



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE GRADUADOS

**Efecto de los diferentes procesos de secado en los
compuestos bioactivos de murtila (*Ugni molinae*
Turcz) y su bioaccesibilidad**

TESIS DE MAGÍSTER

SILVANA KATERINE CEDEÑO ARROYO

VALDIVIA – CHILE

2017

**EFFECTO DE LOS DIFERENTES PROCESOS DE SECADO EN LOS
COMPUESTOS BIOACTIVOS DE MURTILLA (*UGNI MOLINAE* TURCZ) Y SU
BIOACCESIBILIDAD**

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

SILVANA KATERINE CEDEÑO ARROYO

Valdivia - Chile

2017

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

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.

SILVANA KATERINE CEDEÑO ARROYO

Ha sido aprobado en el examen de defensa de Tesis rendido el día 19 de mayo de 2017, como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencia de los Alimentos y, para que así conste para todos los efectos firman.


Profesor Patrocinante de T



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

Comisión Evaluadora de T



Ociel Muñoz Fariña

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



Roberto Lemus Mondaca

Ingeniero en Alimentos, Mg., Dr. Ing.
Departamento de Ciencia de Alimentos y Tecnología Química
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéutica
Universidad de Chile

A mis padres, Eloy y Neicy

*Por la paciencia de comprender, que a veces
para mirar de cerca hay que pararse lejos...*

ÍNDICE DE MATERIAS

	Capítulo	Página
	RESUMEN	
	SUMMARY	
1	INTRODUCCIÓN	1
2	MATERIALES Y METODOS	7
2.1	Ubicación del estudio	7
2.2	Materiales	7
2.2.1	Materia prima	7
2.2.2	Reactivos y equipos	7
2.3	Metodologías	8
2.3.1	Técnicas de secado	8
2.3.2	Determinación de humedad	9
2.3.3	Extracción de compuestos bioactivos	9
2.3.4	Simulación digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	9
2.3.5	Determinación de contenido de polifenoles totales	9
2.3.6	Determinación de la capacidad antioxidante por el método del radical DPPH	10
2.3.7	Determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC	10
2.3.8	Determinación del contenido de antocianinas totales	11
2.3.9	Detección de antocianinas por HPLC-DAD	11
2.4	Diseño experimental	12
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
3.1	Determinación de contenido de humedad	13
3.2	Ensayos preliminares	13
3.3	Efecto de los tratamientos de secado en el contenido de polifenoles totales	15
3.4	Efecto de los tratamientos de secado sobre el contenido de antocianinas totales	17

3.5	Efecto de los tratamientos de secado en la capacidad antioxidante por método de DPPH y ORAC	18
3.6	Efecto de los tratamientos de secado y de las etapas de digestión in-vitro sobre la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos (PFT, CAT)	20
3.7	Identificación de antocianinas determinadas por HPLC-DAD	23
3.8	Efecto de los tratamientos de secado y etapas de la digestión in-vitro en el porcentaje de bioaccesibilidad de la capacidad antioxidante (DPPH, ORAC)	25
4	CONCLUSIONES	27
5	BIBLIOGRAFÍA	28
	ANEXOS	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Compuestos fenólicos identificados en extractos etanólicos de murta fresca.	2
2	Efecto de los tratamientos de secado sobre el contenido de polifenoles totales en la murta.	16
3	Efecto de los tratamientos de secado sobre el contenido de antocianinas totales en la murta.	18
4	Efecto de los tratamientos de secado sobre la capacidad antioxidante por método DPPH y ORAC en la murta.	19
5	Efecto de los tratamientos de secado y etapas de la <i>digestión in-vitro</i> en el porcentaje de bioaccesibilidad de PFT y CAT en murta fresca y secada	22
6	Cromatograma HPLC murta liofilizada	23
7	Área peonidina-3-glucósido de murta fresca y secadas	24
8	Área cianidina-3-glucósido de murta fresca y secadas	24
9	Efecto de los tratamientos de secado y etapas de la <i>digestión in-vitro</i> en el porcentaje de bioaccesibilidad de DPPH y ORAC en murta fresca y secada	26

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Condiciones cromatográficas	10
2	Tiempo de secado y porcentajes de humedad de murta fresca y secada con los diferentes métodos	12
3	Contenido total de polifenoles, antocianinas y capacidad antioxidante en murta fresca y secada por convección y al vacío a tres temperaturas	13

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Curva patrón polifenoles totales	37
2	Curva patrón capacidad antioxidante DPPH	37
3	Representación gráfica de la pérdida de fluorescencia en presencia del radical AAPH y curva patrón capacidad antioxidante ORAC	38
4	Cuadro del PFT, CAT y capacidad antioxidante (determinados con método DDPH y ORAC) en murta fresca y con tres tratamientos de secado	38
5	Cuadro del PFT, CAT y capacidad antioxidante (determinados con método DDPH y ORAC) en murta fresca y con tres tratamientos de secado durante la etapa de la digestión in-vitro y porcentajes de bioaccesibilidad.	39
6	Imágenes de coloración baya de murta fresca en las cinco etapas de la simulación digestión GI <i>in-vitro</i> . Análisis antocianinas totales.	41

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

PFT: Polifenoles totales

CAT: Contenido antocianinas totales

EAG: Ácido gálico equivalente

ET: Equivalente de trolox

FC: Folin-Ciocalteu

DPPH: Radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

ORAC: Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno

AAPH: Radical 2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro

RESUMEN

Murta (*Ugni molinae* T.) es una baya endémica del sur de Chile, muy apreciada por su alto contenido de compuestos bioactivos beneficiosos para la salud. Para prolongar la vida útil de la fruta se utiliza el proceso de deshidratación. Sin embargo, los compuestos bioactivos están expuestos a la degradación durante el procesamiento, lo que aminora la calidad de los productos alimenticios secados. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de métodos de secado, tales como la liofilización, el secado al vacío y el secado convectivo sobre las bayas de murta, usando como parámetros de control los cambios en la calidad de los compuestos bioactivos, tales como polifenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante. Se investigó también la calidad de estos compuestos bioactivos en las bayas de murta después de cada tratamiento de secado a través de una simulación gastrointestinal *in vitro*, considerando la etapa bucal, gástrica final, intestinal inicial, medio y final. Los polifenoles fueron analizados por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, mientras que el contenido de antocianinas totales mediante el método de diferencial de pH y el perfil de antocianinas por HPLC-DAD. La capacidad antioxidante se determinó a través del método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ORAC. Se encontró que los métodos de secado presentaron diferencias significativas sobre los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de las bayas secadas de murta. El proceso de liofilización causó la menor degradación de los compuestos bioactivos, seguido por el secado al vacío y por último el secado por convección. En la simulación gastrointestinal *in vitro*, durante la etapa gástrica final, se reporta el mayor porcentaje de bioaccesibilidad de polifenoles en la murta liofilizada con un 96% de liberación. En el caso de las antocianinas, éstas alcanzaron en la murta fresca el mayor porcentaje de bioaccesibilidad con 65% durante la etapa gástrica final, similar en la murta secada al vacío (63%). Durante la etapa intestinal no fue posible detectar antocianinas por el método diferencial pH. Dos antocianinas, cianidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido fueron identificadas por HPLC-DAD. Finalmente, se encontró que la capacidad antioxidante se mantuvo relativamente estable durante todo el proceso digestivo, tanto en la murta fresca como en las deshidratadas por los distintos métodos, alcanzando altos porcentajes de bioaccesibilidad que van de 61% a 127%. Los resultados experimentales demostraron que la calidad de los productos de las

bayas de murta en cuanto a los compuestos bioactivos, es afectada significativamente por el proceso de secado, siendo la liofilización el método que mejor conserva las propiedades beneficiosas de la murta. En este estudio, se logró cuantificar el efecto de tres diferentes métodos de secado sobre bayas de murta, considerando la calidad de los compuestos bioactivos.

ABSTRACT

Murta (*Ugni molinae* T.) is an endemic berry of Southern Chile and is highly appreciated for its high content of health-promoting bioactive compounds. In order to prolong shelf-life of the fruit, drying process is used. However, the bioactive compounds are degraded during processing, which negatively affects quality of the dried food products. The aim of this study was to determine the effect of drying methods, like freeze-drying, vacuum drying and convective hot-air drying, using as control parameters the changes in quality of the bioactive compounds, namely total phenolics, total anthocyanins and antioxidant activity. The quality of these bioactive compounds after each drying treatment was also investigated through an in-vitro gastric-intestinal simulation process, considering bucal, gastric (final) and intestinal (initial, middle and final) steps. Total phenolics were determined using the colorimetric method of Folin-Ciocalteu, while total anthocyanin was determined by pH differential method and anthocyanin profile by HPLC-DAD. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging method as well as ORAC assay were used to determine antioxidant activity. It was found that the drying methods had significantly different effects on the bioactive compounds and antioxidant activity of the dried murta berries. Freeze-drying caused the least degradation of the bioactive compounds, followed by vacuum drying and finally convective hot-air drying. During the *in vitro* gastric-intestinal simulation the highest bioaccessibility of polyphenolics (96%) was observed in freeze-dried murta. As to anthocyanins, bioaccessibility with 65% was highest in fresh murta, similar to the case of vacuum-dried murta berries (63%). During the intestinal step anthocyanins were not detected by the pH differential method. Two anthocyanins, cyanidin-3-glucoside y peonidin-3-glucoside were identified by HPLC-DAD. Finally, antioxidant capacity was found to remain relatively stable during the whole digestive process, in fresh as well as in all samples dehydrated by the different methods, achieving high bioaccessibility ranging from 61% to 127%. The experimental results showed that the quality of murta berries, so long bioactives are concerned, is being affected significantly by drying process, whereby freeze-drying is the method which best preserved the beneficial properties of murta berries. This study achieved a quantification of the effects caused by three different drying methods, under consideration of the quality of the bioactive compounds.

1 INTRODUCCIÓN

'Murtilla', 'mutilla' o 'murta' (*Ugni molinae* Turcz) es 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, perteneciente a la familia Myrtaceae. El aroma de la baya de murta es descrita como afrutado, dulce y floral y es consumida mayormente como fruta fresca, aunque, jugos, mermeladas, jaleas, y licores son preparados también (Scheuermann *et al.*, 2008).

Murta, como otras bayas en sudamérica posee una rica y diversificada composición de compuestos bioactivos con propiedades beneficiosas para la salud (Reyes *et al.*, 2010; Speisky *et al.*, 2008) además se considera una fuente valiosa de pectina de alta calidad que tiene una composición química similar a la pectina cítrica comercial (Taboada *et al.*, 2010). Según la definición de Kitts (1994) los compuestos bioactivos son constituyentes "extranutricional" en pequeñas cantidades en productos vegetales y alimentos ricos en lípidos, son compuestos esenciales y no esenciales (por ejemplo, vitaminas o polifenoles), son parte de la cadena alimentaria, y se ha demostrado que tienen un efecto sobre la salud humana (Biesalski *et al.*, 2009).

Los polifenoles son sustancias con dos o mas anillos aromáticos y, al menos, un sustituyente hidroxilo (Badui S, 2006). Se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles vegetales puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares. (Schroeter *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2009). Los compuestos polifenólicos reaccionan fácilmente con un azúcar o un ácido orgánico, como los flavonoides y las antocianinas, o entre sí para formar polímeros, como los taninos (Badui, 2006). Las principales clases de polifenoles en las bayas son flavonoides (antocianinas, flavonoles, flavanoles) condensados, taninos hidrolizables, estilbenoides (resveratrol), y ácidos fenólicos (Seeram, 2008). Estudios realizados en la baya de murta han identificado flavonoides (antocianinas), taninos y ácidos fenólicos (Rodríguez *et al.*, 2014).

Entre los polifenoles identificados en murta por HPLC se encuentran el ácido gálico, catequina, quercetina 3-β-D-glucosido, miricetina, quercetina, canferol (Alfaro *et al.*, 2014); mientras, Shene *et al.* (2009) reportan miricetina glucósido, quercetina

glucurónido y quercetina ramnósido en extracto de murta obtenido con agua/etanol (50:50), cuyas estructuras se presentan en la FIGURA 1.

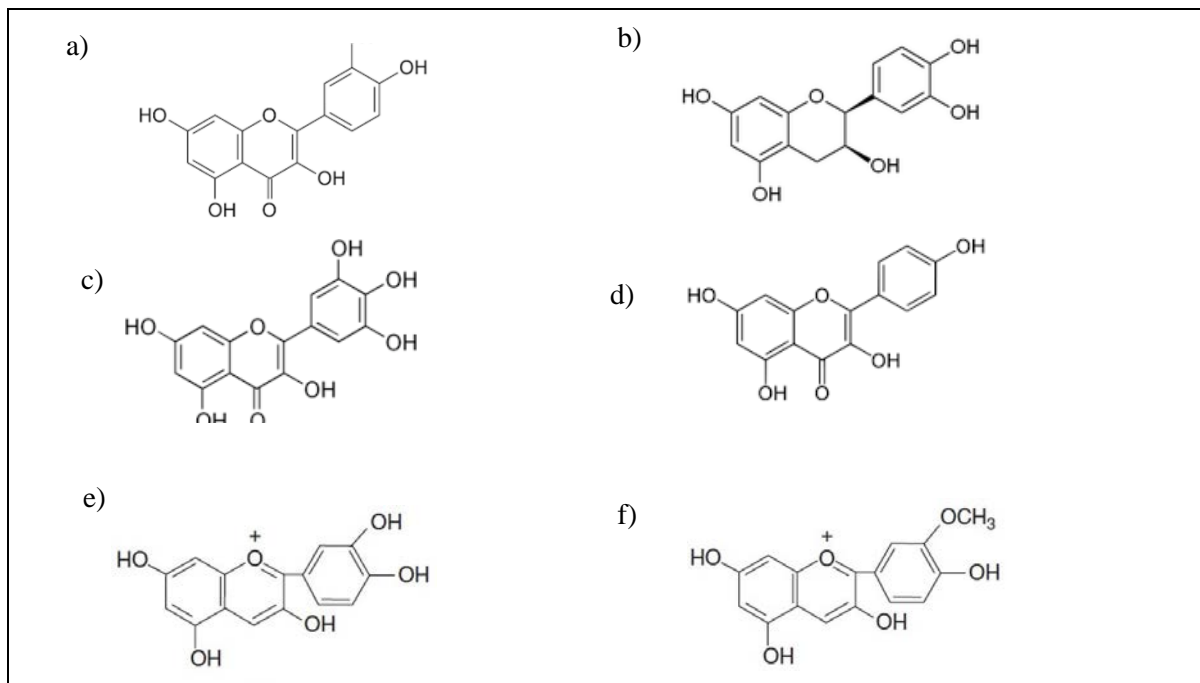


FIGURA 1. Compuestos fenólicos identificados en extractos etanólicos de murta fresca. a) quercetina, b) catequina, c) miricetina, d) canferol, e) cianidina, f) peonidina.

Los compuestos polifenólicos se han asociado con la actividad antioxidante y antimicrobiana de esta especie nativa (Shene *et al.*, 2009; Rubilar *et al.*, 2011; Alfaro *et al.*, 2013). Estudios han reportaron que la actividad antioxidante de los frutos de murta son comparables con el arándano, pero inferior al maqui (*Aristotelia chilensis*) y al calafate (*Berberis microphylla*) (Ruiz *et al.*, 2010).

Las antocianinas son un grupo de pigmentos polifenólicos responsables de los colores en las frutas, solubles en agua que se encuentra ampliamente en las bayas que pueden actuar como captadores de radicales libres y atenuantes del estrés oxidativo (Pojer *et al.*, 2013). Contienen como aglucón un núcleo flavilo al cual se une una fracción de azúcar (glucosa, ramnosa, galactosa, arabinosa, xilosa y ácido glucurónico) por medio de un enlace β -glucosídico (Badui, 2006). Calafate, maqui y murta son bayas antioxidantes considerados super frutas debido a su alto contenido de compuestos fenólicos incluyendo varias antocianinas (Delporte *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2010, 2013);

entre las cuales se han identificado en murta: cianidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido (FIGURA 1) y la catequina flavan-3-oles y epicatequina (Ruiz *et al.*, 2010).

Los antioxidantes son sustancias que neutralizan los radicales libres dañinos en el cuerpo. (Huang *et al.*,2005); también pueden ser llamados captadores de radicales, interruptores de cadena, o reductores. El sistema de defensa antioxidante es responsable de la protección celular contra el estrés oxidativo (Williamson *et al.*,2005; Yu, 1994; Rolfes *et al.*, 2009). El contenido total de compuestos fenólicos o flavonoides han mostrado una alta correlación con la capacidad antioxidante de las bayas de murta, que puede ser considerado un cultivo valioso por las propiedades funcionales notables y el alto contenido de compuestos bioactivos. Por lo tanto, es una excelente fuente de antioxidantes y componentes biológicamente activos (Rodríguez *et al.*, 2014).

Los compuestos bioactivos de las bayas presentan variación dependiendo de la variedad, ubicación de crecimiento, las condiciones ambientales, estado de madurez, y el tiempo de la cosecha, así como las condiciones de almacenamiento (Skrovankova *et al.*, 2015). Debido a que la murta se produce sobre una base estacional de marzo a mayo (Alfaro *et al.*, 2013), el proceso de secado es una tecnología postcosecha apropiada, prolonga la vida útil de la fruta y preserva su calidad y la estabilidad mediante la reducción de la actividad de agua a través de una disminución en el contenido de humedad, evitando así el deterioro por mohos durante el almacenamiento (Akpınar y Bicer, 2005). El proceso de secado es capaz de mantener en la murta las propiedades antioxidantes proporcionadas por los componentes polifenólicos (Kwok *et al.*, 2004; López *et al.*, 2010; Mejía-Meza *et al.*, 2010). Estudios recientes han demostrado que la retención de los compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante depende de la técnica aplicada y principalmente de la temperatura usada para el secado convencional (Reyes *et al.*, 2009; Reyes *et al.*, 2010; Puente-Díaz *et al.*, 2013).

El secado por convección con aire caliente sigue siendo ampliamente utilizado para producir productos secos, debido a sus bajos costos (Soysal *et al.*, 2009). Sin embargo, este método provoca la degradación de nutrientes importantes (Marfil *et al.*, 2008; Figiel 2010) así como la alteración del color (Chua *et al.*, 2001). Esta técnica se ha investigado en diferentes bayas, y es comúnmente usada por la industria alimentaria

(Lewicki, 2006). Sin embargo, el inconveniente del secado por convección es la disminución en el contenido de compuestos polifenólicos, el contenido de antocianinas totales y la actividad antioxidante, el cual varía en algunos casos de 24 a 82,6% en arándano como en otras bayas. La variación depende principalmente de la temperatura aplicada, que es normalmente entre 50 y 90 °C, y el tiempo de secado, lo que podría ser de hasta 10 horas (Kwok *et al.*, 200; Stojanovic y Silva, 2007; Wojdyło *et al.*, 2009; López *et al.*, 2010; Mejía-Meza *et al.*, 2010).

El secado al vacío es una alternativa que permite secar las frutas sin exponerlas a alta temperatura, eliminando la humedad a baja presión (Jaya y Das, 2003), por lo que la ausencia de aire durante la deshidratación disminuye las reacciones de oxidación. Por lo tanto, el color, la textura y sabor de los productos secos se mejoran. Sin embargo, el secado al vacío tiene un alto costo de instalación y operación (Woodroof y Luh 1986). Como un resultado de secado al vacío, los productos obtenidos han mostrado una mejor calidad en relación con la retención de nutrientes y compuestos de aroma, en comparación con el secado convencional (Jaya y Das 2003), además de un método adecuado para la retención de antioxidantes fenólicos (Mejía-Meza *et al.*, 2008).

La liofilización de los productos biológicos es considerada como la mejor técnica de eliminación del agua para obtener productos finales de alta calidad, en comparación con otras técnicas de deshidratación (Irzyniec, *et al.*, 1995; Krokida, *et al.*, 1998), para la conservación de alimentos. La conservación y la retención de los atributos, tales como la forma, la apariencia, el sabor, el color, la textura, la porosidad, la calidad de los nutrientes y la actividad biológica de las muestras liofilizadas, hacen que esta técnica sea uno de los procesos más atractivo para el secado de materiales alimenticios. (Norshahida *et al.*, 2001). Por otra parte, durante el tratamiento de liofilización puede haber una posibilidad de disminución en el contenido de antioxidantes debido a la degradación de ciertos compuestos; el costo operativo de la liofilización es alto y el tiempo de secado muy largo, comparando con otros métodos de secado convencionales (Marques *et al.*, 2006); se recomienda generalmente para la conservación de los polifenoles en las bayas (de Torres *et al.*, 2010; Grace *et al.*, 2012).

Bioaccesibilidad se define como la proporción de los nutrientes liberados de una matriz de los alimentos y por lo tanto potencialmente disponible para la absorción en el tracto gastrointestinal (Stahl *et al.*, 2002). Para la determinación de la bioaccesibilidad de nutrientes en los alimentos se pueden usar métodos *in vivo* y/o *in vitro* (Silva de Lima *et al.*, 2014). El método *in vitro* es la aplicación de un sistema de la digestión gastrointestinal simulado, usando pepsina en la fase gástrica y una mezcla de sales de pancreatina y biliares durante el tracto intestinal. (Kulkarni *et al.*, 2007). La naturaleza de los compuestos bioactivos, su estabilidad y su actividad antioxidante depende de muchos factores, tales como la matriz del alimento, el pH, la temperatura, la presencia de inhibidores o potenciadores de la absorción, la presencia de enzimas, el huésped y otros factores relacionados (McDougall *et al.*, 2005, Saura-Calixto *et al.*, 2007 y Tagliacruzchi *et al.*, 2010).

El tracto gastrointestinal puede ser considerado como un extractor eficiente, donde se extrae una parte de los fitoquímicos contenidos en matrices de alimentos y se convierte en disponible para la absorción en el intestino (Saura-Calixto *et al.*, 2007 y Tagliacruzchi *et al.*, 2010). Basado en un estudio *in vitro*, se ha demostrado que en el proceso de digestión se reduce el contenido de compuestos bioactivos (Cilla *et al.*, 2009). Otros estudios han probado que después de la digestión gástrica e intestinal sólo el 62% de los polifenoles presentes originalmente en las uvas fueron bioaccesibles (Tagliacruzchi *et al.*, 2010).

Por lo anterior se plantea la siguiente hipótesis:

Hipótesis

La aplicación de procesos de conservación a murta (*Ugni molinae* Turcz), podrían afectar a los compuestos bioactivos de esta fruta, así como también a su capacidad antioxidante y bioaccesibilidad de los mismos.

Objetivo general

Determinar el efecto de procesos de secado en los compuestos bioactivos tales como: Polifenoles totales y antocianinas totales como también la capacidad antioxidante y bioaccesibilidad en murta.

Objetivo específico

1. Comparar los contenidos de polifenoles y antocianinas totales en murta fresca y murta secada por convección, al vacío y liofilización.
2. Comparar la capacidad antioxidante (DPPH y ORAC), en murta fresca y murta secada por convección, al vacío y liofilización.
3. Determinar la bioaccesibilidad de los polifenoles, antocianinas totales, capacidad antioxidante (DPPH y ORAC) en cada etapa de la digestión *in vitro* de murta fresca y murta secada por convección, al vacío y liofilización.

2 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

2.2.1 Materia prima La murta utilizada en el estudio fue comprada en el mes de marzo del año 2016 en la feria fluvial de Valdivia, la cual provenía del sector Los Pellines, Curiñanco, está fue almacenada a -20°C (IMAGEN 1), para posteriormente ser utilizada en el estudio.



IMAGEN 1. Murta congelada

2.2.2 Reactivos y equipos: Estufa (Memmert 100-800, Alemania), espectrofotómetro (Rayleigh, modelo UV-1601, CHINA), pH-metro Fischer Accumet modelo 210 y colorímetro electrónico analizador de líquidos LMT1 Dr. LANGE. Espectrofluorómetro de microplacas Gemini XPS, Cromatógrafo de Líquidos Waters Alliance™ HPLC System 2690 Separations Module acoplado a Waters 2996 Photo Diode Array (PDA) Detector. Los reactivos 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, fueron adquiridos de Merck, Chile.

2.3 Metodologías

2.3.1 Técnicas de secado: Los frutos de murta se deshidrataron mediante secado convectivo por aire caliente a 65°C (IMAGEN 2), el secado convectivo por aire caliente se llevó a cabo usando un horno (modelo Memmert UFE 400, Alemania) con convección de aire y control de temperatura hasta humedad constante. El secado al vacío se llevó a cabo usando una estufa de vacío (modelo JEIO, OV-11, Corea del Sur) y a temperatura de 65°C, hasta humedad constante (IMAGEN 3). Se utilizó un liofilizador (Virtis, modelo Benchtop K, Estados Unidos) para el secado por congelación con matraces de fondo redondo a una presión de vacío de 0,05 milibares y la temperatura del condensador a -55 °C (IMAGEN 4).



IMAGEN 2. Murta secada por convección



IMAGEN 3. Murta secada al vacío



IMAGEN 4. Murta liofilizada

2.3.2 Determinación de Humedad. Este método está basado en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa de la muestra desecada hasta un peso constante en estufa al aire (AOAC, 1995b).

2.3.3 Extracción de compuestos. Para la extracción de compuestos de la fruta. Se pesaron 4 gramos de fruta en un tubo Falcon; estas se trituraron con una baqueta de vidrio y se aforan a 50 ml con metanol acidulado (metanol 0,01% HCl). Las muestras fueron agitadas por una hora y dejadas en reposo por 48 horas, después de este tiempo se vuelven a agitar por 30 min y las muestras se centrifugan a 12000 rpm por 20 min. Las mediciones se realizaron en triplicado.

2.3.4 Simulación digestión gastrointestinal in vitro. Para la digestión in vitro se utilizó el método descrito por Tenore *et al.* (2013), con algunas modificaciones. En la digestión bucal se mezclan 20 gramos de fruta con 6 ml de saliva artificial, compuesta por 5,21 mg mL⁻¹ de NaHCO₃, 0,88 mg mL⁻¹ de NaCl, 0,48 mg mL⁻¹ de KCl, 0,44 mg mL⁻¹ de CaCl₂·2H₂O, 1,04 mg mL⁻¹ de K₂HPO₄, 2,16 mg mL⁻¹ de mucina y 0,1 mg mL⁻¹ de α-amilasa diluida en agua ultrapura, el pH se ajustó a 6,8 con ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N (Poinot *et al.*, 2009). La mezcla fue introducida en una bolsa plástica que contenía 40 mL de agua ultra pura y fue homogeneizada en un Stomacher durante 3 minutos, para simular la masticación. Para iniciar la etapa gástrica se adicionan 5 mL de pepsina (1 mg mL⁻¹, 14800 U) disuelto en agua ultrapura ajustando el pH de la digestión a 2,0 con HCl 6 N, posteriormente se incubó en un baño de agua termoregulado a 37°C por 2 horas a 250 rpm. Se continúa con la fase intestinal, ajustando el pH a 6,5 con NaHCO₃ 0,5N y se agrega 5 ml de una mezcla de pancreatina (4,0 mg mL⁻¹) y sales biliares (50 mg mL⁻¹); se incubó en un baño a 37°C durante 2 horas a 250 rpm.

2.3.5 Determinación de contenido de polifenoles totales. Los polifenoles se determinaron por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Este método opera reduciendo los polifenoles en una solución alcalina, resultando la formación de un complejo de coloración azul. Según lo señalado por Singleton y Rossi (1965), citados por Stanisavlejevic *et al.*, (2014), los polifenoles fueron determinados como ácido gálico equivalente (EAG) por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (FC). A 50 µL de extracto se añadieron 3150 µL de agua desionizada, 200 µL de reactivo de FC y 600 µL de carbonato de sodio (Na₂CO₃·5H₂O) al 20 %; la mezcla se agitó y se dejó en oscuridad por 2 horas. Transcurrido el tiempo, se leyó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro, se midió en triplicado la absorbancia a 765 nm. Los valores se

expresaron en (mg AGE/100 g de muestra seca). Para el cálculo de bioaccesibilidad de polifenoles totales se utilizó la siguiente ecuación:

$$[\% \text{ Bioaccesibilidad} = (\text{Cantidad digerida} / \text{Cantidad extraída}) \times 100] \quad \text{Ec.1}$$

Donde “Cantidad extraída” corresponde a la cantidad inicial de polifenoles totales de la fruta o fruta secada (mg EAG/100 g) y “Cantidad digerida” pertenece al análisis de la muestra al final de la digestión (Briones-Labarca *et al.* 2011).

2.3.6 Determinación de la capacidad antioxidante por el método del radical DPPH.

La capacidad antioxidante se determinó a través de la decoloración del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), propuesto por (Brand-Williams *et al.*, 1995). La muestra que se quiere analizar se mezcla con 2,9 ml de DPPH en metanol con una absorbancia de 0,8. A la muestra se le miden los valores de absorbancia a 515 nm después de 30 min. La capacidad antioxidante se expresó en Trolox equivalente ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$). Para cuantificar la inhibición se realizó una curva de calibración, usando el reactivo de Trolox a concentraciones de 250, 500, 750 y 1000 $\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{L}$. Usando como blanco DPPH a una absorbancia de 0,8 equivalente a 1 mM. La reacción se llevó a cabo durante 30 minutos, midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro a 515 nm a intervalos de 10 min.

Para el cálculo de bioaccesibilidad de la capacidad antioxidante se utilizó la ecuación 1.

2.3.7 Determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC.

El ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) se basó en el procedimiento descrito por *Ou et al* (2001) con algunas modificaciones. La reacción fue llevada a cabo en buffer fosfato 75 mM (pH 7,4), y la mezcla de reacción final fue de 270 μl . Se colocaron soluciones antioxidantes (45 μl), fluoresceína (175 μl , 70 nM, concentración final) en cada pocillo de la microplaca. La mezcla fue preincubada por 30 min a 37 °C, la solución de AAPH (50 μl , 20 mM, concentración final) se añadió rápidamente usando una micropipeta multicanal. La microplaca se colocó inmediatamente en el espectrofluorómetro de microplacas de doble exploración Gemini XPS durante 60 minutos, las lecturas de fluorescencia fueron registradas cada 3 minutos. La microplaca se agitó automáticamente antes de cada lectura. También se llevó a cabo un ensayo en blanco (FL + AAPH) utilizando buffer fosfato en lugar de la solución antioxidante y cuatro soluciones de

calibración utilizando Trolox como antioxidantes en cada ensayo. Las soluciones de calibración de Trolox fueron de 6, 12, 18 y a 24 μM . Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en triplicado. Los valores de ORAC se expresaron como μM de equivalente Trolox / 100 g masa seca.

2.3.8 Determinación del contenido de antocianinas totales. El contenido de antocianinas fue determinado según el método descrito por (Cheng y Breen, 1991). Para jugo de frutas; 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 2).

$$A = [(A_{510} - A_{700})_{pH=1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH=4,5}] \quad \text{Ec. 2}$$

La concentración de antocianinas (C) se determinó mediante la siguiente fórmula expresada en (mg /L)

$$C = \frac{A \times PM \times FD}{\epsilon \times L} \times 1000 \quad \text{Ec. 3}$$

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 cyanidina-3-glucósido con PM de 449,6 g/mol y ϵ de 29600 mol cm^2 (Wang *et al.* 2000). En la ecuación 3, A es el delta absorbancia, FD es el factor de dilución de la muestra y L es la longitud en cm. Para el cálculo de la bioaccesibilidad se utilizará la ecuación 1.

2.3.8 Metodología de detección de antocianinas por HPLC-DAD. Para la detección de antocianinas presentes en murta se utilizaron las siguientes condiciones cromatografías descritas en el CUADRO 1:

CUADRO 1: CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Columna	XTERRA C18
Temperatura de columna	30°C
Fase móvil	Ácido trifluoroacético 0,3%(A) / acetonitrilo (B)
Flujo	0,7 ml/min
Tiempo de corrida por muestra	60 min

Detección (nm)	520
Volumen de inyección	20 μ m
Modo	Gradiente

Perfil de gradiente.

Tiempo (min)	Fase A	Fase B
	(Ácido trifluoroacético 0,3%)	(acetonitrilo)
0	95%	5%
4	95%	5%
4,5	90%	10%
27	85%	15%
47	45%	55%
48	10%	90%
50	10%	90%
51	95%	5%
60	95%	5%

2.4 Diseño experimental

El diseño experimental que se considera para la realización del estudio es el completamente aleatorizado. El tratamiento consiste en someter la baya de murta bajo 3 métodos de deshidratación constituyendo un arreglo factorial de 1X3 evaluado en las 5 etapas de la simulación gastrointestinal *in vitro*. Se considera la baya de murta como la unidad experimental y 3 repeticiones por cada tratamiento. Las variables a evaluarse son el contenido de polifenoles totales, antocianinas totales, capacidad antioxidante (DDPH y ORAC).

Para el análisis estadístico, y en el caso de las variables cuantitativas, se aplicó el análisis de varianza para medidas repetidas en las etapas de la digestión sobre la misma unidad experimental. Cada etapa de la digestión se considera el factor de medida. En los casos donde se encuentren efectos significativos al 5 %, se realizarán pruebas de rangos múltiples de Tukey.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo por primera vez se estudia el efecto de los procesos de conservación sobre la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos. Para ello se utilizó un procedimiento de digestión *in vitro* para simular el proceso de la digestión gastrointestinal humano e investigar la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de la murta (*Ugni molinae* T.) en estado fresco, y bajo tres condiciones de secado (convectivo, al vacío y liofilización).

3.1 Determinación de contenido de humedad

Según el método de determinación gravimétrico de la pérdida de masa, se obtuvo que el contenido de humedad en fruta fresca utilizada en este estudio es de $77,5 \pm 0,35\%$, liofilizada $0,5 \pm 0,21\%$, secada al vacío $4,91 \pm 0,27\%$ y secada por convección $12,90 \pm 0,42\%$. Según Schmidt-Hebbel (1990), la humedad en murta corresponde a un $77,2\%$, lo cual concuerda con lo obtenido en el presente estudio. En el CUADRO 2 se detalla además el tiempo de secado para cada uno de los tratamientos.

CUADRO 2. TIEMPO DE SECADO Y PORCENTAJES DE HUMEDAD DE MURTA FRESCA Y SECADA CON LOS DIFERENTES MÉTODOS

Tratamiento	Tiempo de secado (h)	Humedad (%)
Murta fresca (control)		$77,5 \pm 0,35$
Liofilizada (10 mTorr/-80°C)	67,5	$0,5 \pm 0,21$
Secada al vacío (70 mmHg/65°C)	7,5	$4,91 \pm 0,27$
Secada por convección (65°C)	12,5	$12,9 \pm 0,42$

3.2 Ensayos preliminares

Se realizó un estudio previo donde se secó murta fresca por convección y vacío a tres distintas temperaturas: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ambos métodos secados, hasta una humedad constante y se determinaron los contenidos de polifenoles totales (PFT), antocianinas totales (CAT) y capacidad antioxidante por método de DPPH; tanto para la murta fresca como para la murta secada con las tres temperaturas escogidas.

En el CUADRO 3 se muestran los resultados de los análisis, tanto de la murta fresca como de la murta después de haber sido secada por convección a tres temperaturas. Se observó que el PFT, CTA y DPPH disminuyeron significativamente para los tratamientos a

las tres temperaturas con respecto a la murta fresca, demostrando con ello que las altas temperaturas afectan la estabilidad de los compuestos bioactivos.

La estabilidad de los compuestos a 50 °C, 65 °C y 80 °C entregó una diferencia altamente significativa con un nivel de confianza del 99% siendo el menor a 50 °C esto debido a que a menor temperatura se requiere de un mayor tiempo de secado para lograr la humedad constante requerida, dejando a los compuestos más expuestos al calor. La diferencia es significativa entre PFT, CTA y DPPH obtenidos a 50 °C y 65 °C, no así, entre los de 65 °C y 80 °C.

CUADRO 3. CONTENIDO TOTAL DE POLIFENOLES, ANTOCIANINAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MURTA FRESCA Y SECADA POR CONVECCIÓN Y AL VACÍO A TRES TEMPERATURAS

TRATAMIENTOS	PFT ^{1*}	CAT ^{2*}	DPPH ^{3*}
Fresca (control)	2451,5 ± 90,5 ^a	128,0 ± 2,0 ^a	14923,9 ± 657,9 ^a
<u>Secado convectivo</u>			
80°C	815,0 ± 12,5 ^b	6,9 ± 2,1 ^b	2980,4 ± 76,7 ^b
65°C	631,9 ± 12,1 ^b	4,0 ± 0,1 ^b	2766,1 ± 151,2 ^b
50°C	315,6 ± 62,5 ^c	0,9 ± 0,1 ^c	2396,5 ± 63,8 ^c
<u>Secado al vacío</u>			
80°C	678,0 ± 64,6 ^c	13,7 ± 3,5 ^c	8085,5 ± 35,1 ^b
65°C	1059,9 ± 18,8 ^b	25,7 ± 0,3 ^b	8423,7 ± 149,5 ^b
50°C	914,6 ± 92,6 ^c	18,5 ± 2,0 ^{bc}	8115,8 ± 63,5 ^b

^{1*} Contenido Total de Polifenoles expresados en mg Equivalente de Acido Gálico (EAG) /100g masa seca.

^{2*} Contenido Total de Antocianinas expresados en mg Cianidin-3-glucosido /100 g masa seca.

^{3*} Capacidad Antioxidante determinada por método de DPPH expresados en μmol Equivalente de Trolox (ET) /100 g masa seca. Resultados expresados con los valores de media ± desviación estándar (n=3), letras diferentes dentro de cada fila indica que existen diferencias estadísticamente significativas analizados por ANOVA y TUKEY (P<0,01).

En la CUADRO 3 se muestran los resultados de los análisis del contenido de polifenoles totales, contenido de antocianinas totales y capacidad antioxidante por método de DPPH en la murta fresca y la murta secada al vacío a tres distintas temperaturas. Se observó que los valores de PFT, CAT y DPPH disminuyeron significativamente con respecto a la murta fresca, demostrando con ello que las altas temperaturas y a bajo presión también afectan la estabilidad de los compuestos bioactivos.

La estabilidad de los compuestos a 50 °C, 65 °C y 80 °C entregó una diferencia altamente significativa con un nivel de confianza del 99% siendo el menor a 80 °C. La diferencia es significativa entre PFT, CAT obtenidos a 80 °C y 65 °C, no así, entre los de 65 °C y 50 °C

para CAT y entre los de 50 °C y 80 °C para PFT. Para la capacidad antioxidante (DPPH) no se presentan diferencias significativas entre las tres temperaturas, aunque se observó el mayor valor a 65 °C.

Dado los resultados estadísticos se escogió secar la murta por convección y al vacío a la temperatura de 65 °C.

3.3 Efecto de los tratamientos de secado en el contenido de polifenoles totales

En la FIGURA 2, se presentan los valores medio del contenido de polifenoles totales expresados en mg EAG/100g masa seca para la murta fresca y cada uno de los tratamientos de secado estudiados. Autores como Rodríguez *et al.*, (2014); Rubilar *et al.*, (2011) y Alfaro *et al.*, (2014) reportaron valores de PFT que varían de entre 1010 ±160 mg EAG/100 g masa seca hasta 4941±399 mg EAG/100 g masa seca en la murta fresca; en este estudio se detectaron 2451,53 mg EAG/100 g masa seca valor que está dentro de la gama de valores reportados tanto en murta como en zarzamora, frambuesa (Sariburun *et al.*, 2010), ciruelas, moras, arándanos y fresas (Balasundram *et al.*, 2006.; Vasco *et al.*, 2008.; Fu *et al.*, 2011). Las diferencias en PFT se debe a factores tales como metodología de extracción con diferentes solventes, factores climáticos, estado de madurez y ecotipo (Romojaro *et al.* 2003; Alfaro *et al.* 2013).

En el presente estudio el tratamiento de secado influyó significativamente ($p < 0.001$) en el contenido de polifenoles totales presentes de la murta fresca; la murta liofilizada reporta 1627,91 mg EAG/100 g masa seca y es el método que afecta este parámetro en menor medida, seguido del secado al vacío con 1059,88 mg EAG/100 g masa seca y el secado convectivo con 631.90 mg EAG/100 g masa seca. Para el proceso de liofilización varios autores reportaron porcentajes de pérdida de PFT que van desde el 10 al 40% (Norshahida *et al.* 2011) para frutas tropicales: fruta estrella, mango, papaya, melón, sandía; así mismo en un estudio realizado por Asami *et al.* (2003) a frutillas cultivadas bajo un sistema orgánico y convencional reportaron una pérdida del 31,5% luego de haber sido secada por liofilización; Kwok *et al.* (2006) obtuvieron una pérdida del 34% de fenoles totales para saskatun o baya de junio; porcentaje que se asemeja a la murta liofilizada de este estudio con un 34% de pérdida como se muestra en la FIGURA 2; contrario a estos resultados, Alfaro *et al.* (2014) reportaron que la liofilización tuvo un efecto positivo, aumentando el PFT con respecto a la murta fresca de la variedad Red Pearl-INIA. Las diferencias presentes en los valores de otros autores están dadas por la temperatura del

secado por liofilización que van desde $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 22 horas hasta 72 horas, el proceso de liofilización en este estudio fue a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 67 horas.

Para la murta secada al vacío y por convección a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura la pérdida del PFT es de 57% y 74% respectivamente; mostrando con ello que el calor tiene un efecto negativo disminuyendo en mayor medida los PFT en comparación con el liofilizado. En un estudio realizado por Mehmet *et al.* (2014) en arilos de granada secada al vacío a 55, 65 y $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ se reportó una disminución del 51, 56 y 58% respectivamente del contenido de fenoles totales con respecto a la fruta fresca, porcentajes que se asemejan a los obtenidos en este estudio; por otro lado, Stéger-Maté *et al.* (2011) reportaron una disminución de 35% para grosella negra y Orak *et al.* (2011) 85% para frutillas. Kwok *et al.* (2004), Rodríguez *et al.* (2014) y Chan *et al.* (2009) reportaron una disminución altamente significativa de entre 42 a 88% de fenoles totales para saskatun o baya de junio, murta y jengibre secadas por convección a temperaturas que van desde 40 a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los compuestos polifenólicos son susceptibles a los daños térmicos y por ende su pérdida durante varias operaciones de proceso (Skrede *et al.* 2010). Durante la operación de secado se podrían activar algunas enzimas oxidativas e hidrolíticas, que pueden conducir a las pérdidas de compuestos fenólicos (Larrosa *et al.* 2016); es por ello que la deshidratación en extractos de bayas tiene baja retención de los mismos al compararlos con muestras no procesadas (Kwok *et al.*, 2004). La disminución de PFT está muchas veces acompañada por la pérdida de otras propiedades bioactivas (Roy *et al.*, 2007). La liofilización realizada a bajas temperaturas es el que presenta menor pérdida de PFT, dado que los daños térmicos y químicos son limitados.

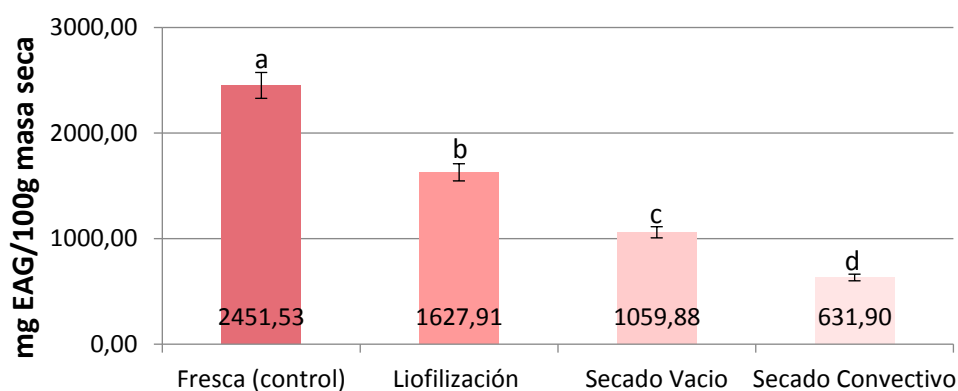


FIGURA 2. Efecto de los tratamientos de secado sobre el contenido de polifenoles totales en la murta.

3.4 Efecto de los tratamientos de secado sobre el contenido de antocianinas totales

Existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del contenido de antocianinas totales (CAT) de las muestras de murta fresca (control), liofilizada, secada al vacío y secada por convección, con un nivel del 99% de confianza ($P < 0,01$). Se determinó un contenido de antocianinas totales de 128 mg cianidina-3-glucósido/100 g masa seca para la murta fresca o control, y en los procesos de deshidratación donde hubo una degradación de las antocianinas se determinaron 50,44 mg; 25,75 mg y 4,04 mg cianidina-3-glucósido/100 g masa seca para murta liofilizada, secada por convección y secada al vacío, respectivamente. Como se observa en la FIGURA 3 el proceso de deshidratación provocó una clara degradación en estos compuestos; la murta deshidratada por liofilización resultó tener la mejor retención de las antocianinas con un 40%, a altas temperaturas al vacío se logró una retención de sólo 20% y por convección de sólo 4%; siendo el método de secado por convección el que más afectó el CAT, dado el bajo porcentaje de retención. El CAT en murta fresca como en muchas otras frutas varía de acuerdo a su estado de madurez, y la variedad. Alfaro *et al.* (2014) reportaron 7,8 mg cia-3-glu/100 g masa seca, por otro lado, López *et al.* (2016) reportaron 75,52 mg cia-3-glu/100 g masa seca y Ramírez *et al.* (2015) 685 mg cia-3-glu/100 g materia seca.

Es ampliamente conocido que las antocianinas son compuestos altamente vulnerables a la temperatura, presencia de oxígeno, ácido ascórbico, cambios en el pH (Kirca *et al.*, 2003; Harbourne *et al.*, 2008; Starr *et al.*, 1968; Shrikhande *et al.*, 1974; Kirca *et al.*, 2007; Fossen *et al.*, 1998); es por ello que la mayor degradación se presentó en las muestras de murta secadas por convección llegando a un 96% de pérdida, lo que causó una decoloración como resultado de la larga exposición a las altas temperaturas y el oxígeno Alfaro, *et al.* (2014) y López *et al.* (2016) reportaron 39% y 63% de pérdida de CAT para murta respectivamente, las diferencias de los porcentajes pueden deberse a los distintos métodos de extracción junto con los distintos tiempos de deshidratación; en frutillas Kwok *et al.* (2004) reportaron 84% de pérdida, porcentaje que se acerca al obtenido en este estudio. Seguido del secado convectivo, las muestras secadas bajo condiciones de vacío son los segundos en presentar la mayor pérdida de CAT con un 80%, porcentaje que es menor al del secado por convección puesto que en este método se evita el efecto por la presencia de oxígeno dada su condición de vacío. Es por ello que el proceso de liofilización es el más efectivo y el que causa menor degradación de las antocianinas. Los autores Alfaro *et al.* (2014); López *et al.* (2016) y Kwok *et al.* (2004) reportaron una leve

disminución y ligero aumento del CAT, que puede ser debido a la ruptura de las paredes celulares y la degradación química asociada con la congelación y posterior sublimación.

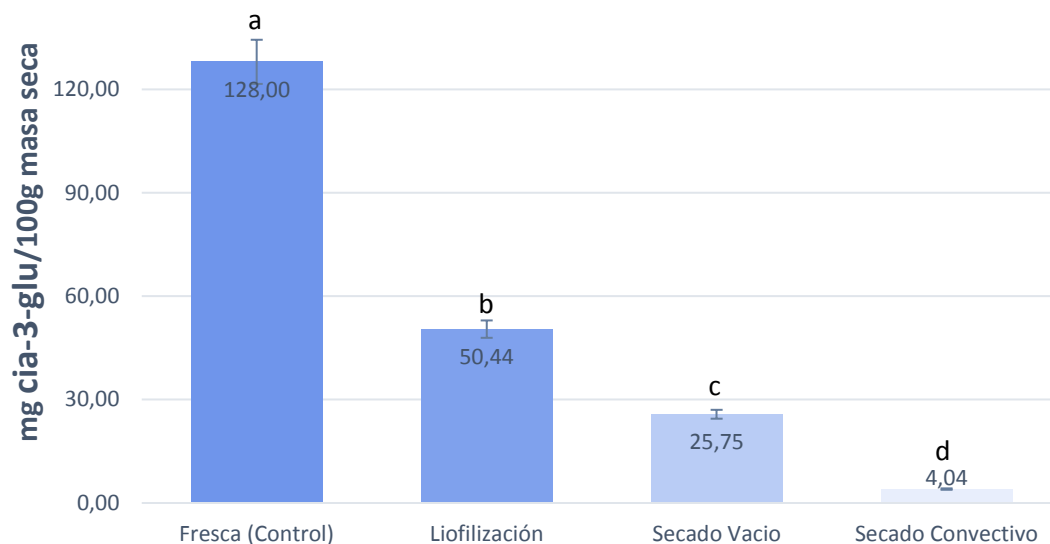


FIGURA 3. Efecto de los tratamientos de secado sobre el contenido de antocianinas totales en la murta.

3.5 Efecto de los tratamientos de secado en la capacidad antioxidante por método de DPPH y ORAC

Los resultados representados en la FIGURA 4 y el ANEXO 5 muestra la influencia de las técnicas de secado en la capacidad antioxidante determinada con los métodos de DPPH y ORAC en las muestras de murta fresca. La capacidad antioxidante está correlacionada con el PFT y CAT (Bunea *et al.* 2006), si bien el método de determinación por ORAC muestra contenidos mayores que los valores con método de DPPH es necesario señalar que los análisis se realizan con distintos tipos de radicales libre, que se utilizan para ser neutralizado por los antioxidantes presentes en la muestra analizada. Aunque podemos ver una clara tendencia en la capacidad antioxidante por los dos métodos según se muestra en la FIGURA 4; con la diferencia que en DPPH existen diferencias altamente significativas en cada uno de los tratamientos de secado mientras que en el método de ORAC no hay diferencias significativas entre la murta fresca (control) y liofilizada; pero si existe diferencias significativas entre la murta fresca y la murta secada por convección y al vacío. Por otro lado, los tratamientos con secado vacío y convectivo no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí.

Los datos presentados expresados en $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ masa seca indican que el secado convectivo muestra una menor retención de los compuestos tanto como en DPPH y ORAC con 18% y 39% respectivamente; resultados similares reportaron López *et al.* (2016) con un 38% en murta secada por convección y analizada por método de ORAC. La murta secada vacío logra una retención de 56% DPPH y 52% ORAC (FIGURA 4); López *et al.* (2016) reportaron en su estudio una retención de la capacidad antioxidante que va de 51% a 75%, para distintos tipos de secado (secado vacío, secado asistido infrarrojo, secado solar) donde se utiliza temperaturas de entre 50 °C a 70°C; porcentajes que está dentro de los obtenidos en este estudio. Por otro lado, Alfaro *et al.* (2016) y Joshi (2009) reportaron un aumento de la capacidad antioxidante en murta y rodajas de manzanas después de los tratamientos de secado (convectivo y vacío); relacionado al pardeamiento u oscurecimiento, cambios en la composición de polifenoles y posiblemente asociados con el aumento de los compuestos de aglicona.

Así como en PFT y CAT el proceso de liofilización resulta el mejor en retener los compuestos con un 84%, porcentaje que se asemeja los obtenidos en murta (López *et al.* 2016), saskatun o baya de junio (Kwok *et al.* 2004).

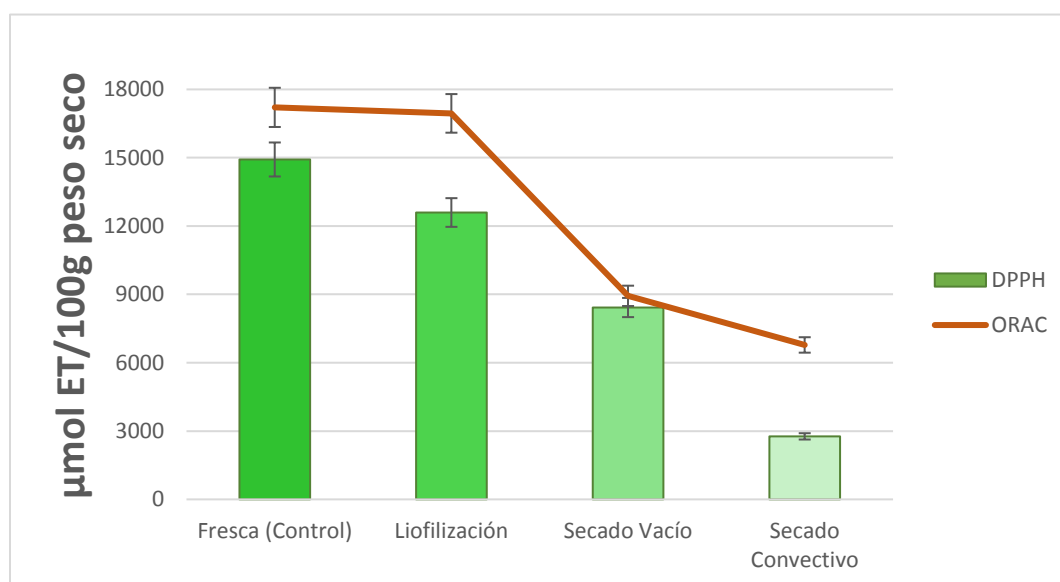


FIGURA 4. Efecto de los tratamientos de secado sobre la capacidad antioxidante por método DPPH y ORAC en la murta.

3.6 Efecto de los tratamientos de secado y de las etapas de digestión *in-vitro* sobre la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos (PFT, CAT)

Murta fresca, liofilizada, secada al vacío y secada por convección se sometieron a un proceso de simulación gastrointestinal (GI) *in-vitro*, la liberación de PFT y CAT desde la matriz alimentaria fue determinada midiendo o analizando los compuestos que se encuentran bioaccesibles en 5 etapas de la simulación GI (etapa bucal, gástrica final, intestino delgado inicial (duodeno), intestino delgado medio (yeyuno), intestino delgado final (Íleon)). El porcentaje de bioaccesibilidad representados también en la FIGURA 5 fue determinado con la Ec. 1. Según los resultados obtenidos en el análisis de varianza con medidas repetidas FIGURA 5A existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos de la murta y las etapas de la simulación GI *in-vitro*, con un nivel del 99% de confianza ($P < 0,01$). Los valores de media \pm desviación estándar y porcentaje de bioaccesibilidad se encuentran en el ANEXO 6.

El mayor porcentaje de bioaccesibilidad de PFT se reporta en la murta liofilizada durante la etapa gástrica final con un 96% de liberación, murta fresca y secada por convección alcanzan el mayor porcentaje de liberación en la etapa intestino medio con un 90% y 80% respectivamente FIGURA 5A. Los porcentajes de bioaccesibilidad de murta secada al vacío son relativamente bajos; siendo el 42% el mayor durante la etapa intestinal. Se detectaron bajos porcentajes en la etapa bucal o masticación en relación a las demás etapas de la digestión GI, por lo tanto; en nuestro estudio la enzima α -amilasa tuvo poco efecto en la liberación de PFT o el tiempo de masticación no es suficiente; lo que justificaría la omisión de este paso en otros estudios (Bermúdez-Soto, *et al.* 2016; Marhuenda *et al.* 2016; Gil-Izquierdo *et al.* 2016; Velderrain-Rodríguez *et al.* 2016) exceptuando el proceso convectivo cuyas etapas de intestino medio y final son menores que la etapa bucal, con 20% y 15% respectivamente.

Según Hollman, *et al.* (1997) la estabilidad de los compuestos fenólicos puede ser afectados por las diferencias en las estructuras de la pared celular, la ubicación de los glicósidos en las células y la unión de los fenoles dentro de la matriz de alimentos. Varios estudios concuerdan en la disminución de los compuestos durante la fase intestinal como sucede en el presente estudio con murta liofilizada y secada al vacío; Ortega *et al.* (2011) reporta 84% de disminución en la etapa gástrica y 78% de disminución en la etapa intestinal para la harina de algarrobo, a su vez Correa-Betanzo *et al.* (2014) reportaron 98% y 49% de disminución respectivamente en arándano silvestre. Por otro lado, la murta

fresca (control) y secada por convección muestran el mayor porcentaje de bioaccesibilidad durante la etapa intestinal entre 70% a 90%; resultados similares reporta Bouayed *et al.* (2011) en distintas variedades de manzanas y Velderrain-Rodríguez *et al.* (2016) en papaya, mango y piña.

Cabe mencionar que la murta posee un alto contenido de pectina similares a la pectina cítrica comercial (Taboada *et al.*, 2010), Argyri *et al.* (2006) observaron que la solubilidad y la disponibilidad de compuestos fenólicos, están influenciadas por el pH y las interacciones con otros compuestos como, la fibra o las proteínas. Por otro lado, Parada *et al.* (2007) menciona que la fibra dietética puede estar ligada a los compuestos fenólicos impidiendo su total liberación de la matriz alimentaria. Ortega *et al.* (2011) en un estudio de harina de algarrobo concluye que, debido a la eliminación de los componentes solubles en agua de la matriz alimentaria, los azúcares y fibra soluble podría tener un rol protector de los compuestos fenólicos contra los cambios de pH y actividad enzimática durante el proceso de digestión, incrementando su estabilidad y potencial bioaccesibilidad.

En cuanto al CAT podemos observar en la FIGURA 5B que existen diferencias significativas entre los tratamientos de la murta y las etapas de la simulación GI in-vitro, con un nivel del 99% de confianza ($P < 0,01$). Al igual que en PFT los porcentajes de bioaccesibilidad en la EB son menores que comparación con la etapa GF, siendo murta secada al vacío el mayor con un 54% seguido por liofilizado, secado convectivo, y murta fresca o control con 31%, 26% y 12% respectivamente. Varios autores reportan valores que van de 18% hasta 60% de bioaccesibilidad en la etapa bucal en frutas de durazno, ciruela, maqui; por otro lado, frutas como ciruelas pasas, nueces, tomates y uva no se detectan CAT (Tagliacruzchi *et al.*, 2012; Lucas-González *et al.*, 2016; Tagliacruzchi *et al.*, 2010). Durante la etapa GF el porcentaje de bioaccesibilidad fue superior para la murta fresca (control) con 65% seguido por el secado vacío con 63%, para liofilización y secado convectivo, 46% y 34% respectivamente. El aumento en la bioaccesibilidad se le atribuye las condiciones de pH bajo (pH 2.0) durante esta etapa de la digestión, como se había mencionado antes, las antocianinas son más estables a pH ácidos. Correa-Betanzo *et al.*, (2014) reporta 96.8% de recuperación CAT para arándanos durante la etapa GF, Bouayed *et al.* (2011) reporta 91% en variedad de manzana Jonaprinz; ciruela 69% (Tagliacruzchi *et al.*, 2012) lo que comprueba un claro comportamiento sobre la estabilidad de las antocianinas durante la digestión. En la etapa intestinal (II, IM, IF) no fue posible analizar CAT por la metodología diferencial de pH dado el alto contenido de pectina presente en la

murta, las muestras formaron un gel impidiendo realizar el análisis donde se requería la muestra líquida.

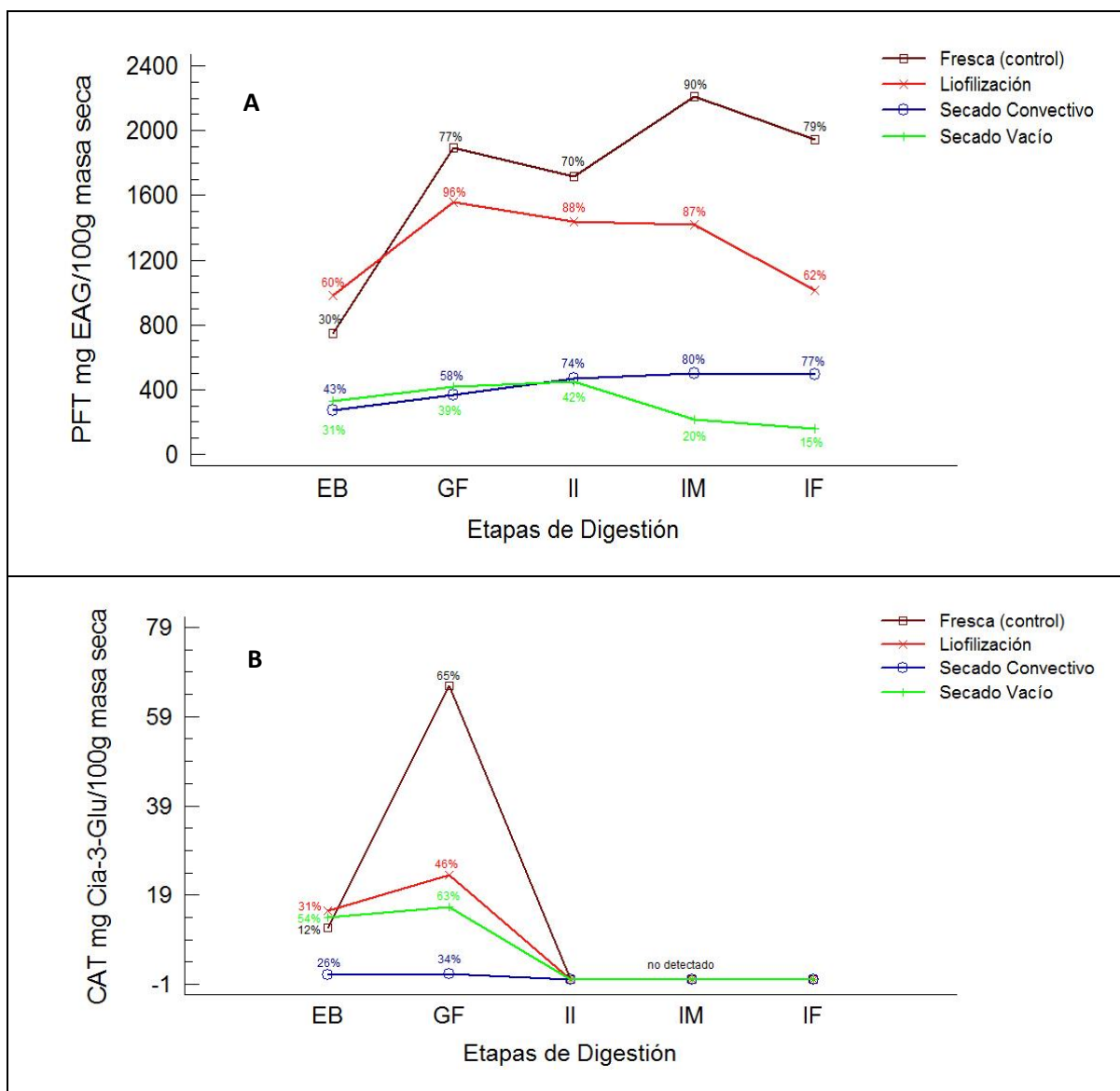


FIGURA 5. Efecto de los tratamientos de secado y etapas: Etapa bucal (EB), gástrica final (GF), intestino inicial (II), intestino medio (IM) e intestino final (IF) de la digestión in-vitro en el porcentaje de bioaccesibilidad de PFT (**A**) y CAT (**B**) en murta fresca (\square), murta liofilizada (\times), murta secada al vacío ($+$) y murta secado convectivo (\circ).

3.7 Identificación de Antocianinas determinadas por HPLC-DAD.

Puesto que por el método de análisis de antocianinas por diferencial de pH no fue posible detectar los CAT durante la etapa intestinal, las muestras de murta fresca y secadas sometidos a digestión *in vitro* fueron analizadas por HPLC-DAD; de ese modo verificar si estos compuestos son liberados durante la etapa intestinal (II, IM, IF).

En las FIGURA 6, se muestra el cromatograma de la murta liofilizada. Dos tipos de antocianinas fueron detectadas para todas las muestras, una corresponde a cianidina-3-glucósido que se encuentra en menor proporción entre el tiempo 12.00 a 13.00 minutos; la segunda detectada entre el tiempo 13.00 y 14.00 minutos no fue identificado por no contar con el correspondiente patrón. No obstante, Ramírez *et al.* (2015) en un estudio realizado a murta detectaron las siguientes antocianinas: cianidina-3-rutinosido, petunidina-3-rutinosido, petunidina-3-galactosido, peonidina-3-glucosido, peonidina-3-arabinosa y cianidina-3-glucosido. Por otro lado, Ruiz *et al.* (2010) detectaron dos antocianinas: peonidina-3-glucosido y cianidina-3-glucosido, por lo cual dado las referencias se presume que la antocianina no identificada correspondería a la peonidina-3-glucosido.

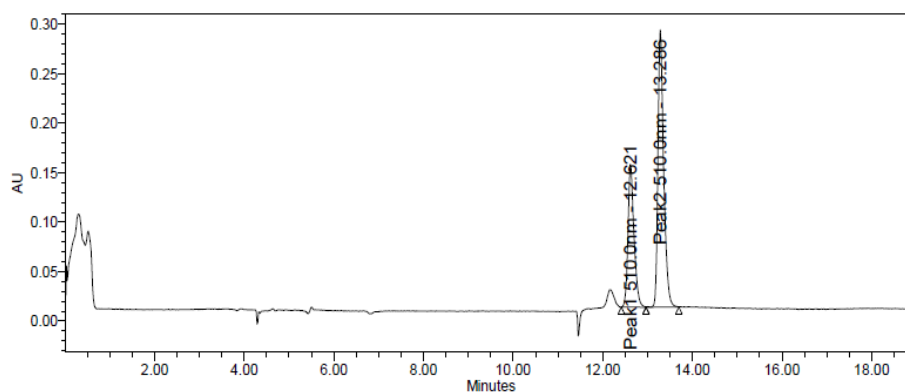


FIGURA 6. Cromatograma HPLC murta liofilizada

No fue posible cuantificar las antocianinas mediante la metodología establecida, puesto que los valores reportados estuvieron bajo el límite de cuantificación, para lo cual se realizó una cuantificación de las respectivas áreas de los picos en cada una de las muestras durante cada etapa de la digestión. En las FIGURAS 7, 8 se reportan las áreas de la peonidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido respectivamente, donde ambas coinciden que las muestras controles (es decir que no fueron sometidos a la digestión GI *in vitro*) tuvieron mayores unidades de absorbancia, seguido por la etapa GF. Durante la etapa bucal (EB) así como en la etapa intestinal (II, IM e IF) las antocianinas se detectaron, pero en unidades de absorbancia menores las cuales podrían ser afectadas por las condiciones de pH alcalino propia del intestino (pH 6,5). Lucas-González *et al.*

(2016) en un estudio realizado a bayas de maqui reportaron mayor bioaccesibilidad durante la etapa gástrica, mientras que en la etapa intestinal no detectaron antocianinas. Marhuenda *et al.* (2016) reportaron una disminución durante la etapa intestinal del 68,3% para los arándanos, 90,1% en moras, 89,8% en fresas y el 73% en frambuesas; valores que se asemejan los obtenidos en este estudio.

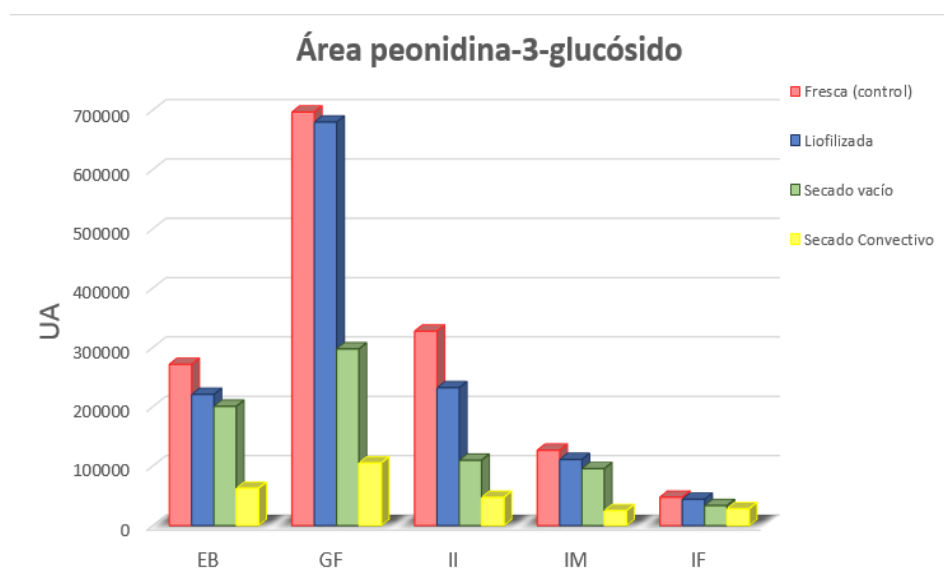


FIGURA 7. Área peonidina-3-glucósido de murta fresca (■), liofilizada (■), secada al vacío (■) y secados por convección (■); durante digestión in-vitro, EB, GF, II, IM, IF.

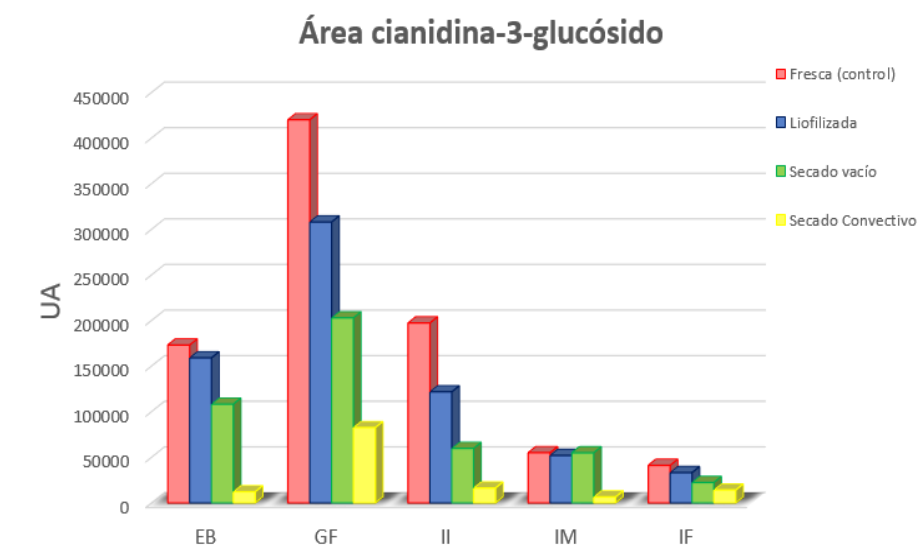


FIGURA 8. Área cianidina-3-glucósido de murta fresca (■), liofilizada (■), secada al vacío (■) y secados por convección (■); durante digestión in-vitro, EB, GF, II, IM, IF.

La disminución de la bioaccesibilidad de antocianinas totales podría explicarse por la transformación que experimenta la estructura de las antocianinas a lo largo de la amplia digestión y el equilibrio dependiente del pH entre las cinco especies (catión de flavilo, base de carbinol, chalcona, base quinonoidal y base quinoloidal aniónica) lo que conduciría a una desproporción sobre las estructuras iniciales de las antocianinas. (Del Rio *et al.*, 2013)

3.8 Efecto de los tratamientos de secado y etapas de la digestión in-vitro en el porcentaje de bioaccesibilidad de la capacidad antioxidante (DPPH, ORAC)

En la FIGURA 9A y 9B se muestra el cambio de la capacidad antioxidante medidos por método DPPH y ORAC durante las diferentes etapas de la digestión GI *in vitro*. Según análisis estadístico de medidas repetidas, existen diferencias altamente significativas con un 99% de confianza ($P < 0,01$). Los valores de media \pm desviación estándar de la capacidad antioxidante DPPH, ORAC y porcentaje de bioaccesibilidad se encuentran en el ANEXO 6. Los resultados demuestran que la capacidad antioxidante es relativamente estable durante todo el proceso digestivo en la murta fresca y deshidratada por los distintos métodos; Al final de la digestión (II) los distintos tratamientos y la murta fresca (control) alcanzan de entre 71% a 86% en DPPH; por método de ORAC la variación es mayor de 61% a 127%. Tanto en ORAC como en DPPH se observa que alcanzan el mayor porcentaje de bioaccesibilidad durante la etapa intestinal, ya sea en II, IM o IF. Autores coinciden con lo obtenido en este estudio, donde la capacidad antioxidante se mantiene estable e incluso aumentan durante las etapas de digestión en varios jugos de frutas y pan (Gawlik-Dziki *et al.* 2009; Wootton-Beard *et al.* 2011). Contrario a lo que sucede en otros estudios con arándano, piña, mango, papaya y maqui donde reportan pérdidas de la capacidad antioxidante durante la digestión (Correa-Betanzo *et al.* 2014; Velderrain-Rodríguez *et al.* 2016; Lucas-González *et al.*, 2016). Thaipong *et al.* (2006) en un estudio realizado a extractos de frutas de guaba compararon distintos métodos de determinación de capacidad antioxidante (FRAP, ORAC, DPPH, ABTS), reportaron que los métodos ORAC y DPPH son los de menor correlación en comparación con los demás, lo cual podría explicar las diferencias en los porcentajes de bioaccesibilidad y capacidad antioxidante en el presente estudio.

Quirós-Sauceda *et al.* (2011) mencionan que una cantidad apreciable de polifenoles asociados a la fibra dietaria proporciona una capacidad antioxidante significativa que

puede tener efectos pronunciados en sus propiedades; así como la hidrólisis parcial de los compuestos fenólicos hidrolizables por los tratamientos enzimáticos propios del intestino (Hsu *et al.* 2011) lo que podría relacionarse con la estabilidad de la capacidad antioxidante durante la digestión en este estudio. Este hecho evidencia la relevancia de los enzimas en cuanto a favorecer la correcta digestión de macro y micronutrientes, y en especial en presencia de los característicos de la fase intestinal (sales biliares y pancreatina).

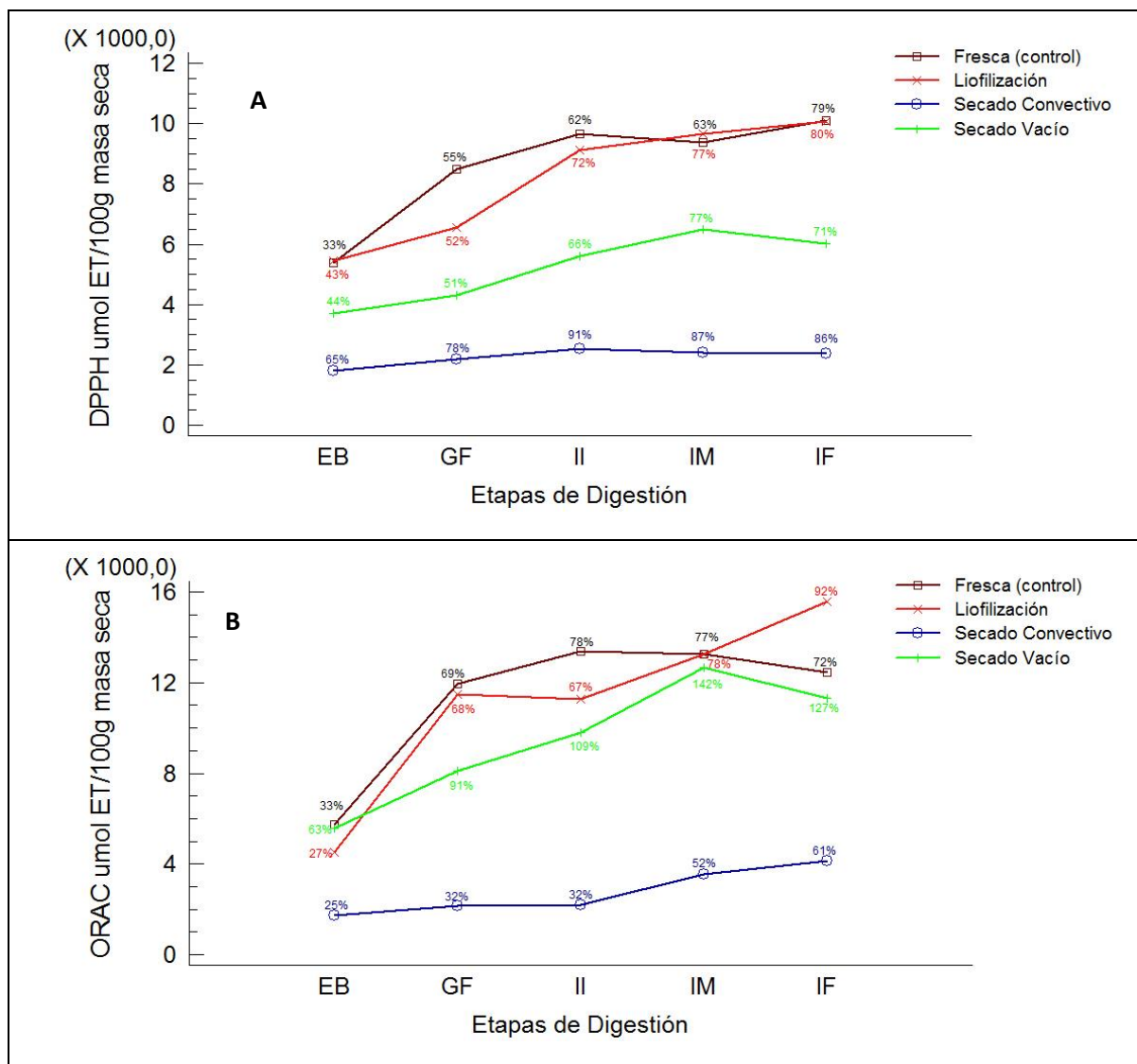


FIGURA 9. Efecto de los tratamientos de secado y etapas: Etapa bucal (EB), gástrica final (GF), intestino inicial (II), intestino medio (IM) e intestino final (IF) de la digestión in-vitro en el porcentaje de bioaccesibilidad de la capacidad antioxidante DPPH (A) y ORAC (B) en murta fresca (\square), murta liofilizada (\times), murta secada al vacío ($+$) y murta secado convectivo (\circ).

4. CONCLUSIONES

Los diferentes métodos de secado tienen un efecto significativo en los compuestos bioactivos de las bayas de murta. El secado por liofilización es el mejor método para la retención de los compuestos bioactivos (polifenoles totales, antocianinas totales, capacidad antioxidante), por otro lado; el secado por convección resultó el menos apropiado para la retención de los compuestos bioactivos al mostrar los valores más bajos en sus contenidos.

La simulación de la digestión GI *in vitro* de la murta con diferentes métodos de secado pone de manifiesto la influencia del tratamiento de secado y la matriz sobre los cambios de los compuestos bioactivos (polifenoles, antocianinas y capacidad antioxidante), así como su bioaccesibilidad. El porcentaje de bioaccesibilidad de PFT en la etapa final de la digestión varía entre 62% y 79% para las muestras de murta fresca, liofilizada y secada por convección, mientras que; las muestras de murta secadas al vacío obtuvieron el porcentaje más bajo con 15%. En cuanto al porcentaje de bioaccesibilidad de la capacidad antioxidante (DPPH y ORAC) los valores varían entre 61% y 127% para todas las muestras. Estos valores demuestran la factibilidad de mantener los compuestos bioactivos en la murta fresca y procesada, por lo tanto, puede esperarse que cierto porcentaje de polifenoles lleguen al colon, y así ser absorbidos en este tramo de la digestión.

Se observó que la fibra dietaria (pectina) presentes en la baya de murta, es un interferente para la determinación de bioaccesibilidad de antocianinas totales por método diferencial pH.

La estabilidad de los compuestos bioactivos durante el paso por la digestión GI *in-vitro* de murta fresca y procesada con distintos tratamientos de secado es una herramienta muy útil y eficaz para evaluar métodos de procesamiento de alimentos procesados ricos en compuestos bioactivos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Akpinar, E., & Bicer, Y. (2005). Modelling of the drying of eggplants in thin-layers. *International Journal of Food Science and Technology*, 40(3) 273-281.
- Alfaro, S. (2016). Effects of Drying Techniques on Murtilla Fruit Polyphenols and Antioxidant Activity. *Journal of Food Research*, 895. doi:10.5539/jfr.y3n5p73
- Alfaro, S., Mutis, A., Palma, R., Quiroz, A., Seguel, I., & Scheuerman, E. (2013). Study of polyphenols content and antioxidant activity in murtilla (*Ugni molinae* Turcz) fruits in function of genotype and harvest season. *J Soil Sci Plant Nutr.*, 13, 67-78. doi:10.4067/SO718-95162013005000007
- Argyri, K., Komaitis, M., Kapsokefalou, M. (2006). Iron decreases the antioxidant capacity of red wine under conditions of in vitro digestion. *Food Chemistry*, 96, 281–289
- Asami, D., Hong, Y., Barrett, D., Mitchell, I. (2003). Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grown Using Conventional, Organic, and Sustainable Agricultural Practices. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1237-1241 1237.
- Bérmudez-Soto, M., Tomás-Barberán, F., García-Conesa, M. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 865–874.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128 14–21.
- Bunea, A., Ruginá, D., Pintea, A., Sconța, Z., Bunea, C., Socaciu, C. (2011). Comparative Polyphenolic Content and Antioxidant Activities of Some Wild and Cultivated Blueberries from Romania. *Not Bot Horti Agrobo*, 39(2):70-76.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, S.K., Lim, K.K., Tan, S.P., Lianto, F.S., Yong, M.Y. (2009). Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chemistry*, 113 166–172 .

- Cilla, A., González-Sarrías, F., Barberán, T., Espín, J., & Barber, R. (2009). Availability of polyphenols on fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 114, 813-820.
- Correa-Betanzo, J., Allen-Vercoe, E., McDonald, J., Schroeter, K., Corredig, M., Paliyath, G. (2014). Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 165, 522–531.
- de Figueiredo, R., de Sousa, P., & de Abreu Menezes, E. (2014). In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem.*, 15: 161-142-7.
doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.0123
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J., Tognolini, M., Borges, G. y Crozier, A. (2013) "Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 18, no. 14, pp. 1818–1892, 2013.
- de Torres, C., Díaz-Maroto, M., Hermosín-Gutiérrez, I., & Pérez-Coello, M. (2007). Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 162-165.
- Figiel, A. (2010). Drying kinetics and quality of beetroots dehydrated by combination of convective and vacuum-microwave methods. *Journal of Food Engineering*, 98(4), 461-470.
- Grace, M., Massey, A., Mbeunkui, F., Yousef, G., & Lila, M. (2012). Comparison of health-relevant flavonoids in commonly consumed cranberry products. *J Food Sci*, 176-183. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02788.x
- Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Baraniak, B., Lin, R. (2009). The effect of simulated digestion in vitro on bioactivity of wheat bread with Tartary buckwheat flavones addition. *Food Science and Technology*, 42, 137–143.

- Gil-Izquierdo, A., Gil, M., Ferreres, F. y Toma's-Barbera'n, F. (2001). In Vitro Availability of Flavonoids and Other Phenolics in Orange Juice. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1035-1041.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem*, 1841-1856. doi:10.1021/jf030723c
- Hollman, P., van Trijp, J., Buysman, M., Gaag, M., Mengelers, M., & de Vries, J. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various food in man. *FEBS Letters*, 418, 152–156.
- Hsu, C., Hurang, S., Chen, W., Weng, Y., Tseng, C. (2004). Qualities and antioxidant properties of bread as affected by the incorporation of yam flour in the formulation. *International Journal of Food Science and Technology*, 39 231–238.
- Irzyniec, Z., Klimczak, J., & Michalowski, S. (1995). Freeze-Drying of The Black Currant Juice. . *Drying Technology*, 417- 424.
- Jaya, S., & Das, H. (2003). A vacuum drying model for mango pulp. *Drying Technology*, 1215-1234.
- Joshi, A., Rupasinghe, H., Khanizadeh, S. (2011). Impact of drying processes on bioactive phenolics, vitamin c and antioxidant capacity of red-fleshed apple slices. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35 453–457.
- Krokida, M., Karathanos, V., & Maroulis, Z. (1998). Effect of Freeze-drying Conditions on Shrinkage and Porosity of Dehydrated Agricultural Products. *Journal of Food Engineering* , 35, 369-380.
- Kulkarni , S., Acharya , R., Rajurkar, N., & Reddy , A. (2007). Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by in vitro digestion method. *Food Chemistry*, 103, 681-688.
- Kwok, B., Durance, T., & Kitts, D. (2004). Dehydration techniques affect phytochemical contents and free radical scavenging activities of Saskatoon berries (*Amerlachie alnifolia* Nutt). *J Food Sci.*, 122-126. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb13381.x

- Larrosa, A., Comitre, A., Vaz, I., Pinto, I. (2016). Influence of air temperature on physical characteristics and bioactive compounds in vacuum drying of arthrospira spirulina. *Journal of Food Process Engineering*, 1745–4530.
- Lewicki, P. (2006). Design of hot air drying for better foods. *Trends Food Sci Tech*, 153-163. doi:10.1016/j.tifs.2005.10.012
- López, J., Ah-Hen, K., Vega-Gálvez, A., Morales, A., García-Segovia, P., Uribe, E. (2016). Effects of drying methods on quality attributes of murta (*ugni molinae turcz*) berries: bioactivity, nutritional aspects, texture profile, microstructure and functional properties. *Journal of Food Process Engineering*, doi.10.1111/jfpe.12511
- López, J., Uribe, E., Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., González, E., & Di Scala, K. (2010). Effect of air temperature on drying kinetics, vitamin C, antioxidant activity, total phenolic content, non enzymatic browning and firmness of blueberries variety O'Neil. *Food Bioprocess Tech.*, 772-777. doi:10.1007/s11947-009-0306-8
- Lucas-Gonzalez, R., Navarro-Coves, S., Pérez-Álvarez, J., Fernández-López, J., Muñoz, L., Viuda-Martos, M. (2016). Assessment of polyphenolic profile stability and changes in the antioxidant potential of maqui berry (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) during in vitro gastrointestinal digestion. *Industrial Crops and Products*, 94 774–782 .
- Marfil, P., Santos, E., & Telis, V. (2008). Ascorbic acid degradation kinetics in tomatoes at different drying conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1642-1647.
- Marhuenda, J., Aleman, M., Gironés-Vilaplana, A., Pérez, A., Caravaca, C., Figueroa, F., Mulero, J. y Zafrilla, P. (2016). Phenolic Composition, Antioxidant Activity, and In Vitro Availability of Four Different Berries. *Journal of Chemistry*, doi.org/10.1155/2016/5194901
- Marques, L., Silveira, A., & Freire, J. (2006). Freeze-drying characteristics of tropical fruits. *Drying Technol.*, 24, 457-463.
- McDougall, G., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5896-5904.

- Mehmet, K., Mehmet, F., Ozge, C., Hasan, V., Ali, I., Ali, C. (2014). Drying kinetics and thermal degradation of phenolic compounds and anthocyanins in pomegranate arils dried under vacuum conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 595–605.
- Mejía-Meza, E., Yanez, J., Davies, N., Rasco, B., Younce, F., Remsberg, C., & Clary, C. (2008). Improving nutritional value of dried blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) combining microwave-vacuum, hot-air drying and freeze-drying technologies. *Int J Foo Eng*, 4(5): 1-6.
- Mejía-Meza, E., Yañez, J., Remsberg, C., Takemoto, J., Davies, N., Rasco, B., & Clary, C. (2010). Effect of dehydration on raspberries: polyphenol and anthocyanin retention, antioxidant capacity, and antiadipogenic activity. *J Food Sci.*, 75, 5-12. doi:10.1111/j.1750-3841.200901383.x
- Muñoz C. (1959). *Sinopsis de la flora chilena: claves para la identificación de familias y géneros*. Santiago de Chile: Ediciones de la Universidad de Chile.
- Muñoz C. (1966). *Familias de las mirtáceas. In: Flores Silvestres de Chile*. Santiago: Ediciones de la Universidad de Chile.
- Norshahida, M., Azizah, A., Azizah, O., Nazamid, S., Farooq, A., Mohd, S., & Muhammad, R. (2011). Effect of Freeze-Drying on the Antioxxidant Compounds and Antioxxidant Activity of Selected Tropical Fruits. *Int. J. Mol. Sci*, 12, 4678-4692. doi:10.3390/ijms12074678
- Orak, H., Aktas, T., Yagar, H., Isbilir, S., Ekinci, N., Sahin, F. (2011). Antioxxidant activity, some nutritional and colour properties of vacuum dried strawberry tree (*arbutus unedo* L.) fruit. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 10(3), 327-338.
- Ortega, N., Macia, A., Romero, M., Reguant, J., Motilva, M. (2011). Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in-vitro digestion model. *Food Chemistry*, 124 65–71.
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Jimenez, R., Santos-Buelga, C., & Osuna, A. (2009). Antihypertensive effects of flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep.*, 61: 67-75.

- Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D., & Stockley, C. (2013). The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food*, 12, 483-508.
- Reyes, A., Bubnovich, V., Bustos, R., Vásquez, M., & Vega, R. (2010). Comparative Study of different process conditions of freeze drying of "Murtilla" berry. *Drying Technology*, 28, 1416-1425.
- 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 and Technology*, 49(4), 990-1000.
- Rolfes, S., Pinna, K., & Whitney, E. (2009). Understanding of normal and clinical nutrition. *Wadsworth Cengage Learning. 8th edition.*
- Roy, M., Takenaka, M., Isobe, S., Tsushida, T. (2007). Antioxidant potential, anti-proliferative activities, and phenolic content in water-soluble fractions of some commonly consumed vegetables: Effects of thermal treatment. *Food Chemistry* 103 106–114.
- Rubilar, M., Jara, C., Poo, Y., Acevedo, F., Gutierrez, C., Sineiro, J., & Shene, C. (2011). Extracts of maqui (*Aristotelia chilensis*) and murta (*Ugni molinae* Turcz): sources of antioxidant compounds and alfa-glucosidase/alfa-amylase inhibitors. *J Agric Food Chem*, 59, 1630-1637. doi:10.1021/jf103461k
- Ruiz, A., Hermosín-Gutierrez, I., Vergara, C., von Baer, D., Zapata, M., & Hitschfeld, A. (2013). Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC DAD-ESI-MS/MS. *Food Research International*, 51, 706-713.
- Ruiz, A., Hermosin-Gutierrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Dorau, C., & von Baer, D. (2010). Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from southern Chile. *J Agric Food Chem*, 58, 6081-6089. doi:10.1021/jf100173x
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goni, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 492-501.

- Sariburun, E., Ahin, S., Demir, C., Tükben, C., Uylas, V. (2010). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Raspberry and Blackberry Cultivars. *Journal of food science*, 75 4.
- Scheuermann E, S. I. (2008). Evolution of aroma compounds of murtila fruits (Ugni moline Turcz) during storage. *Journal of Science of Food and Agriculture*.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C., Hollenberg, N., . . . Kelm, M. (2006). Epicatechin mediates beneficial effects of flavonol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 1024-1029.
- Seeram, N. (2008). Berry fruits: Compositional elements biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J. Agric. Food Chem*, 56, 627-629.
- Shene, C., Reyes, A., Villarroel, M., Sineiro, J., Pinelo, M., & Rubilar, M. (2009). Plant location and extraction procedure strongly alter the antimicrobial activity of murtila extracts. *Eur Food Res Technol.*, 228, 467-475. doi:10.1007/s00217-008-0954-3
- Silva de Lima, A. C., Soares, D. J., Ribeiro da Silva, L., Chua, K., Mujumdar, A., Hawlader, M., . . . Ho, J. (2001). Batch drying of banana pieces-effect of stepwise change in drying air temperature on drying kinetics and product colour. *Food Research International*, 34, 721-731.
- Skrede, G., Wrolstad, R., Durst, R. (2000). Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of food science*, 65, 2.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Sciences*, 24673-24706. doi:10.3390/ijms161024673
- Soysal, Y., Ayhan, Z., Esturk, O., & Arikan, M. (2009). Intermittent microwave convective drying of red pepper: drying physical (colour and texture) and sensory quality. *Biosystems Engineering*, 103, 446-455.
- Speisky, E., Peña, A., Gómez, M., Fredes, C., & Hurtado, M. (2008). Antioxidants in Chilean berries. *Acta Horticulturae*, 777, 485-492.

- Stahl , W., van den , B., & Arthur , J. (2002). Bioavailability and metabolism. *Mol Aspects Med*, 23:39 - 100.
- Stéger-Máté, M., Nótin, B., Juhász, R., Verasztó, B., Jakab, D., Monspart-Sényi, J. and Barta, J. (2011). Effect of vacuum drying on blackcurrant's antioxidant components. International congress on engineering and food, May 22–26, Athens, Greece.
- Stojanovic, J., & Silva, J. (2007). Influence of osmotic concentration, continuous high frequency ultrasound and dehydration on antioxidants, color and chemical properties of rabbiteye blueberries. *Food Chem*, 101, 898-906. doi:10.1016/j.foodchem.2006.02.044
- Taboada, E. F.-M. (2010). Isolation and characterization of pectin substances from murta (*Ugni molinae Turcz*) fruits. *Food Chemistry* , 123, 669-678.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120, 599-606.
- Thaipong, K., Boonprakoba, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 669–675.
- Vasco, C., Ruales, J., Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111 816–823.
- Velderrain-Rodríguez, G., Quirós-Sauceda, A., Mercado-Mercado, G., Ayala-Zavala, J., Astiazarán-García, H., Robles-Sánchez, R., Wall-Medrano, A., Sayago-Ayerdi, S., González-Aguilar, G. (2016). Effect of dietary fiber on the bioaccessibility of phenolic compounds of mango, papaya and pineapple fruits by an in vitro digestion model. *International Journal of Food Science and Technology*, 0101-2061
- Williamson , G., & Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr.*, 243-255.
- Wojdylo, A., Figiel, A., & Oszmianki, J. (2009). Effect of drying methods with the application of vacuum microwaves on the bioactive compounds, color, and

antioxidant activity of strawberry fruits. *J Agric Food Chem*, 57, 1337-1343.
doi:10.1021/jf802507j

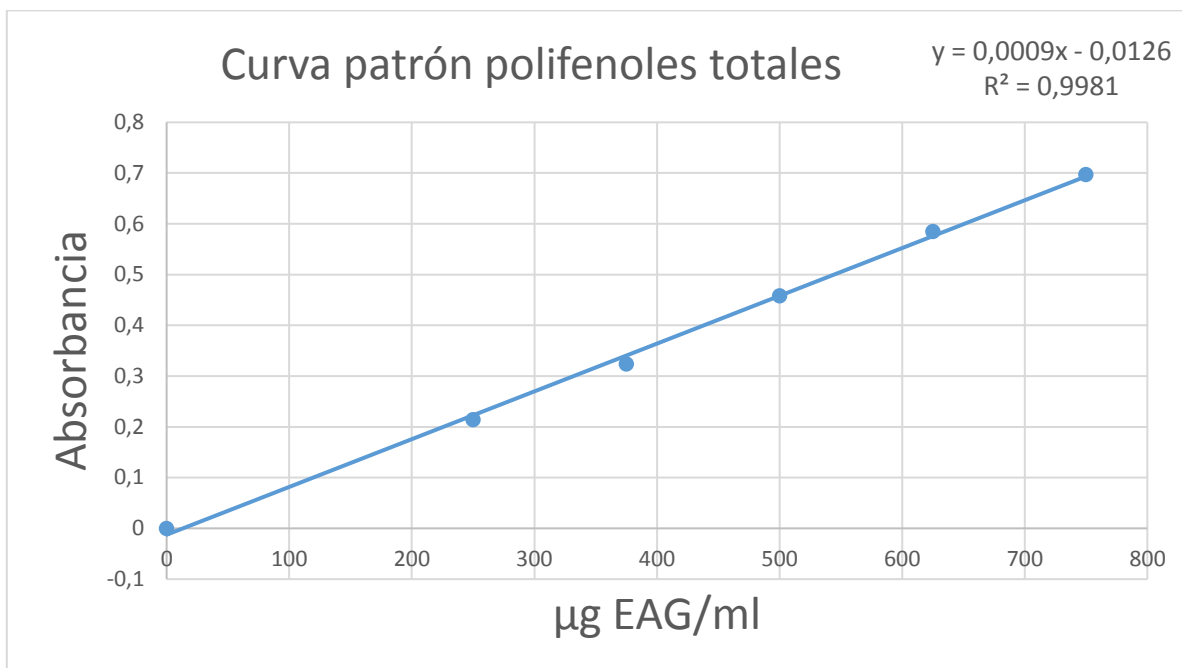
Wootton-Beard, P. Moran, A., Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International* 44 217–224.

Woodroof, J., & Luh, B. (1986). *Commercial Fruit Processing*. Van Nostrand Reinhold/AVI, New York .

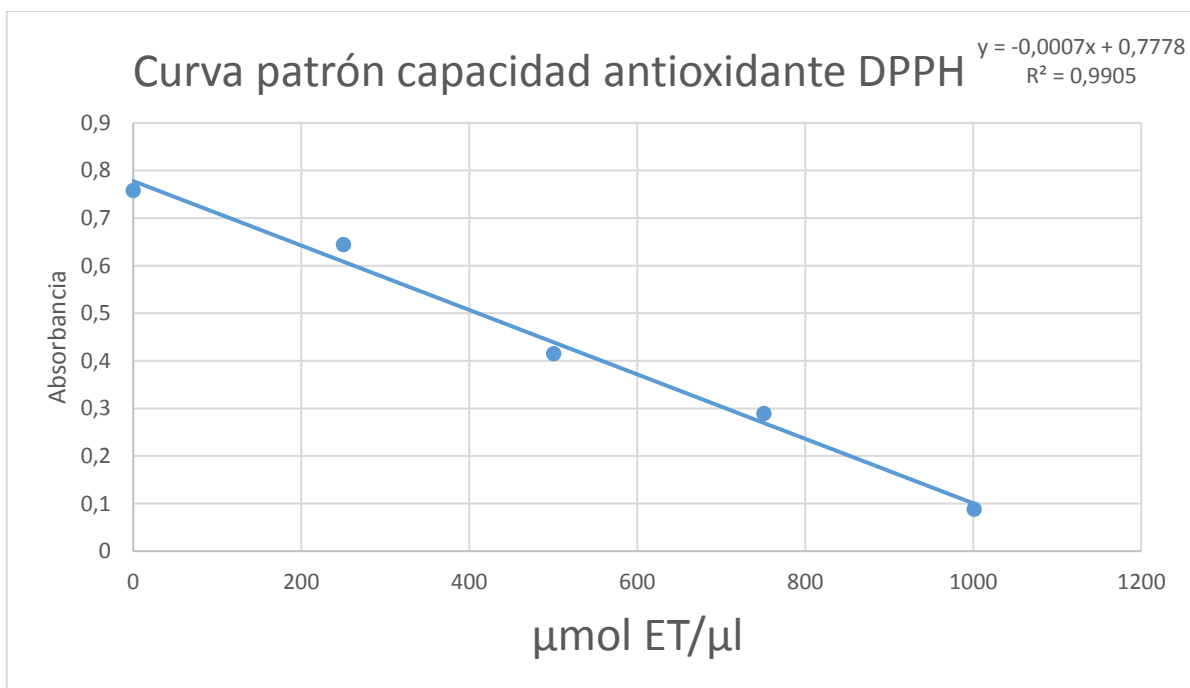
Yu, B. (1994). Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Phys Reviews.*, 74; 1.

ANEXOS

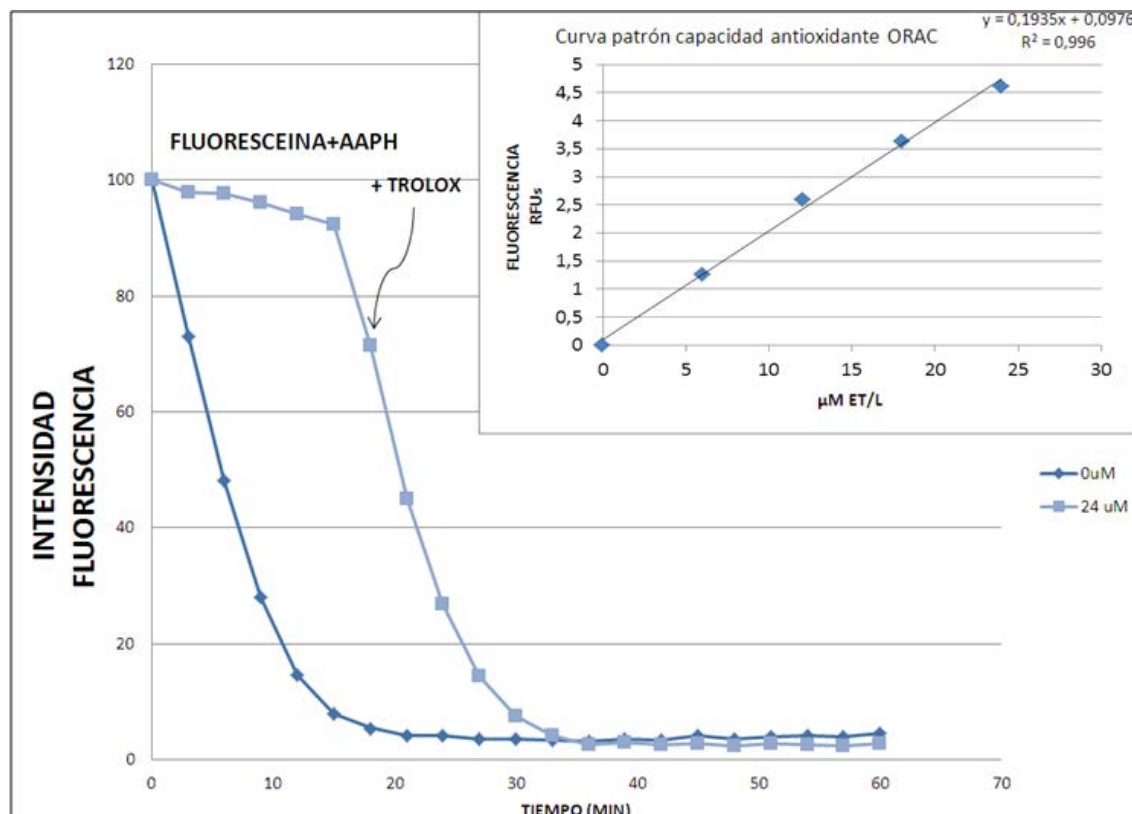
Anexo 1. Curva patrón polifenoles totales



Anexo 2. Curva patrón capacidad antioxidante DPPH



Anexo 3. Representación gráfica de la pérdida de fluorescencia en presencia del radical AAPH y curva patrón capacidad antioxidante ORAC.



Anexo 4. Cuadro del contenido total de polifenoles, antocianinas y capacidad antioxidante (determinados con método DDPH y ORAC) en murta fresca y con tres tratamientos de secado.

CUADRO 2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (DETERMINADOS CON MÉTODO DDPH Y ORAC) EN MURTA FRESCA Y CON TRES TRATAMIENTOS DE SECADO.

	DPPH ^{3*}	ORAC ^{3*}
Murta Fresca	14923,9 ± 657,91 a	17210,9 ± 1562,03 a
Liofilizada	12595,3 ± 711,882 b	16947,3 ± 580,713 a
Secado Vacío	8423,74 ± 149,53 c	8935,96 ± 1061,18 b
Secado Convectivo	2766,66 ± 151,22 d	6780,53 ± 133,37 b

^{3*} Resultados expresados en μmol Equivalente de Trolox (ET) /100 g masa seca. Valores media ± desviación estándar (n=3). Las medias con letras diferentes dentro de cada fila indica que existen diferencias estadísticamente significativas (P < 0,01).

Anexo 5. Cuadro del contenido total de polifenoles, antocianinas y capacidad antioxidante (determinados con método DDPH y ORAC) en murta fresca y con tres tratamientos de secado durante la etapa de la digestión in-vitro y porcentajes de bioaccesibilidad.

CUADRO 3. CAMBIOS EN LOS CONTENIDOS TOTALES DE POLIFENOLES, ANTOCIANINAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EXTRAIDOS DURANTE LA SIMULACIÓN GASTROINTESTINAL IN VITRO, CON MÉTODO QUÍMICO Y PORCENTAJE DE BIOACCESIBILIDAD.

	Murta Fresca	Murta Liofilizada	Murta Secada al Vacío	Murta Secado Convectivo
Polifenoles Totales (mg/100 g)^{1*}				
Extracto químico	2451,53 ± 90,45 (100%)	1627,91 ± 2,00 (100%)	1059,88 ± 18,80 (100%)	631,9 ± 24,3 (100%)
Masticación	744,88 ± 66,61 (30%)	979,68 ± 77,23 (60%)	328,36 ± 13,5 (31%)	274,23 ± 15,6 (43%)
Fase gástrica	1896,12 ± 167,42 (77%)	1555,61 ± 139,5 (48%)	415,6 ± 30,3 (39%)	364,9 ± 24 (58%)
Duodéno	1715,26 ± 218,14 (70%)	1436,81 ± 69,5 (52%)	451 ± 24 (42%)	466,7 ± 25,88 (74%)
Yeyuno	2210,59 ± 274,13 (90%)	1418,19 ± 91 (61%)	213,2 ± 19,7 (20%)	500,95 ± 35,15 (80%)
Íleon	1941,61 ± 215,75 (79%)	1015,03 ± 67,5 (66%)	157 ± 9,37 (15%)	490,88 ± 25,5 (77%)
Antocianinas Totales (mg/100 g)^{2*}				
Extracto químico	127,99 ± 2,02 (100%)	50,44 ± 0,55 (100%)	25,74 ± 0,31 (100%)	4,04 ± 0,14 (100%)
Masticación	11,62 ± 1,37 (11,62%)	15,45 ± 1,3 (31%)	14, ± 1,3 (54,%)	1,06 ± 0,07 (26%)
Fase gástrica	65,83 ± 8,47 (65,83%)	23,47 ± 2,29 (46,5%)	16,2 ± 1,5 (63%)	1,38 ± 0,06 (34%)
Duodéno	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado
Yeyuno	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado
Íleon	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado
DDPH (μmol/100 g)^{3*}				
Extracto químico	14923,9 ± 657,91 (100%)	12595,3 ± 711,882 (100%)	8423,74 ± 149,53 (100%)	2766,66 ± 151,22 (100%)
Masticación	5374,03 ± 539,12 (33%)	5452,86 ± 181,2 (43%)	3701 ± 321,1 (44%)	1800,39 ± 137,5 (65%)
Fase gástrica	8497,35 ± 414,03 (55%)	6560,28 ± 209,7 (52%)	4310 ± 238,2 (51%)	2169,76 ± 134,2 (78%)
Duodéno	9649,33 ± 539,3 (62%)	9112,1 ± 471,4 (72%)	5590,67 ± 402,5 (66%)	2521,42 ± 154,7 (91%)
Yeyuno	9387,73 ± 843,9 (63%)	9664 ± 547 (77%)	6477 ± 293,4 (77%)	2393,5 ± 130,2 (87%)
Íleon	10097,9 ± 1452,2 (79%)	10076,6 ± 220 (80%)	6000,3 ± 288 (71%)	2382,2 ± 157,5 (86%)
ORAC (μmol/100 g)^{3*}				
Extracto químico	17210,9 ± 1562,03 (100%)	16947,3 ± 580,71 (100%)	8935,96 ± 1061,18 (100%)	6780,53 ± 133,37 (100%)
Masticación	4520,4 ± 514,5 (27%)	5437,5 ± 432 (32%)	5588 ± 684 (63%)	1719,5 ± 202,5 (25%)
Fase gástrica	11478 ± 1594 (68%)	8154,5 ± 702 (48%)	8092,3 ± 797 (91%)	2144,4 ± 317,5 (32%)
Duodéno	11274,6 ± 1138,7 (67%)	8878 ± 766 (52%)	9782,9 ± 1267,6 (109%)	2198,3 ± 310,5 (32%)
Yeyuno	13236,3 ± 1810 (78%)	10393,3 ± 702 (61%)	12662,6 ± 1845 (127%)	3538,1 ± 545 (52%)
Íleon	15578,8 ± 1429,6 (92%)	11120,2 ± 776 (66%)	11335 ± 1485,8 (142%)	4157,04 ± 535 (61%)

^{1*} Resultados expresados en mg Equivalente de Acido Gálico (EAG) /100g masa seca. Valores media ± desviación estándar (n=3)

^{2*} Resultados expresados en mg Cianidin-3-glucosido /100 g masa seca. Valores media ± desviación estándar (n=3)

^{3*} Resultados expresados en μmol Equivalente de Trolox (ET) /100 g masa seca. Valores media ± desviación estándar (n=3)

Anexo 6. Imágenes de coloración baya de murta fresca en las cinco etapas de la simulación digestión GI *in-vitro*. Análisis antocianinas totales.

