema Hunter Lab Sistema de color tridimensional

El croma (C^*) y el tono (H^*) se obtienen de la siguiente ecuación:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad \text{Ec.11}$$

$$H^* = \arctan b^*/a^* \quad \text{Ec.12}$$

Se utilizó el valor ΔE para medir el cambio de color total, que se calculó con la siguiente ecuación (WU *et al* 2013):

$$\Delta E = \sqrt{(L_0 - L_i)^2 + (C_0 - C_i)^2 + (H_0 - H_i)^2} \quad \text{Ec.13}$$

El estudio relacionó ΔE , ΔL , Δa , Δb , ΔC y ΔH con el tiempo de extracción, almacenaje y las concentraciones de polifenoles, antocianinas y clorofilas.

2.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico para las pruebas de variables continuas como degradación de pigmentos, pérdida de color y capacidad antioxidante a lo largo del tiempo, usó el diseño factorial multinivel. Se utilizó el estadístico de Durbin-Watson (DW) ANOVA, para establecer las relaciones entre las variables. Conjuntamente, se desarrollaron predicciones del modelo a través de regresiones simples y múltiples.

Las diferencias entre los procesos de extracción se determinaron utilizando modelos lineales generalizados (GLM). Para este efecto, las variables se consideraron de forma categórica, a excepción de la variable (At), que se consideró de forma cuantitativa. Se establecieron las diferencias entre los tratamientos a través de comparaciones múltiples utilizando el test HSD de Tukey. Para todos los análisis estadísticos se consideraron las pruebas de normalidad, homogeneidad de varianza e independencia. Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando StatGraphics® Centurion IV (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA, USA).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo general evaluar el proceso de degradación de los principales compuestos bioactivos de jugo de murta extraído con vapor, bajo distintas condiciones de operación y de almacenamiento. Esta investigación permitirá, 1) determinar que el jugo tiene una mayor vida útil que la murta fresca, 2) identificar el tratamiento térmico más apropiado para la extracción de los pigmentos y, 3) cuantificar los pigmentos presentes durante el almacenamiento. Además, a través de esta investigación se fijan las condiciones de elaboración de un producto, en el cual se podrá determinar la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los antioxidantes presentes en la murta. En este capítulo se presentan los resultados y la discusión en torno a ellos.

3.1 Balance de materia

El balance de materia se obtuvo evaluando los parámetros que se muestran en las TABLAS 2 y 3. En el jugo se midió el rendimiento, el contenido de sólidos solubles, el pH y la cantidad de residuo de extracción (TABLA 2), al cual, se realizó el análisis proximal que consistió en la medición de cenizas, proteínas, extracto etéreo, fibra cruda y carbohidratos (TABLA 3).

El rendimiento del jugo para los tiempos de procesamiento de 15, 30, y 45 minutos, entregó una diferencia significativa con un nivel de confianza del 90%, siendo el mayor a 45 min. Esto se debería a que la fruta estuvo expuesta durante más tiempo al efecto del vapor, el cual produce ablandamiento del tejido, ruptura celular y por ende mayor liberación de jugo. Por otro lado, también aporta al rendimiento la mayor cantidad de agua de condensación.

Respecto a los sólidos solubles (SS) y el pH, se observó que el pH disminuyó a medida que aumenta la concentración de los sólidos solubles. Esto pudo deberse a una mayor extracción de ácidos orgánicos. La diferencia es significativa entre los valores de concentración de SS obtenidos a 15 min y 30 min, no así, entre los de 30 y 45 minutos,

aunque la concentración de SS obtenida a 45 min es levemente más baja. Esto se debe al efecto de una dilución por la disminución de SS en las frutas y la mayor cantidad de condensado que se tiene durante un tiempo prolongado de proceso. Esta baja junto con una dilución significó una extracción total de los ácidos orgánicos liberados del tejido celular. Se observó también una reducción en la cantidad residual de la murta extraída, lo cual indicó una pérdida gradual de materia en las frutas, correspondiendo al aumento de SS en el extracto.

En la TABLA 3 se muestra la composición de la murta después de la extracción a 3 distintos tiempos de proceso. Las muestras de murta fueron liofilizadas antes del análisis y se expresan en porcentaje de la masa seca. Se observó que la proporción de carbohidratos era mayor en la muestra fresca en comparación con el proceso de extracción con vapor; ésta disminuyó significativamente al aumentar el tiempo de proceso, de 77,3% a 72,4%, lo que indicó una lixiviación de azúcares y otras sustancias solubles en agua.

Por otra parte, la fibra cruda aumentó de 12,3% a 15,8% con el tiempo de proceso en forma significativa, no existiendo diferencia significativa entre el tratamiento de 30 y 45 min, lo que indicó una retención de dicha fibra y una disminución de la cantidad de masa seca total.

El extracto etéreo y las cenizas se mantuvieron estables en las distintas extracciones, lo que indicó que estos componentes quedaron retenidos en el tejido celular y no son arrastrados por el flujo de jugo.

TABLA 2. Rendimiento, sólidos solubles, pH y residuo por cada tiempo de procesamiento

Procesamiento	Rendimiento ml jugo/kg fruta	Sólidos solubles °brix	pH	Fruta residual kg/kg
15 min	1450±28,2 ^c	7,5±0,1 ^b	3,78±0,01 ^a	0,73±0,03 ^a
30 min	1570±31,8 ^b	7,9±0,1 ^a	3,76±0,01 ^b	0,64±0,03 ^b
45 min	1660±16,6 ^a	7,8±0,1 ^a	3,76±0,01 ^b	0,55±0,02 ^c

Con un nivel de confianza del 95%. Las letras diferentes, dentro de cada tratamiento, indican diferencias estadísticas para la prueba de Tukey (95%).

TABLA 3. Composición de la murta residual a distintos tiempos de extracción

Componente	Composición de las muestras liofilizadas del residuo de extracción a distintos tiempos de proceso			
	0 min	15 min	30 min	45 min
Cenizas	% 2,8 ± 0,1 ^a	2,7±0,2 ^a	2,8±0,1 ^a	2,8±0,1 ^a
Proteína	% 4,4 ± 0,1 ^d	4,8±0,1 ^c	5,0±0,1 ^b	5,6±0,1 ^a
Extracto etéreo	% 3,3 ± 0,1 ^a	3,3±0,1 ^a	2,7±0,2 ^b	3,4±0,1 ^a
Fibra cruda	% 12,3±0,1 ^c	13,2±0,1 ^b	15,7±0,1 ^a	15,8±0,1 ^a
Carbohidratos	% 77,3± 0,1 ^a	76,0±0,1 ^b	73,7±0,1 ^c	72,4±0,1 ^d

Con un nivel de confianza del 95%. Las letras diferentes, dentro de cada tratamiento, indican diferencias estadísticas para la prueba de Tukey (95%).

3.2 Variación del contenido de pigmentos, de la actividad antioxidante y del color en función del tiempo de extracción

La extracción del jugo de murta tratada bajo distintas condiciones de operación, generó diferencias altamente significativas ($p > 0,001$) en cuanto al contenido de pigmentos, la capacidad antioxidante y la variación de color (TABLA 5 y 6). Se observó también una correlación directa entre el contenido total de pigmentos y la capacidad antioxidante.

3.2.1 Pigmentos en función del tiempo de extracción

El contenido de pigmentos del extracto obtenido por el método no térmico de laboratorio resultó menor, que el del extracto obtenido por arrastre de vapor. Esto se debió a que, al no aplicar tratamiento térmico, los tejidos celulares en la fruta no se desnaturalizaron y los pigmentos quedaron atrapados en la matriz celular. A través de la cuantificación de los pigmentos se advirtió también, que existió una relación entre la cantidad de pigmentos y la capacidad antioxidante determinada. Para ambos parámetros se obtuvo la mayor concentración en el tratamiento de 30 min (TABLA 4).

TABLA 4. Comparación del sistema de extracción: contenido de pigmentos y DPPH

Tratamiento	Capacidad antioxidante y concentración de pigmentos en jugo de murta						
	DPPH	PFT	ACN	CHL _a	CHL _b	CRT	CHL _T
	μg TE/ ml	μg GAE/ml	μg/ml	μg/ml	μg/ml	μg/ml	μg/ml
	***	***	***	***	***	***	***
Lab	327,60±49 c	769,6 ± 7,21 d	2,1±0,10 d	1,0±0,1 b	2,1±0,2 d	1,2±0,0 c	3,3±0,3 d
15 min	3310,40±61 b	2573,3 ±1,90 b	4,4±0,20 c	4,2±0,3 b	9,2±0,1 c	5,2±1,1 cb	12,5±0,5 c
30 min	3643,70±37 a	2987,5±12,5 a	6,7±0,20 a	22,0±0,4 a	32,5±0,0 a	18,1±0,13 a	55,7±0,1 a
45 min	3381,80±65 b	2157,9± 8,32 c	5,6±0,20 b	17,6±0,2 a	30,3±0,0 b	8,4±1,0 b	47,5±0,1 b

Con un nivel de confianza del 95% la diferencia significativa de *** P < 0,001 en ANOVA factorial. Las letras diferentes, dentro de cada tratamiento, indican diferencias estadísticas para la prueba de Tukey (95%).

Polifenoles totales

Las muestras de murta fresca utilizadas para el proceso de extracción son de la misma procedencia que las muestras utilizadas por Rodríguez *et al.*, (2014). Se observó que en el proceso de extracción por arrastre de vapor, sólo se logró extraer una porción de los pigmentos existente en la fruta fresca. El porcentaje de pigmentos extraído en el jugo de murta para los distintos tiempos de proceso fue de 6,23% (Lab), 7,55% (15 min), 9,50 % (30 min) y 7,25 % (45 min). Esto indicó una extracción de menos del 10% de estos compuestos bioactivos presentes en la fruta fresca al utilizar agua como solvente, lo que dejó también un sub-producto con un importante contenido de PFT. La mayor concentración de pigmentos se obtuvo después de 30 min de extracción.

Rodríguez *et al.*, (2014) reportaron que el contenido de PFT en murta fresca es de 4941±399 mg GAE/100 g dm, estando dentro de la gama de valores reportados para las frutas, tales como ciruelas, moras, arándanos y fresas (Balasundram *et al.*, 2006.; Vasco *et al.*, 2008.; Fu *et al.*, 2011). Por otra parte, Rubilar *et al.*, (2011) reportaron un contenido de PFT en murta fresca de 1010 ±160 mg GAE/100 g dm. Los resultados reportados por Rodríguez *et al.*, (2014) y Rubilar *et al.*, (2011) son distintos y demuestran una posible variación en el contenido de PFT en la murta. También es probable que estas diferencias se deban al uso de otras metodologías de extracción con diferentes solventes orgánicos,

además de la variabilidad propia entre bayas de murta. El método de extracción utilizado por Rubilar *et al.*, (2011) hace uso de éter de petróleo y acetona, lo que explica también el menor contenido de los polifenoles, comparando con los valores reportados por Rodríguez *et al.*, (2014).

Antocianinas.

La mayor concentración de antocianinas se obtuvo a los 30 minutos de extracción, seguida por la de 15 min y finalmente la de 45 minutos. Esto indicó que después de 45 min, comenzó una dilución, debido a que el vapor condensado empezó a disolver cada vez menor cantidad de pigmentos, cayendo así la concentración de antocianinas. En el caso de la muestra Lab los pigmentos quedan atrapados en el filtrado sobre todo en las cáscaras.

Aunque las antocianinas son pigmentos hidrosolubles, las concentraciones fueron bajas, producto de la alta vulnerabilidad de estos compuestos a la temperatura (Kirca y Cemeroglu, 2003; Kirca *et al.*, 2007; Harbourne *et al.*, 2008), a la presencia de oxígeno (Starr y Francis, 1968), ácido ascórbico (Shrikhande y Francis, 1974) y peróxido de hidrógeno (Özkan M *et al* 2002, 2005), así como a cambios en el pH (Kirca *et al.*, 2007; Fossen *et al.*, 1998). Entre las antocianinas presentes en la murta se han reportado la peonidina-3-glucósido y la cianidina-3-glucósido, con una alta variabilidad entre las zonas de cosecha. Para la ciudad de Valdivia se reportaron concentraciones de $0,19 \pm 0,01$ y $0,24 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/g}$ murta fresca (Ruiz *et al*, 2010). Estos valores indicarían que se transfiere al jugo solo entre 8 y 12 % de las antocianinas.

Clorofilas

La mayor concentración de clorofilas al igual que los demás pigmentos se obtuvo en la extracción de 30 minutos, siendo la clorofila b la más estable a la temperatura. Sin embargo, a los 45 min ocurre el proceso de dilución como con los demás pigmentos.

Las principales clorofilas en las plantas incluyen clorofilas a y b, que se producen en una relación aproximada de 3:1 (Ferruzzi y Blakeslee, 2007). A través de la extracción por

vapor no se mantuvo esta relación (TABLA 4). Durante el tratamiento térmico se degradan las clorofilas, produciéndose reacciones químicas, que implicaron la formación de derivados de clorofila. Teng y Chen (1999) reportan que las principales transformaciones son isómeros de clorofila (clorofilas a' y b') y feofitinas a y b. Las clorofilas a' y b' tienen el mismo espectro de absorción y por lo tanto, su formación no causa cambios de color. Sin embargo, la formación de feofitina está acompañada por la modificación de color verde brillante a marrón oliva (Clydesdale y Francis, 1976). Las feofitinas se forman a partir de las clorofilas a través del reemplazo de magnesio en el anillo de porfirina, por los ácidos orgánicos liberados del tratamiento térmico. Se han propuesto opciones con tratamiento térmico para conservar el color verde brillante de la clorofila. Por ejemplo, la neutralización de los ácidos presentes, el procesamiento de alta temperatura con tiempos cortos y aplicación de complejos metalo. No obstante, la mayoría de estos métodos han tenido un éxito limitado.

A pesar de la baja concentración de clorofilas en los jugos debido al severo tratamiento térmico, el impacto real sobre los beneficios para la salud no es totalmente reducido. La metodología empleada no midió los derivados de las clorofilas, que se producen durante la extracción y, se ha demostrado que las clorofilas y sus derivados son importantes promotores de la salud en funciones anti-mutagénicas, anticancerígenas y antiinflamatorias (Ferruzzi y Blakeslee, 2007).

Carotenos

La mayor concentración de carotenos fue obtenida a los 30 min, y a los 45 min ocurre una baja importante, lo cual pudo deberse al mayor tiempo de exposición a la fuente de calor, causando la degradación de los carotenos (CRT). También pudo deberse al efecto de dilución descrito anteriormente. La concentración de carotenos obtenido a 45 min de extracción no se diferenció significativamente de la concentración obtenida con 15 min de proceso, la cual también fue igual a la concentración de la muestra Lab.

Las bajas concentraciones de carotenoides en el jugo de murta puede deberse también a que son compuestos lipídicos, aunque existen algunas excepciones, por lo que son insolubles en agua y solubles sólo en disolventes orgánicos como acetona, metanol, éter dietílico, hexano, cloroformo y piridina, entre muchos otros.

Dentro de las excepciones que son solubles en agua están los carotenoides ácidos que pueden formar sales sódicas o potásicas solubles en agua después de un tratamiento con álcali, como es el caso de bixina, astaceno o mitiloxantina (Britton *et al.*, 1992) y (Schiedt *et al.*, 1995). Las caroteno proteínas son también solubles en agua y muy estables (Britton, 1983). El color de estos complejos es estable durante años a temperatura ambiente y en contacto con el aire, por lo que adquieren un gran interés como posible colorante (Armenta *et al.*, 2002).

La acción de los carotenoides en la salud humana está íntimamente relacionada con su estructura y su eficacia, es disímil en diferentes carotenoides (Britton *et al.*, 2004). Por lo tanto, es necesaria la identificación y cuantificación precisa de los carotenoides de forma individual. En murta está presente el β caroteno y se informó con $44,26 \pm 1,17$ mg por 100 g de materia seca (Rodríguez *et al.*, 2013). Posiblemente, los carotenoides extraídos con vapor son de otra naturaleza, debido a la baja solubilidad que presenta el β caroteno al agua como solvente. Aunque el calor pudo ayudar a extraer, no se podría afirmar en este estudio que se logró obtener carotenos hidrofílicos. Por otra parte si llegó a estar presente, el carácter hidrofóbico de la mayoría de los carotenoides hace que tiendan a la segregación y la cristalización en el medio acuoso (Britton, 1995).

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante tiene relación directa con la concentración de pigmentos presentes; al igual que los pigmentos la mayor extracción fue a los 30 min, no hubo diferencia significativa entre el tratamiento de 15 y 45 min. La baja capacidad antioxidante indicaría que a 15 min no se alcanzan a extraer todos los pigmentos, mientras que a los 45

min ocurre un efecto de dilución. Sin embargo, a 45 min de proceso la dilución fue menor que en el caso de los pigmentos, lo que pudo deberse a que los pigmentos se transformaron en algún otro compuesto con capacidad antioxidante. Rodríguez *et al.* (2014), reportan que la capacidad antioxidante en murta fresca es de $45.656 \pm 2.367 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$. Dado que utilizaron la misma cosecha que en este estudio, se podría afirmar que se extrajo alrededor de solo 4% de la capacidad antioxidante de la murta. Dado que se extrajeron mayor cantidad de pigmentos, existe la posibilidad que el tratamiento térmico tuvo un efecto sobre la capacidad antioxidante de los pigmentos.

3.2.2. Variación del color del extracto en función del tiempo de extracción

El color es una característica de valoración física y de calidad en los alimentos, la cual tiene diferencias altamente significativas en el jugo de murta, en todos sus componentes ($p \leq 0,0001$). La variación de color total ΔE , respecto al tratamiento de extracción por vapor se incrementó a medida que aumentó el tiempo de proceso, teniendo el mayor diferencial a los 45 min. Sin embargo, el tratamiento no térmico Lab, tuvo un valor mayor de ΔE que en el tratamiento térmico de 15 min, esto pudo deberse a posible eliminación de pigmentos en el proceso de filtración o pudo haber ocurrido una oxidación de los compuestos, lo que llevó a cambios importantes en el color. El valor de Δb , el cual otorga las tonalidades desde el amarillo al azul, tuvo una mayor diferencia a los 45 min de extracción, al igual que ΔC y CHL_a que no demostró diferencia significativa entre los jugos de 30 y de 45 min de extracción. Esto indicó una correlación significativa entre la variable Δb y CHL_a por la tonalidad, además indicó también que CHL_a fue la responsable de la saturación del color observada en el valor de ΔC . Por otra parte, Roca (2006) encontró que CHL_b se transforma en CHL_a , por lo cual ambos serían responsables de la saturación del color. La variación del tono ΔH indicó que el color fue definido a los 15 min de extracción y después de ello sólo hubo una saturación del color.

En cuanto a la variación de luminosidad (ΔL), el valor mayor de la claridad se obtuvo en el tratamiento no térmico (Lab). La luminosidad en el tratamiento térmico fue menor que en el tratamiento no térmico. Sin embargo, se observó que la luminosidad aumentó con el tiempo de operación (TABLA 5). Esto pudo deberse a que en el tratamiento no térmico, hubo menor paso de pigmentos, contrario a lo que ocurrió después de 15 min de extracción, donde el tono ya fue definido. Tanto en 30 como en 15 min hay cierta destrucción de pigmentos, favoreciendo el aumento en ΔL con el tiempo de extracción (TABLA 5).

En el caso de la variación de color Δa , el cual otorgó las tonalidades desde el verde al rojo, hay un comportamiento similar a lo ocurrido con los pigmentos, indicando que Δa puede ser una posible herramienta de valoración de los pigmentos.

TABLA 5. Comparación del sistema de extracción de acuerdo a la diferencia de color

Tratamiento	Componente del color del jugo de murta					
	ΔL	Δa	Δb	ΔC	Δh	ΔE
	***	***	***	***	***	***
Lab	88,90±0,00 a	28,60±0,01 c	29,8±0,00 d	41,30±0,00 d	0,80±0,00 c	98,10±0,00 c
15 min	58,20±0,07 d	22,10±0,68 d	45,6±0,11 c	50,70±0,39 c	1,11±0,01 a	77,20±0,31 d
30 min	64,70±0,06 c	66,30±0,36 a	57±0,10 b	87,40±0,22 b	0,70±0,00 d	108,80±1,10 b
45 min	78,50±0,18 b	61,90±0,63 b	80,6±0,30 a	101,70±0,21 a	0,91±0,01 b	128,40±0,15 a

Con un nivel de confianza del 95% la diferencia significativa de *** $P < 0,001$ en ANOVA factorial. Las letras diferentes, dentro de cada tratamiento, indican diferencias estadísticas para la prueba de Tukey (95%).

3.3 Estabilidad de los pigmentos, la capacidad antioxidante y el color en función de las condiciones de almacenamiento

En los jugos tratados con distintos tiempos de extracción con vapor, se evaluó la estabilidad de los parámetros: cantidad de pigmentos, capacidad antioxidante y color, para las condiciones de almacenamiento que fueron definidas en función de la temperatura y del

tiempo. En términos generales, como era de esperar, los pigmentos y el color se degradan y la capacidad antioxidante disminuye a lo largo del tiempo de almacenamiento.

3.3.1 Estabilidad de los pigmentos y capacidad antioxidante

El tiempo de almacenamiento es la causa de mayor impacto sobre la degradación, tanto en los pigmentos como en la capacidad antioxidante (TABLA 6), lo cual confirmó la relación existente entre ambos parámetros.

TABLA 6. Estabilidad de pigmentos y DPPH

	DPPH	% IRL	PFT	ACN	CHL _a	CHL _b	CRT	CHL _T
1. Et	ns	***	**	**	ns	ns	ns	ns
2. TA	ns	***	***	***	ns	*	***	*
3. At	***	***	***	***	***	***	***	***
1 vs 2	ns	ns	*	***	ns	ns	ns	ns
1 vs 3	ns	ns	*	*	***	***	ns	***
2 vs 3	ns	***	ns	ns	ns	ns	*	ns
R²	89%	81%	72%	70%	33%	35%	23%	35%
DW	0,000	0,000	0,985	0,801	0,000	0,000	0,201	0,000

Con un nivel de confianza del 95% la diferencia significativa de * P <0,1; ** P <0,05, *** P <0,001 en ANOVA. (At: tiempo de almacenamiento (días); Et: Tiempo de extracción (min); TA: temperatura de almacenamiento °C); estadístico de Durbin-Watson (DW)

Polifenoles

En el jugo, los polifenoles fueron afectados significativamente ($p \leq 0,0001$) por el tiempo de extracción (Et), el tiempo de almacenamiento (At) y la temperatura de almacenamiento (TA) con un 99% de confianza. La interacción tiempo de almacenamiento (At) versus temperatura de almacenamiento (TA) ($p \leq 0,0155$) y la interacción tiempo de extracción (Et) versus tiempo de almacenamiento (At) ($p \leq 0,0323$) fueron significativas al 90 % como se observa en la FIGURA 8.

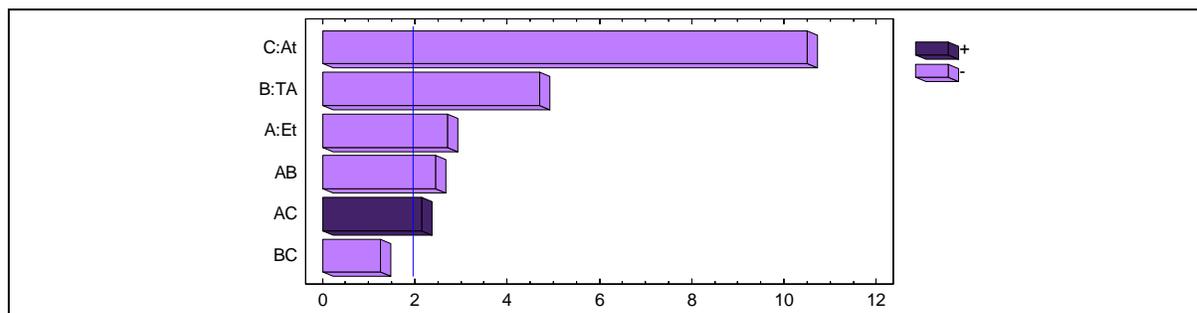


FIGURA 8. Diagrama de Pareto estandarizado para la variable de respuesta polifenoles.

(At: tiempo de almacenamiento (días); Et: Tiempo de extracción (min) ; TA: temperatura de almacenamiento °C)

Estos resultados concuerdan con el comportamiento de los polifenoles en el vino, donde los principales procesos de degradación de los compuestos fenólicos tienen lugar en los primeros pasos de la vinificación y continúan durante el almacenamiento (Gómez y Cano, 2011).

En el gráfico de superficie para el almacenamiento del extracto de murta a 5 °C (FIGURA 9), se predice que la mayor extracción ocurrió ya a un tiempo de 27 min con una variabilidad de 72% sobre los polifenoles totales (PFT), en el cual sólo fue altamente significativo el tiempo de almacenamiento (At) ($p \leq 0,0001$).

Por lo general, se observa también un descenso del contenido de los PFT en la interacción del tiempo de almacenamiento versus la temperatura de almacenamiento (FIGURAS 10 y 12). Por lo tanto, a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento disminuye la concentración de PFT, siendo la temperatura más adecuada de conservación 5 °C y la máxima degradación 20,5% por 30 min de extracción medidos al día 34. En jugo de membrillos almacenados por 6 meses, la mejor conservación se obtuvo a 4 °C con degradación máxima de 15 % y, a 30 °C se degradó 37 % (Wojdyło *et al.*, 2014).

Al analizar el modelo con los 3 factores la predicción se redujo a 53 % sobre la variabilidad de los polifenoles, el modelo de predicción se muestra en la ecuación 14.

$$PFT = 2609,08 - 5,03137Et + 6,05254TA - 19,4027At - 0,196213(Et \cdot TA) + 0,393462(Et \cdot At) - 0,192286(TA \cdot At) \quad \text{Ec.14}$$

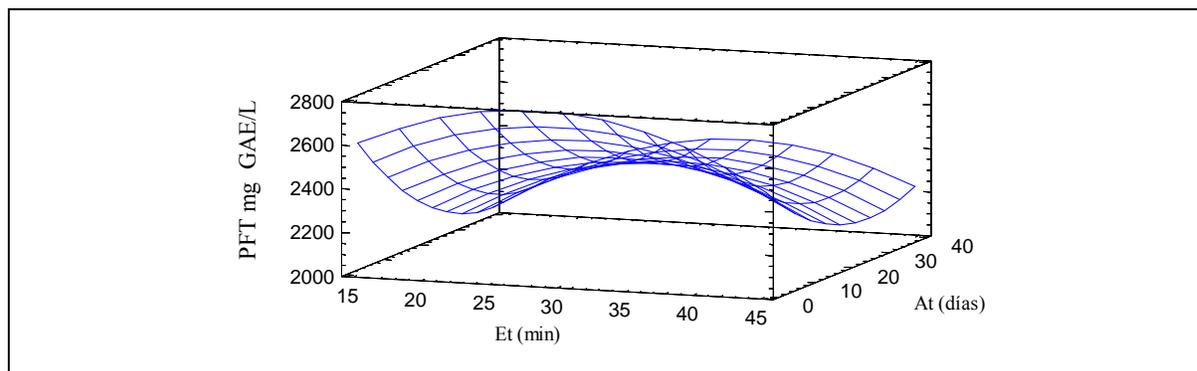


FIGURA 9. Efecto del factor tiempo de almacenamiento a 5°C y tiempo de extracción en relación a los polifenoles totales.

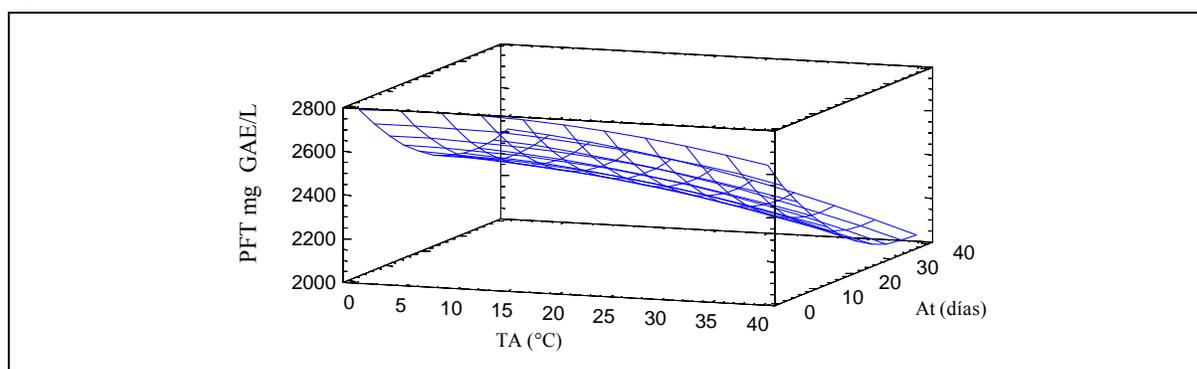


FIGURA 10. Efecto del factor tiempo y temperatura de almacenamiento a un tiempo de extracción 30 min en relación a los polifenoles totales.

Antocianinas

La principal causa de degradación de las antocianinas fue el tiempo de almacenamiento (At) ($p \leq 0,000$), posteriormente la temperatura de almacenamiento (TA) ($p \leq 0,0000$) y la interacción tiempo de extracción (Et)*(TA) ($p \leq 0,001$). (Et) ($p \leq 0,0026$) afectó incrementando las antocianinas, no afectando negativamente sobre la degradación en el tiempo (FIGURA 11).

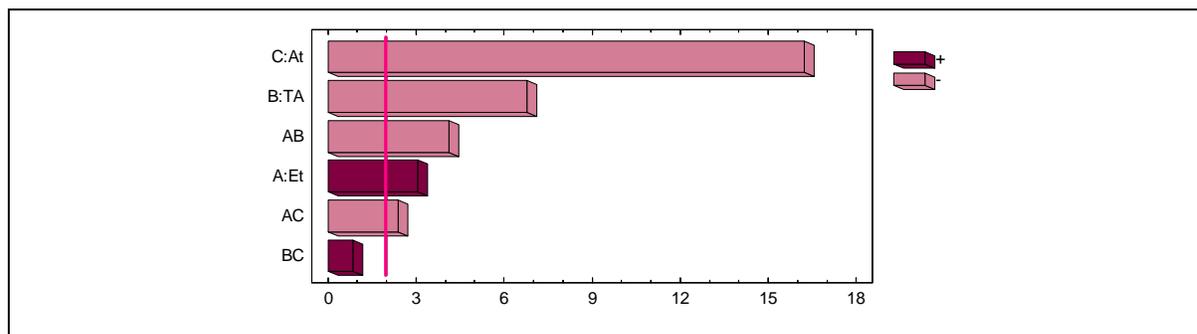


FIGURA 11: Diagrama de Pareto estandarizado para la variable de respuesta antocianinas.

At: tiempo de almacenamiento (días); Et: Tiempo de extracción (min) ; TA: temperatura de almacenamiento °C)

El tiempo de almacenamiento como también de procesamiento tiene un efecto significativo (FIGURA 12), sobre las antocianinas, altamente inestables y muy susceptibles a la degradación. La estabilidad de las antocianinas es generalmente afectada por varios factores tales como pH, temperatura de almacenamiento, estructura química, concentración, luz, oxígeno, solventes, presencia de enzimas, flavonoides, proteínas e iones metálicos (Owusu, 2005; Castañeda *et al.*, 2009; Olaya *et al.*, 2009). La mayor concentración de antocianinas después de 22 días de almacenamiento se logró a 5 °C con una retención de 91 %, luego a 20 °C hubo una retención de 48 %, mientras que a 35 °C se mantuvo estable solo el 17 %. De acuerdo a lo reportado por Saucier (2010), la temperatura de almacenamiento, los tratamientos térmicos y enzimáticos en condiciones anaeróbicas son factores responsables de la pérdida de antocianinas, desplazando los equilibrios de éstas hacia las formas de chalconas, las cuales se les atribuyen características como de los flavonoides, que cuentan con diversas actividades biológicas.

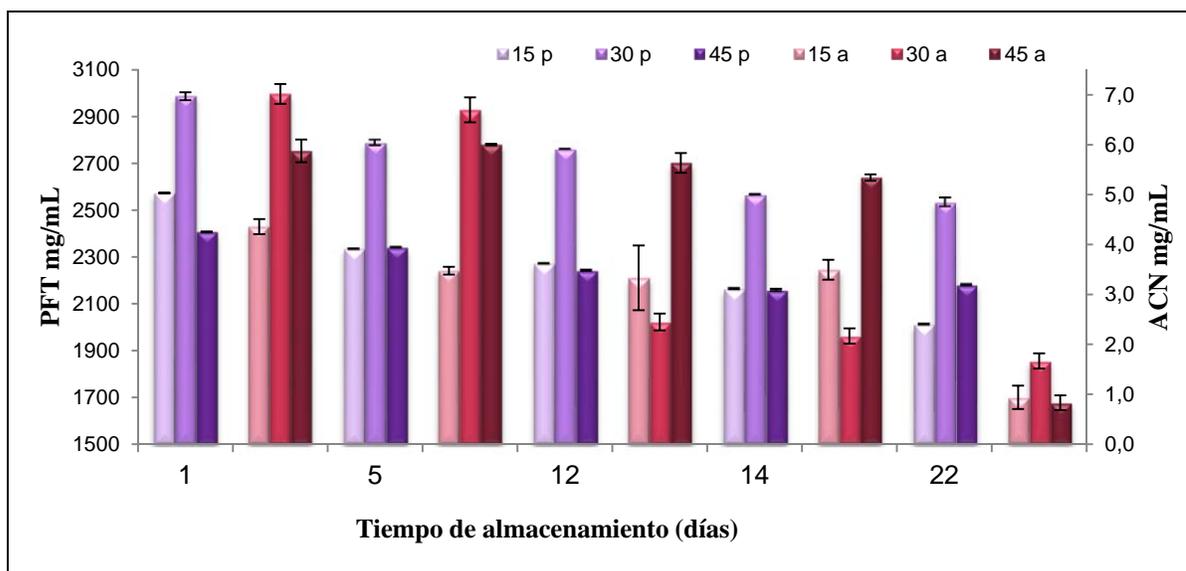


FIGURA 12. Efecto del factor tiempo de almacenamiento a 5 °C y tiempo de extracción en relación a la extracción de polifenoles totales (PFT) y antocianinas (ACN) (15 p: 15 min de extracción de PT; 30 p: 30 min de extracción de PT; 45 p: 45 min de extracción de PT; 15 a: 15 min de extracción de An; 30 a: 30 min de extracción de An; 45 a: 45 min de extracción de An)

Se construyó un modelo para describir la variación de la concentración de antocianinas durante el almacenamiento (FIGURA 13). El modelo explicó el 69 % de la variabilidad de éstas con el tiempo de 30 min y manteniendo la temperatura a 5 °C con una concentración inicial de antocianinas de 6,18 mg/L. Se observó una marcada relación entre la degradación y la temperatura (Ec.15).

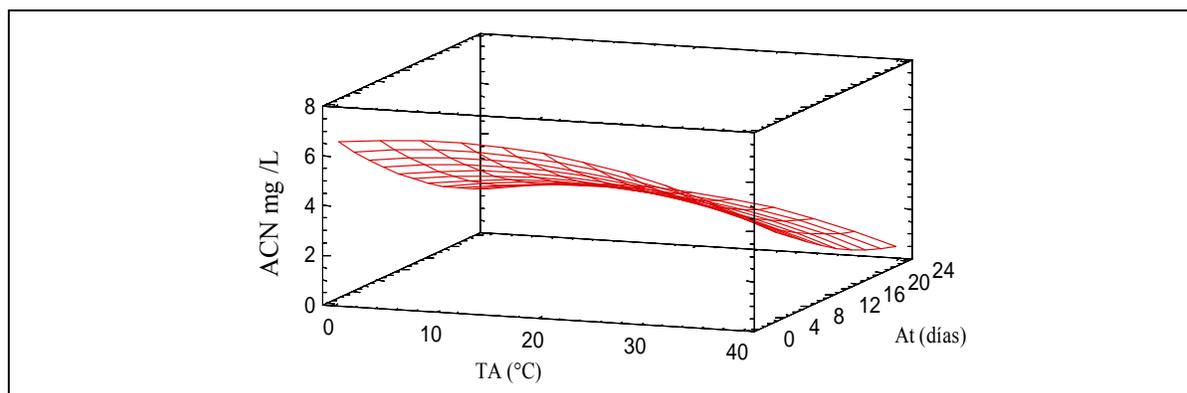


FIGURA 13. Efecto sobre la concentración de antocianinas de los factores tiempo y temperatura de almacenamiento en un jugo de murta obtenido con 30 min de extracción

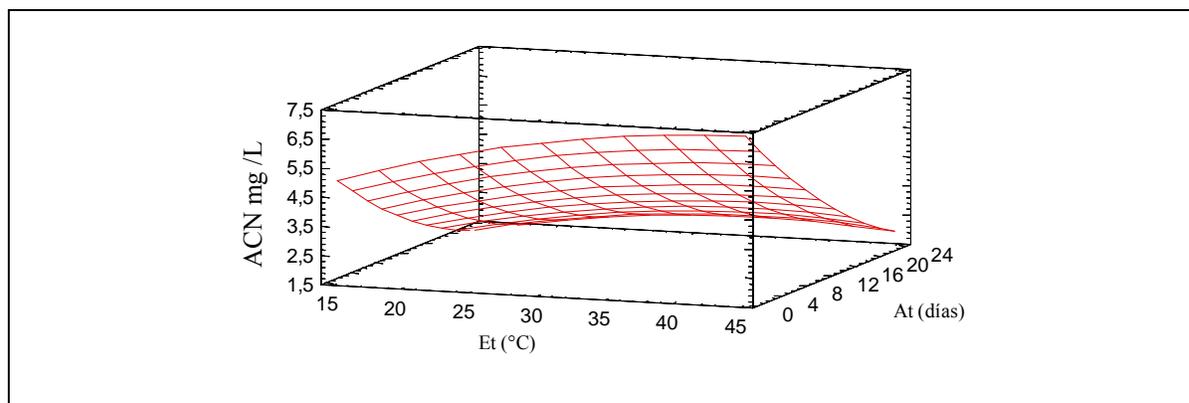


FIGURA 14. Efecto sobre las antocianinas los factores tiempos de almacenamiento y extracción, en un jugo de murta almacenado a 5°C.

En las FIGURAS 12 a 14, se observa que el efecto de temperatura, tiempo de extracción y almacenamiento sobre la concentración de la extracción de antocianinas no aumenta significativamente entre 30 a 45 min de proceso. Se puede predecir con una variabilidad de 69 % la concentración de antocianinas con el siguiente modelo multifactorial de la ecuación 15.

$$ACN = 3,91423 \cdot 0,0852047 \cdot Et + 0,0105754 \cdot TA - 0,131533 \cdot At - 0,00206123 \cdot Et \cdot TA - 0,00216449 \cdot Et \cdot At + 0,000782367 \cdot Et \cdot At \quad \text{Ec. 15}$$

Clorofilas a, b y carotenos

Se observó un decrecimiento de los pigmentos fotosintéticos (clorofilas a, b y total) a lo largo del almacenamiento. Esta reducción después de dos semanas y posteriormente llegó a valores constantes (FIGURA 15).

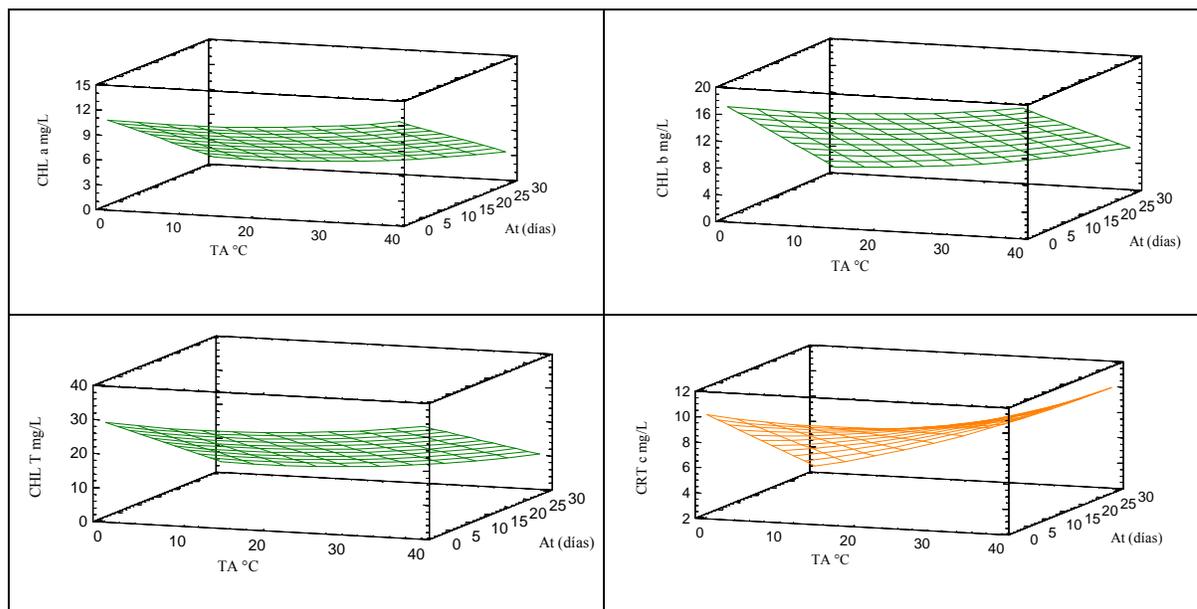


FIGURA 15. Efecto sobre los factores tiempo y temperatura de almacenamiento a 30 min de extracción en relación a los pigmentos fotosintéticos. Carotenoides (CRT) y Clorofila (CHL)

Sé encontró en el jugo una baja detección de clorofilas y carotenoides. Para las clorofilas existe una correlación demostrada a través de Durbin-Watson, no así, para los carotenoides (TABLA 6). Lo más probable es que sólo existe correlación entre las clorofilas dado que se está midiendo también derivados de clorofila a' y b' que tienen el mismo espectro de absorbancia. Estas fueron afectadas altamente por la interacción Et versus At, lo cual se atribuye a la conversión de la clorofila en feofitina, dado que se perdió el átomo de magnesio o se rompió el anillo porfirínico por el efecto de la temperatura de almacenamiento a lo largo del tiempo. El tiempo es altamente significativo en las clorofilas o derivados de clorofilas detectados en el jugo.

El tiempo de extracción (Et) no fue significativo en los pigmentos fotosintéticos, esto pudo deberse a la destrucción y transformación de las clorofilas y los carotenoides, al igual que la interacción (Et) y (TA), ambas relacionadas con la temperatura, lo que indicaría que los pigmentos que lograron mantenerse al tratamiento son resistentes a la temperatura.

Capacidad Antioxidante

El tiempo de almacenamiento es altamente significativo sobre la capacidad antioxidante (FIGURA 16), en relación al porcentaje de inhibición del radical DPPH (%IRL) sigue siendo At ($p \leq 0,0001$). Sin embargo, este es afectado además por los otros factores: tiempo de extracción ($p \leq 0,001$), temperatura de almacenamiento ($p \leq 0,001$) y la interacción TA versus At ($p \leq 0,0001$).

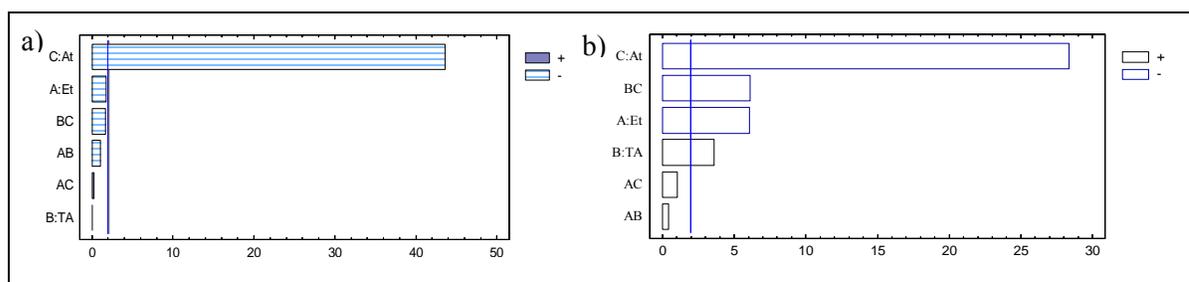


FIGURA 16. Diagrama de Pareto estandarizado para la variables de respuestas: a) DPPH y b) Porcentaje de inhibición del radical DPPH (%IRL)
(At: tiempo de almacenamiento (días); Et: tiempo de extracción (min) ; TA: temperatura de almacenamiento °C)

El diseño experimental a través de ANOVA indicó con un 95% de confianza, que el tiempo de almacenamiento es altamente significativo. El modelo correspondiente de la variabilidad del DPPH tiene un coeficiente de determinación de R^2 de 89 %, El test de Durbin-Watson indica que existe una correlación significativa entre los datos ($P=0,0001$) y de esta forma se obtiene un modelo que predice con 89 % la variabilidad de la capacidad antioxidante, con respecto a las variables de almacenamiento y procesamiento (Ec. 16).

$$C_{DPPH} = 3044,59 - 0,658287 \cdot Et + 7,76564 \cdot TA - 72,4113 \cdot At - 0,123539 \cdot Et \cdot TA + 0,0329422 \cdot Et \cdot At - 0,233511 \cdot TA \cdot At \quad \text{Ec.16}$$

En cuanto a cambios a lo largo del periodo de almacenamiento, no hubo diferencias significativas entre las tres temperaturas estudiadas. Efectos similares fueron observados por Wojdyło *et al.* (2014) en jugo de membrillo almacenado por 6 meses. La capacidad antioxidante fue bastante constante en cuanto a la temperatura. No obstante, el tiempo de

almacenamiento provocó una reducción considerable de 70% de pérdidas a 5 °C y 72 % a los 35 °C al día 34. En el efecto del tiempo de almacenamiento, se observó, independiente de la temperatura, una caída pronunciada de la capacidad antioxidante en el día 26 (FIGURA 17).

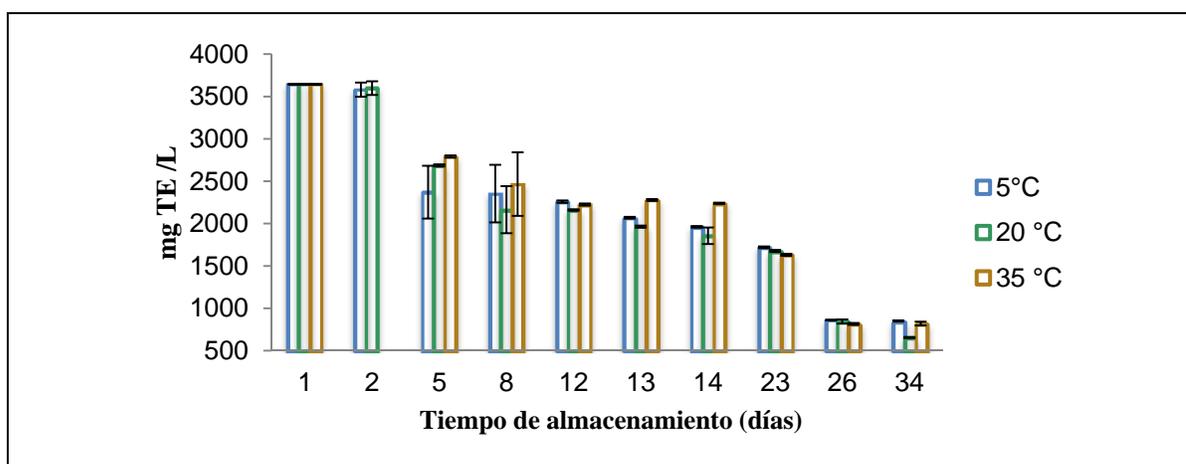


FIGURA 17. Efecto del factor tiempo de almacenamiento en relación al DPPH, para un tiempo de extracción de 30 min.

En el gráfico de superficies (FIGURA 18), tanto para una extracción de 30 min, como para el almacenamiento de 5 °C, se demuestra el descenso en el tiempo de almacenamiento.

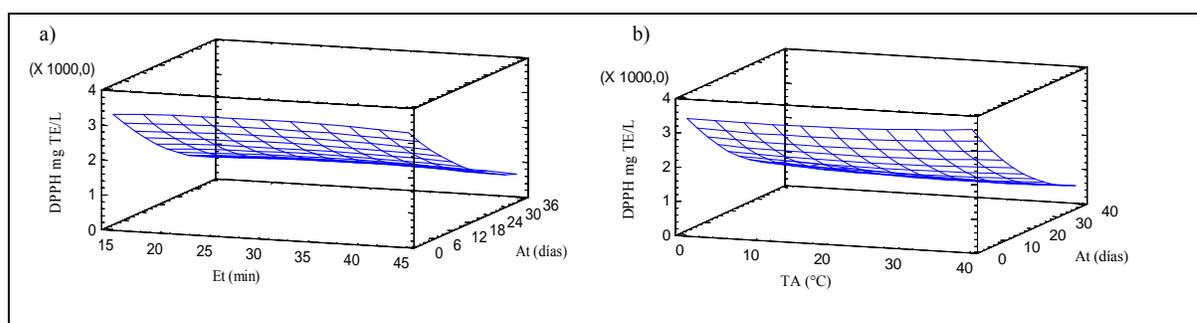


FIGURA 18. Efecto del factor condiciones de almacenamiento en relación al DPPH. a) 30 min de extracción con vapor; b) 5 °C de almacenamiento

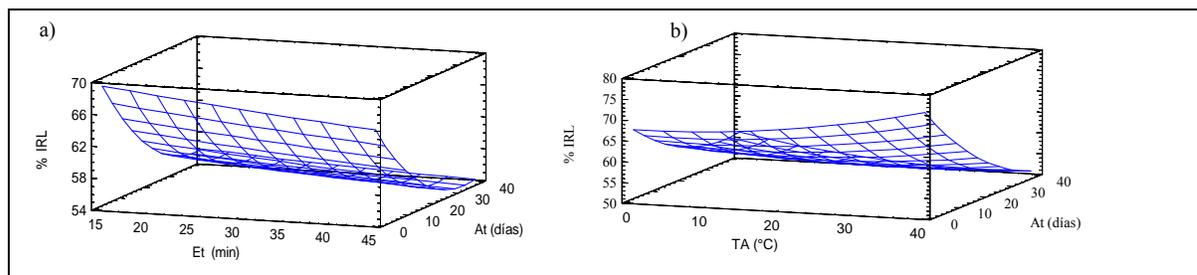


FIGURA 19. Efecto del factor condiciones de almacenamiento en relación al %IRL. a) 30 min de extracción con vapor; b) 5 °C de almacenamiento

Relación entre capacidad antioxidante y los pigmentos

La capacidad antioxidante en el extracto fue otorgada por los pigmentos allí presentes, de la cual se obtuvo una regresión múltiple ajustada a un coeficiente de determinación $R^2 = 65 \%$, es decir, los polifenoles (PFT) totales, las antocianinas (ACN), las clorofilas totales (CHT) y los carotenoides (CRT) otorgan el 65 % de la variabilidad de la capacidad antioxidante del extracto. Obteniendo relación entre ellas de DW ($P=0,0000$), siendo las clorofilas altamente significativas en el modelo.

La ecuación del modelo predictivo ajustado fue:

$$C_{DPPH} = 831,695 + 0,459064W_{PFT} - 9,44212W_{ACN} + 13,8891 W_{CRT} + 26,7531W_{CHT} \quad \text{Ec.17}$$

3.3.2 Variación del color del jugo de murta en función del tiempo de almacenamiento

La estabilidad del color establecida por ΔE , Δa , Δb , ΔC y Δh fue afectada altamente por el tiempo de extracción (Et), la temperatura de almacenamiento (TA) y los días de almacenamiento (At). La diferencia en el tono, Δh , no fue afectado por las interacciones Et/TA y Et/At. La diferencia en la croma, ΔC , indicó la saturación del color o grado de color y fue altamente significativo en todos los factores e interacciones. La diferencia en el valor de luminosidad, ΔL , fue afectado significativamente por la temperatura de almacenamiento, el tiempo de almacenamiento y por la interacción Et/TA. El estadístico de

Durbin-Watson, indicó que existió una correlación entre los datos de ΔE , ΔL , Δa y Δh . Sin embargo, en Δb y ΔC no hubo ninguna correlación.

TABLA 7. Variación de color

	ΔE	ΔL	Δa	Δb	ΔC	Δh
1. Et	***	*	***	***	***	***
2. TA	**	***	***	***	**	**
3. At	***	***	***	**	***	**
1 vs 2	**	***	**	***	***	ns
1 vs 3	***	Ns	Ns	*	***	ns
2 vs 3	*	Ns	**	*	**	*
R²	49%	47%	48%	56%	58%	26%
DW	P=0,0184	P=0,0043	P=0,005	P=0,1200	P=0,7734	P=0,000

Con un nivel de confianza del 95% la diferencia significativa de * P <0,1; ** P <0,05; *** P <0,001 en ANOVA. (At: tiempo de almacenamiento (días); Et: Tiempo de extracción (min); TA: temperatura de almacenamiento °C); estadístico de Durbin-Watson (DW)

Al evaluar el color en función de la temperatura se observó que el modelo que más se ajustó para explicar la variabilidad fue a 5 °C, esto se debió que a medida que pasaron los días, se produjo aglomeración o polimerización de los pigmentos allí presentes en las temperaturas de almacenamiento de 20 y 35 °C (TABLA 8).

Al relacionar el almacenamiento de 5 °C con la concentración de pigmentos se comprobó que a medida que aumentó la diferencia, disminuyó la concentración de éstos. En el FIGURA 20 se ilustra la variación de color en polifenoles y antocianinas a través de una regresión lineal simple, la cual demostró la correlación que existe entre ellos con un estadístico de DW de P= 0,00 en todas las diferencias. Fue altamente significativo ΔE , Δa , ΔC y Δh tanto para polifenoles como antocianinas y no fue significativo para Δb y ΔL .

En la ilustración de la FIGURA 21 se presenta la variación de color en los pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides), para ambos casos ΔE , Δh y ΔC fue

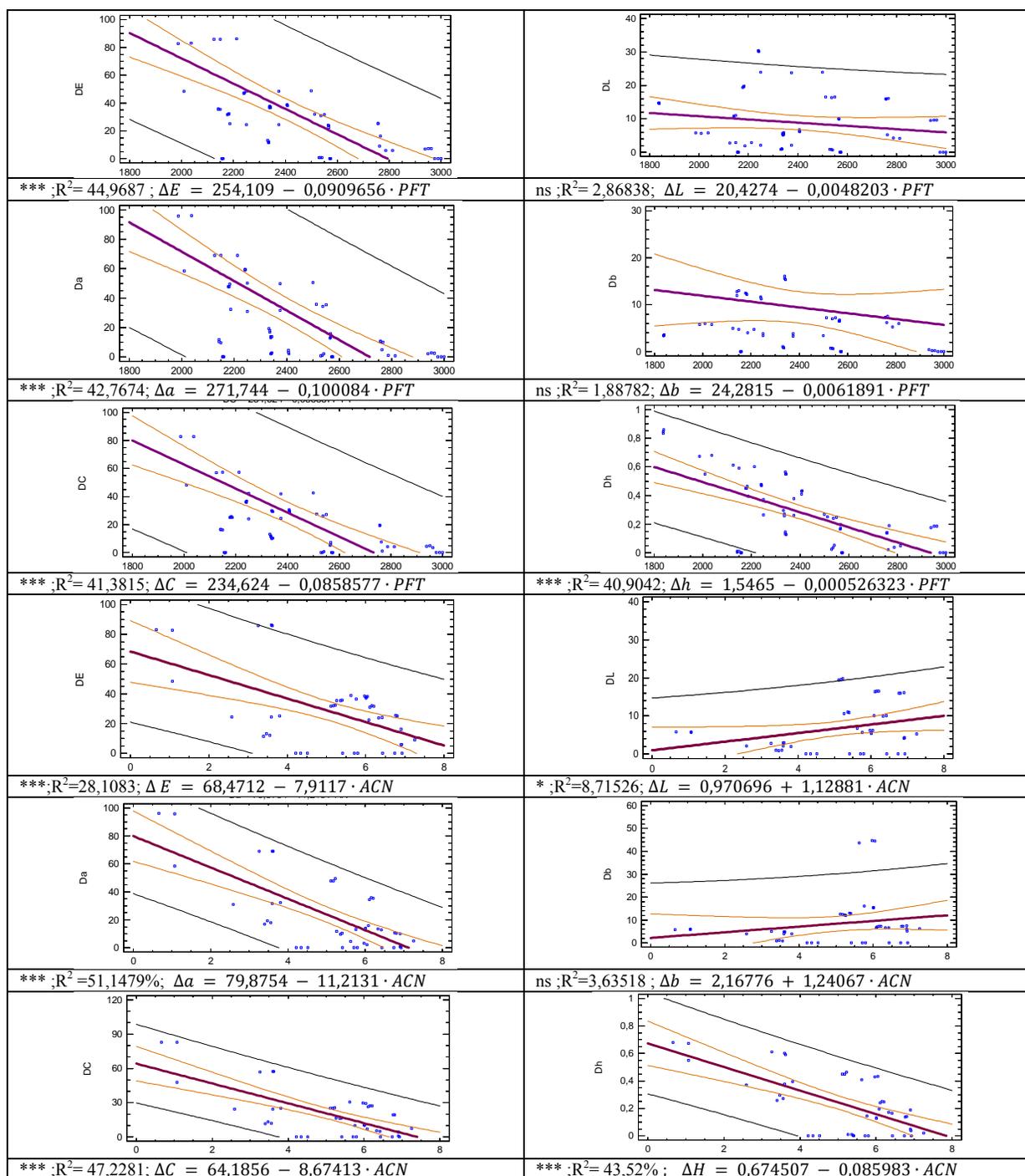
significativo. Sólo para las clorofilas fue significativo ΔL y Δb , lo cual indicó que influyó en la claridad y que los pigmentos que van desde el amarillo al azul, tuvieron un cambio en el tiempo de almacenamiento. Para Δa no fue significativo, lo que indicó la ausencia de pigmentos rojos en las clorofilas. En cuanto a los carotenoides, no hubo afecto sobre la luminosidad ΔL y tampoco sobre Δb , dado que no debe presentar carotenoides con pigmentos que fluctúen desde el amarillo al azul.

TABLA 8. Variación de color en función de la temperatura ANOVA

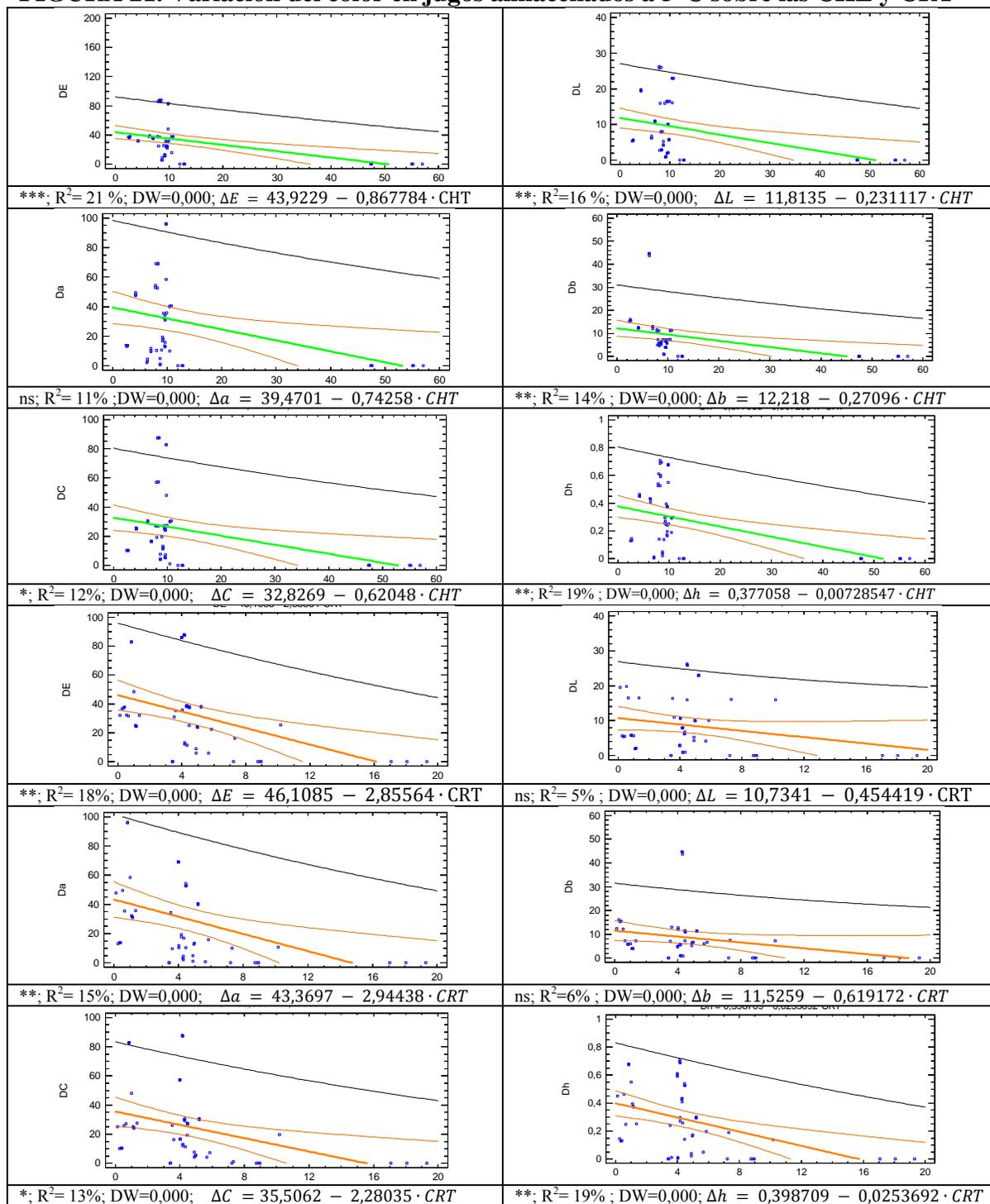
5°C	ΔE	ΔL	Δa	Δb	ΔC	Δh
1.Et	***	***	***	***	***	***
2.At	**	***	***	ns	**	**
1 vs 2	***	ns	***	ns	***	ns
R ²	70%	69%	79%	48%	77%	61%
20°C						
1.Et	***	*	***	ns	***	***
2.At	***	***	***	*	***	**
1 vs 2	Ns	ns	ns	ns	ns	ns
R ²	38%	51%	41%	10%	47%	36%
35°C						
1.Et	Ns	***	***	***	***	**
2.At	**	***	ns	**	*	ns
1 vs 2	Ns	*	ns	**	ns	ns
R ²	46%	32%	32%	60%	58%	13%

Con un nivel de confianza del 95% la diferencia significativa de * P <0,1, ** P <0,05, *** P <0,005 en ANOVA. (At: tiempo de almacenamiento (días); Et: tiempo de extracción (min); TA: temperatura de almacenamiento °C); estadístico de Durbin-Watson (DW)

FIGURA 20: Variación de color en jugos almacenados a 5°C sobre los PFT y ACN



Con un nivel de confianza del 95% la diferencia significativa de * $P < 0,1$, ** $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ en ANOVA regresión lineal simple, Polifenoles totales (PFT), antocianinas (ACN).

FIGURA 21. Variación del color en jugos almacenados a 5°C sobre las CHL y CRT

Con un nivel de confianza del 95% la diferencia significativa de * $P < 0,1$; ** $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ en ANOVA regresión lineal simple. Carotenoides (CRT) y Clorofila total (CHT)

Al relacionar la suma de los pigmentos con la diferencia de color, se observó que el pigmento con mayor significancia sobre las variables de respuestas diferenciales fueron las antocianinas, afectando de forma significativa sobre ΔL , Δa , Δb , ΔC y ΔH . Sin embargo, sobre ΔE afectó sólo significativamente polifenoles y clorofilas (TABLA 9), lo que concuerda con los resultados del color en variación al tiempo de extracción.

TABLA 9. Regresión múltiple evaluada a 5 °C

	ΔW	R ² %	PFT	ACN	CRT	CHL	Ecuaciones
ΔE	0,000	50%	*	ns	ns	**	$\Delta E = 161,466 - 0,0471396 \cdot PFT - 3,28795 \cdot ACN + 2,62272 \times CRT - 1,06555 \cdot CHT$
ΔL	0,000	41%	ns	**	ns	ns	$\Delta L = 9,27158 - 0,00436734 \cdot PFT + 2,13172 \cdot ACN - 0,114736 \cdot CRT - 0,18186 \cdot CHT$
Δa	0,000	56%	ns	***	ns	ns	$\Delta a = 88,6822 - 0,0051172 \cdot PFT - 9,61696 \cdot ACN - 0,612686 \cdot CRT - 0,154913 \cdot CHT$
Δb	0,000	32%	*	**	ns	*	$\Delta b = 44,6445 - 0,0216938 \cdot PFT + 3,58629 \cdot ACN + 0,988572 \cdot CRT - 0,47612 \cdot CHT$
ΔC	0,000	54%	ns	***	ns	ns	$\Delta C = 96,5896 - 0,0162388 \cdot PFT - 6,88143 \cdot ACN + 0,933485 \cdot CRT - 0,48114 \cdot CHT$
ΔH	0,000	53%	ns	***	ns	ns	$\Delta h = 0,851292 - 0,0000865721 \cdot PFT - 0,0708206 \cdot ACN + 0,00431096 \cdot CRT - 0,00493624 \cdot CHT$

Con un nivel de confianza del 95% la diferencia significativa de * P <0,1; ** P <0,05; *** P <0,001 en ANOVA regresión lineal múltiple. Estadístico de Durbin-Watson (DW), polifenoles totales (PFT), antocianinas (ACN), carotenoides (CRT) y clorofila total (CHT)

Las antocianinas son pigmentos vegetales con un gran potencial para el reemplazo competitivo de colorantes sintéticos, representando el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano (Strack y Wray, 1994).

4. CONCLUSIONES

Al concluir esta investigación los objetivos han sido logrados gracias a la rigurosidad utilizada en el proceso investigativo. El tema de la tesis permite dar un valor agregado a la murta que de ser una producción local, de carácter estacional, se transformaría en un producto de consumo anual. Esto implica que la producción del jugo podría ser permanente como consumo y como negocio.

Se ha demostrado que los antioxidantes naturales en las infusiones de murta al 1% tienen actividad antioxidante por el método ORAC en plasma humano. En esta investigación se obtuvo la extracción de compuestos antioxidantes en la baya de murta alrededor del 10%, lo que indicaría una buena posibilidad de tener compuestos biodisponibles.

En relación a la cuantificación del contenido de polifenoles, antocianinas, clorofilas y carotenoides totales en el jugo obtenidos en 15, 30 y 45 minutos de extracción por vapor se puede decir que, el mejor tiempo de extracción fue a los 28 minutos, obteniendo un 10% de los polifenoles de la murta, dejando un subproducto de importancia comercial. En las antocianinas no hubo diferencia significativa entre la extracción de 30 y 45 minutos y en el mejor caso se extrae alrededor de un 12 %. En las clorofilas no existen reportes de extracción de clorofilas en murta, siendo la mejor extracción a 30 minutos con 55,7 mg/L. En los carotenoides existen reportes de β carotenos, sin embargo, los que se extraen en este proceso tienen que ser de otra naturaleza, dado que éstos son liposolubles, una posibilidad es que sean carotenoides ácidos o carotenoproteínas, los cuales son solubles en agua y estables a temperaturas.

En los polifenoles y antocianinas el mejor tratamiento de almacenamiento fue a 5 °C. En las clorofilas no hubo diferencias significativas. Los carotenoides son afectados por la temperatura, sin embargo, no hubo correlación entre los datos, por lo que no se podría predecir cuál es la mejor temperatura. En función de los días de almacenamiento los polifenoles tienen un marcado decrecimiento al día 26. Las antocianinas tienen un marcado

decrecimiento al día 22. Las clorofilas y los carotenoides tienen un marcado decrecimiento al día 14.

Al determinar la actividad antioxidante en el jugo, para cada condición de almacenamiento se concluye que la mejor extracción se obtiene a los 30 minutos, obteniendo alrededor de un 4% de la capacidad antioxidante de la baya de murta.

La evaluación del procesamiento con el modelo de superficie de respuesta indica como mejor punto de operación la extracción en 28 min y el almacenamiento a 5 °C. Los jugos almacenados a 5 °C presentaron mayor retención de antocianinas y polifenoles.

La cantidad de polifenoles y la capacidad antioxidante (DPPH) en el extracto de murta disminuyen en los tratamientos térmicos para un tiempo de extracción mayor que 28 min.

La temperatura de almacenamiento influyó en la estabilidad de antocianinas y también en los parámetros de color, siendo la temperatura de 35 °C, la que produce mayor velocidad de degradación.

La capacidad antioxidante de los compuestos bioactivos en todos los extractos de murta decrece significativamente con el tiempo, independiente de la temperatura de almacenamiento. Al final del almacenamiento de 26 días los jugos mostraron una pérdida significativa en la actividad antirradical y todos los jugos mostraron una pérdida significativa en los pigmentos. Se observó una correlación lineal significativa entre los resultados de las mediciones y la actividad antirradical DPPH ($R^2 = 0,65$). Siendo las clorofilas que aportan mayor significancia, lo que indica la importancia de estudiar con mayor profundidad las clorofilas a' y b' que son resistentes a los tratamientos térmicos, lo que podría dar valor agregado al jugo si se demuestra que son beneficiosas para la salud.

En relación al color, éste está afectado principalmente por las antocianinas, esto queda demostrado en las regresiones lineales y múltiples, sobre todo Δa , ΔC y Δh . Otros pigmentos que también afectan al modelo son los polifenoles y clorofilas, principalmente en la variación de color general ΔE .

En el caso de utilizar el color como herramienta de cuantificación la variable que tiene mayor correlación con los pigmentos es Δa . Para medir la claridad del jugo, el valor de ΔL entrega una buena correlación.

Finalmente, se concluye que la murta, con sus peciolo y tallos, es una potencial materia prima para elaborar jugos con características funcionales. Este jugo tiene una vida útil respecto a la capacidad antioxidante de 26 días sin aditivos y sin importar la temperatura de almacenamiento. No obstante, la temperatura de almacenamiento afecta al color, presentándose una variación de éste. En relación al rendimiento, de un kg de murta se obtiene alrededor de un litro y medio de jugo, mediante el método de arrastre por vapor. Además, existe un residuo de frutas como un potencial subproducto, dado que en el jugo sólo se retiran aproximadamente un 10% de los pigmentos. La murta es una baya con un alto potencial de producción para la Región de Los Ríos, la que ya es conocida por los arándanos, frambuesas y cranberries, entre otras bayas. Estos resultados pueden ser útiles para la industria de los jugos, como punto de partida para el desarrollo de jugos de murta con altos niveles de compuestos bioactivos.

5. BIBLIOGRAFÍA

Aguirre, M. C., Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Letelier, M. E., Cassels, B. K., Silva, X., Alegría, S & Negrete, R. 2006. Topical anti-inflammatory activity of 2 α -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. *Bioorganic y Medicinal Chemistry* 14 (16): 5673-5677.

AOAC .1996. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

Armenta-López, R., Guerrero, I. L., & Huerta, S. 2002. Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *Journal of Food Science*, 67(3), 1002-1006.

Bello Gutiérrez José. 2008. *Ciencia Bromatológica; Principios Generales de Los Alimentos*, Díaz de Santos, España, 596 p

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

Britton G. Carotenoids .1992. En: Hendry GAF, Houghton JD, editores. *Natural food colorants*. Glasgow and London: Blackie p. 141-182.

Britton G. 1983. *The biochemistry of natural pigments*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.

Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15), 1551-1558.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2004). *Carotenoids. Volume 4: Natural functions*. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, y H. Pfander (Eds.), *Carotenoids. Handbook* (pp. 1–6). Basel-Boston-Berlin: Birkhäuser Verlag.

Burdurlu H.S., Koca N. & Karadeniz F. 2006. Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. *Journal of Food Engineering*, 74, 211–216.

Castañeda, A., M. Pacheco, M. Páez, J. Rodríguez & C. Galán 2009 Chemical studies of anthocyanins: A review. *Journal Food Chemistry* 113: 859–871

Chuah, A. M., Lee, Y.-C., Yamaguchi, T., Takamura, H., Yin & L.-J. Ymatoba, T. 2008. Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chemistry* 111, 20-28.

Clydesdale, F. M., Y Francis & F. J. 1976. Pigments. In O. R. Fennema (Ed.), *Food Chemistry* (pp. 417–430). New York: Marcel Dekker.

Delporte, C., Backhouse, N., Inostroza, V., Aguirre, M. C., Peredo, N., Silva, X., Negrete & R., Miranda, H. F, 2007. Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. *Journal of Ethnopharmacology* 112 (1): 162-165.

Ferruzzi, M. G., Y Blakeslee, J. 2007. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, 27(1), 1–12.

FIGURA Ludger O & Teixeira Arthur A. 2007. *Food Physics: Physical Properties, Measurement and Applications*, Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag, 550 p.

Flores-Álvarez, M. C., Vergara-Balderas, T., & Guerrero-Beltrán, J. A., 2011. Efecto del tiempo de almacenamiento y tipo de procesamiento en los antioxidantes de nopal.

Fossen, T., L. Cabrita & O. Andersen. 1998. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry* 63(4): 435-440.

Francis, F. J., & Clydesdale, F. M. 1975. *Food colorimetry: theory and applications*. AVI Publishing Co. Inc.

Gómez-Plaza, E., & Cano-López, M. 2011. A review on micro-oxygenation of red wines: Claims, benefits and the underlying chemistry. *Food Chemistry*, 125(4), 1131–1140.

Harborne, J. B. 1993. The flavonoids advances in research since 1986 (Vol. 4). CRC Press.

Harbourne, N., J. Jacquier, D. Morgan & J. Lyng. 2008. Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods. *Food Chemistry* 111(1):204–208.

Kirca, A. & B. Cemeroglu. 2003. Thermal degradation of blood orange anthocyanins. *Food Chemistry* 81(4): 583–587.

Kirca, A., M. Özkan & B. Cemeroglu. 2007. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry* 101(1): 212–218.

Leong, S.Y. & Oey, I. 2012. Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 133, 1577–1587.

Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* 148: 350–382.

Meléndez-Martínez, A., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. 2007. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(2), 109-117.

Olaya, C., M. Castaño & G. Garzón, 2009. Stability of anthocyanins from *Rubus glaucus* Benth and *Solanum betaceum* Cav. dark-red strain as affected by temperature, storage time and water activity. *Acta Biológica Colombiana* 14 (3): 141-156.

Owusu, A. 2005. Chemistry Postharvest. En: Introduction to Food Chemistry. Primera Edición. Editorial CRC Press. United States of America. P. 219.

Özkan, M., A. Yemenicioglu, N. Asefi, & B. Cemeroglu. 2002. Degradation kinetics of anthocyanins from sour cherry, pomegranate and strawberry juices by hydrogen peroxide. *Journal of Food Science* 67(2): 525-529.

Roca, M., & Mínguez-Mosquera, M. I. 2006. Chlorophyll catabolism pathway in fruits of *Capsicum annuum* (L.): stay-green versus red fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(11), 4035-4040.

Rodríguez, K., Ah-Hen, K., Vega-Gálvez, & López, J., Quispe-Fuentes, I., Lemus-Mondaca, R., & Gálvez-Ranilla, L. 2014. Changes in bioactive compounds and antioxidant activity during convective drying of murta (*Ugni molinae* T.) berries. *International Journal of Food Science y Technology*, 49(4), 990-1000.

Ruiz, A., Gutierrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., Dorau, C., Winterhalter, P & Von Baer, D. 2010. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (10): 6081-6089

Ruiz, A., Hermosín-Gutiérrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., & Von Baer, D. 2010. Polyphenols and antioxidant activity of Calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(10), 6081-6089.

Sakakibara, H., Honda, &, Nakagawa, S., Ashida, H., & Kanazawa, K. 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 571-581.

Saucier, C. 2010. How do wine polyphenols evolve during wine ageing. *Cerevisia*, 35(1), 11–15.

Schiedt K & Liaaen-Jensen S. Isolation and analysis. En: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, editores. Carotenoids. Volume 1A: Isolation and analysis. Basel, Switzerland: Birkhäuser; 1995. p. 81-108.

Schreckinger, M., Lotton, J., Lila, M., & Gonzalez De Mejia, E. 2010. Berries from south america: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. *Journal of Medicinal Food* 13(2), 233–246.

Shene, C., Reyes, A. K., Villarroel, M., Sineiro, J., Pinelo, M., & Rubilar, M. 2009. Plant location and extraction procedure strongly alter the antimicrobial activity of murta extracts. *European Food Research and Technology*, 228(3), 467-475.

Shrikhande, A. & F. Francis. 1974. Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems. *Journal of Food Science* 39(5): 904–906.

Speisky, H., Peña, A., Gómez, M., Fredes, C., Hurtado, M., Gotteland, M., & Brunser, O. 2008. Antioxidants in chilean berries. *Acta Horticulturae* 777, 485–492.

Starr, M.S. & F. Francis. 1968. Oxygen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanin pigments in cranberry juice. *Food Technology* 22(10): 91–93.

Teng, S. S., & Chen, B. H. 1999. Formation of pyrochlorophylls and their derivatives in spinach leaves during heating. *Food Chemistry*, 65(3), 367–373

Wang S. & Y Lin H. S. 2000. Antioxidant activity in fruit and leaves of blackberry, raspberry and strawberry is affected by cultivar and maturity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48, 140-146.

Wang, H., Fan, W., Li, H., Yang, J., Huang, J., & Zhang, P. 2013. Functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase in anthocyanin biosynthesis of purple sweet potato underlies the direct evidence of anthocyanins function against abiotic stresses. *PloS one*, 8(11), e78484.

Warris, P. D., & Brown, S. N. 1995. The relationship between reflectance (EEL value) and colour (L*) in pork loins. *Animal Science*, 61(1), 145-148.

Wojdyło, Aneta, Teleszko, Mirosława & Oszmiański, Jan, 2014. Antioxidant property and storage stability of quince juice phenolic compounds. *Food chemistry*, vol. 152, p. 261-270.

Wu, Di; Sun, Da-Wen. 2013. Colour measurements by computer vision for food quality control—A review. *Trends in Food Science y Technology*, vol. 29, no 1, p. 5-20.

Yuan, L., Zhang, L., Ma, W., Zhou, X., Ji, J., Li, N., & Xiao, R. 2013. Glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms with consumption of high fruit-juice and vegetable diet affect antioxidant capacity in healthy adults. *Nutrition*, 29(7), 965-971.

Zhonggao, J., Liu J. & Wang, S. 2005. Antioxidant activities of total pigment extract from blackberries. *Food Technology Biotechnology* 43: 97–102.