

Recibido 28 de agosto de 2015 // Aceptado 20 de marzo de 2016 // Publicado online 10 de agosto de 2016

# Cuantificación espectrofotométrica de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en distintos berries nativos del Cono Sur de América

LILLO, A.<sup>1</sup>; CARVAJAL-CAICONTE, F.<sup>1</sup>; NUÑEZ, D.<sup>1,2</sup>; BALBOA, N.<sup>1</sup>; ALVEAR ZAMORA, M.<sup>1</sup>

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo consistió en determinar distintos tipos de fenoles en algunos berries nativos del Cono Sur y el arándano por métodos espectrofotométricos y su relación con la actividad antioxidante. Para esto se realizaron los análisis de fenoles totales, flavonas y flavonoles totales, proantocianidinas totales, antocianinas totales, ácidos fenólicos totales, taninos totales y la actividad antioxidante por los métodos de DPPH<sup>+</sup> y ABTS<sup>•+</sup>, en extractos de *Ugni molinae*, *Aristotelia chilensis*, *Berberis darwinii*, *Luma apiculata* y *Vaccinium corymbosum*. El berry que obtuvo la mayor concentración de fenoles totales, antocianinas totales y proantocianidinas totales fue *A. chilensis*, además, fue el de mayor poder antioxidante. Mientras que *V. corymbosum* fue el de menor concentración de fenoles totales, flavonas y flavonoles totales, y taninos totales, con una actividad antioxidante muy por debajo a los berries nativos del Cono Sur. Los berries analizados presentan variaciones en el contenido de los distintos fenoles estudiados.

**Palabras clave:** flavonoides, actividad antioxidante, taninos.

## ABSTRACT

The objective of this work was to identify different types of phenols in ethanol extracts of some berries native to the Southern Cone of South America and blueberry by spectrophotometric methods and their relationship to antioxidant activity. For this analysis of Total Phenols, Total Flavones and Flavonols, Total Proanthocyanidins, Total Anthocyanins, Total Phenolic Acids, Total Tannins and antioxidant activity by the method of DPPH<sup>+</sup> and ABTS<sup>•+</sup>, in extracts of *Ugni molinae*, *Aristotelia chilensis*, *Berberis darwinii*, *Luma apiculata* and *Vaccinium corymbosum*. The berry that had the highest concentration of Total Phenols, Total Anthocyanins and Total Proanthocyanidins was *A. chilensis*, being also, the highest antioxidant power. While *V. corymbosum* was the lowest concentration of Total Phenols, Total Flavones and Flavonols, and Total Tannins, with antioxidant activity well below berries native to the Southern Cone. The berries have analyzed variations in the content of different phenols studied.

**Keywords:** flavonoids, antioxidant activity, tannins.

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioquímica de Suelo, Universidad de La Frontera, Av. Francisco Salazar 01145. Casilla 54-D. Temuco-Chile.

<sup>2</sup>Laboratorio de Investigación en Biotecnología Animal, Universidad de La Frontera, Temuco- Chile.

Correo electrónico: marysol.alvear@ufrontera.cl

## INTRODUCCIÓN

La búsqueda de antioxidantes naturales obtenidos de frutos nativos, dentro de los cuales se encuentran los berries, es de interés a nivel mundial (Fredes, 2009). Diversos investigadores han atribuido que las propiedades de los fenoles contribuyen a prevenir enfermedades crónicas de alta incidencia, como el cáncer y enfermedades cardiovasculares. Por lo que existe gran interés por parte de la industria alimentaria en incorporarlos como nutraceuticos (Nevue *et al.*, 2010; Rothwell *et al.*, 2013) para la prevención de estas enfermedades. Chile y Argentina poseen una alta variedad de berries de origen nativo y algunos de ellos endémicos, centrándose en especies de las familias Myrtaceae, Berberidaceae y Elaeocarpaceae, distribuyéndose en el sur de estos países andinos. Además, en las últimas décadas el cultivo de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) ha aumentado considerablemente, contando con más de 12.000 hectáreas plantadas (Latorre *et al.*, 2013) en Chile y 3.500 hectáreas en Argentina (Kirschbaum, 2011). Los berries contienen alta concentración de compuestos bioactivos como polifenoles, incluyendo antocianinas, ácidos fenólicos, taninos, carotenoides, vitamina A, C, E, ácido fólico y minerales como el calcio, selenio y zinc (Bunea *et al.*, 2011). Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en los vegetales, estos compuestos cumplen diversas funciones en las plantas, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la alelopatía y la protección ante patógenos y radiación UV (Stalikas, 2007; Khoddami *et al.*, 2013).

La estructura química de los compuestos fenólicos consiste en al menos un anillo aromático con un grupo variable de grupos hidroxilos, que determinan su capacidad antioxidante (Balasundram *et al.*, 2006; Khoddami *et al.*, 2013), ya que estos grupos ceden electrones o átomos de hidrógeno neutralizando los radicales. El grupo más importante de compuestos fenólicos en los berries son los flavonoides, que consisten principalmente en antocianidinas, flavonoles, proantocianidinas (taninos condensados), flavonas y sus glicósidos. Todos ellos comparten el mismo esqueleto básico, el núcleo flavan, que consta de dos anillos aromáticos (anillo A y B) con seis átomos de carbono interconectados por un heterociclo incluyendo tres átomos de carbono (anillo C) (Stalikas, 2007; Wang, 2007). En una especie vegetal única, docenas de diferentes flavonoides pueden estar presente y algunos de estos se conjugan con diversos azúcares (Wang, 2007). Los distintos tipos de flavonoides se diferencian por la variación en el número y la disposición de los grupos hidroxilo, así como de la naturaleza y grado de alquilación y glicosilación de estos grupos (Rice-Evans *et al.*, 1996). También existen en los berries una gran cantidad de fenoles distintos a los flavonoides, como los taninos hidrolizables, ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), ligninas, entre otros (Kähkönen *et al.*, 1999, Ramírez *et al.*, 2015, Ruiz *et al.*, 2015).

Debido a la alta variabilidad de compuestos fenólicos de los berries, es necesaria la evaluación previa del contenido de los distintos metabolitos secundarios, y una de las meto-

dologías más utilizadas es el análisis espectrofotométrico, el cual es rápido, preciso, fácil de usar y de bajo costo, lo que permite disponer de valores cuantitativos en poco tiempo. Con lo anteriormente mencionado, el objetivo de nuestro estudio es caracterizar distintos tipos de compuestos fenólicos de algunos berries nativos del Cono Sur y de arándano por métodos espectrofotométricos y su actividad antioxidante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras vegetales

Las muestras de frutos de maqui (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz.; Elaeocarpaceae), murta (*Ugni Molinae* Turcz.; Myrtaceae), arrayán (*Luma Apiculata* (DC.) Burret.; Myrtaceae), michay (*Berberis darwinii* Hook.; Berberidaceae) y arándano (*Vaccinium corymbosum* L.; Ericaceae) fueron recolectados entre febrero y abril del año 2014 en la provincia de Cautín, Novena Región de La Araucanía, Chile. Posteriormente fueron lavadas con agua destilada y secadas a  $30 \pm 2$  °C por 72 horas, y se trituraron para su posterior maceración.

### Preparación de extractos etanólicos

Se utilizó como solvente etanol al 99.9% (grado analítico, Merck). Los extractos se formularon con una relación de 10 g de materia seca en 100 mL de solvente, se maceró durante 7 días con agitación constante y ausencia de luz. Luego se filtró en papel Whatman N.º 2 y posteriormente el solvente fue eliminado por rotaevaporación utilizando un equipo BÜCHI R-210, hasta sequedad a 40 °C, luego se dejó en desecador con sulfato de cobre para extraer la humedad de las muestras. La formulación de los extractos fue con disoluciones al 5% p/v en etanol al 70% v/v. Finalmente se filtró en papel Whatman N.º 40 y se guardó en frascos ámbar a 4 °C hasta su posterior evaluación. Se obtuvieron 5 extractos por cada especie recolectada.

### Contenido de fenoles totales

El análisis de fenoles totales se realizó por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción según Curifuta *et al.* (2012) con algunas modificaciones. A 50 µL de extracto se le agregaron 2 mL de agua destilada, 250 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (grado analítico, Merck), 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10% p/v y se enrasó a 5 mL con agua destilada. Se midió a una longitud de onda de 765 nm después de 1 hora a temperatura ambiente y en ausencia de la luz. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico (grado analítico, Sigma-Aldrich) entre 0 a 1000 mg/L. El contenido de polifenoles totales se expresó en mg EAG g<sup>-1</sup> de MS (mg equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca).

### Contenido de flavonas y flavonoles totales

Se determinó mediante un análisis espectrofotométrico basado en la formación de un complejo coloreado entre los

iones de Al (III) y los grupos carbonilo e hidroxilo del flavonoide según lo descrito por Cimpoi *et al.* (2011) con algunas modificaciones. A 50  $\mu\text{L}$  de extracto se agregó 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  al 5% p/v en etanol, 100  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 1 M y se enrasó a 5 mL con metanol (grado analítico, Merck). Se midió a una longitud de onda de 425 nm después de 30 minutos en ausencia de luz. Se realizó una curva de calibración con quercetina (grado analítico, Sigma-Aldrich) entre 0 a 1000 mg/L. El contenido de flavonas y flavonoles se expresó en mg EQ  $\text{g}^{-1}$  de MS (mg equivalentes de quercetina por gramo de materia seca).

### Contenido de ácidos fenólicos totales

Se determinó según metodología de Matkowski *et al.* (2008) con algunas modificaciones. El método se basó en la reacción de los ácidos hidroxicinámicos en medio ácido con el reactivo de Arnou, que presenta una coloración amarilla que cambia a naranja en medio alcalino. A 50  $\mu\text{L}$  de muestra, se agregó 1 mL de HCl 0,5 M, 1 mL de reactivo de Arnou (10 g de  $\text{NaNO}_2$  y 10 g de  $\text{Na}_2\text{Mo}_4$  en 100 mL de agua destilada), 1 mL de NaOH 1M y se enrasó a 5 mL con agua destilada. Se midió a una longitud de onda de 520 nm después de 30 minutos en ausencia de luz. Se realizó una curva de calibración con ácido cafeico (grado analítico, Sigma-Aldrich) de 0 a 1000 mg/L. El contenido de ácidos fenólicos se expresó en mg EAC  $\text{g}^{-1}$  de MS (mg equivalentes de ácido cafeico por gramo de materia seca).

### Contenido de proantocianidinas totales

El análisis estima el grado de polimerización de una proantocianidina en medio ácido. Se determinó por el método descrito por Price *et al.* (1978) con algunas modificaciones. Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  del extracto, se agregaron 180  $\mu\text{L}$  de metanol y se agitó, luego se agregó 1,2 mL de vainillina (grado analítico, Merck) al 4% p/v en metanol, (grado analítico, Merck). Finalmente se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de HCl concentrado y protegido de la luz por 30 minutos, se midió a una longitud de onda de 500 nm. Se realizó una curva de calibración con (+)-catequina de 0 a 2000 mg/L. El contenido se expresó en mg ECT  $\text{g}^{-1}$  de MS (mg equivalentes de catequina por gramo de materia seca).

### Contenido antocianinas totales

Se determinó por medio de diferencias de pH (Martínez-Cruz *et al.*, 2011) con algunas modificaciones. Este es un método espectrofotométrico que se basa en la transformación estructural de las antocianinas que ocurre por el cambio de pH (pH 1 coloreadas y pH 4,5 incoloras). Se preparó una solución pH 1 de KCl 0,1 M y una solución tampón pH 4,5 de acetato de sodio-ácido acético 0,1 M. Se prepararon cuatro muestras de 100  $\mu\text{L}$  de extracto y se adicionó a dos de ellas 900  $\mu\text{L}$  de buffer pH 1 y a las dos restantes se adicionó 900  $\mu\text{L}$  de buffer pH 4,5. Se midió la absorbancia a dos longitudes de onda a 520 nm y 700 nm. La concentración se calculó utilizando la siguiente fórmula:

#### Ecuación 1

$$\text{antocianinas totales} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A \times \text{PM} \times 1000}{\epsilon \times l} \times \text{FD}$$

Donde A = (Abs 520 nm – Abs 700 nm) pH 1 – (Abs 520 nm – Abs 700 nm) pH 4,5; PM = Peso molecular de cianidina-3-glucósido: 449,2 g/mol; FD = factor de dilución; l = longitud de paso de celda en cm;  $\epsilon$  = 26900 L  $\text{cm}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$ , coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido; 1000 = factor de conversión de g a mg.

La concentración de antocianinas en el extracto se expresa en mg EC3G  $\text{g}^{-1}$  de MS (mg equivalentes de cianidina-3-glucósido por gramo de materia seca).

### Taninos totales (hidrolizables y condensados)

Se determinó por medio de la precipitación de taninos con fracción V de seroalbúmina de bovino SAB (Calbio-Chem) según el método descrito por Ricco *et al.* (2011). La cuantificación consistió en la diferencia entre los polifenoles totales de la muestra y los polifenoles totales del sobrenadante luego de ser precipitado. A 1 mL de extracto se le añadió 1 mL de solución de seroalbúmina de bovino (tampón acetato de sodio-ácido acético 0,2 M a pH 5,0; NaCl 0,17 M; 1 mg/mL de fracción V de SAB). Luego se agitó y esperó 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 $\times$ g por 10 min. Finalmente se extrajo 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se realizó el ensayo para polifenoles totales. Los resultados de la diferencia son expresados en mg EAG  $\text{g}^{-1}$  de MS.

### Actividad antioxidante DPPH

Se determinó por medio del método del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, grado analítico, Merck) propuesto por Brand-Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones. A 0,1 mL del extracto (cada extracto a una concentración de 10 mg/mL) se añadió 3,9 ml de solución metanólica de DPPH<sup>+</sup> ( $1 \times 10^{-5}$  mg/L), se preparó un blanco con metanol en vez de muestra, finalmente la mezcla se agitó y se dejó en oscuridad durante 30 min. La absorbancia de la mezcla se midió a una longitud de onda de 515 nm. El resultado se expresó como porcentaje de inhibición de DPPH<sup>+</sup> con la siguiente fórmula:

#### Ecuación 2

$$\% \text{ inhibición} = \left[ 1 - \frac{AB}{AE} \right] \times 100$$

Donde AB es la absorbancia de la muestra y AE es la absorbancia del blanco.

Para la determinación de  $\text{IC}_{50}$  del radical DPPH<sup>+</sup>, se utilizó una curva de 2-20 mg/mL de muestra, determinando el  $\text{IC}_{50}$  a partir del gráfico de porcentaje de inhibición versus la concentración de la muestra, definido como la cantidad de la muestra (mg/mL de muestra) necesaria para obtener un 50% de inhibición del radical DPPH<sup>+</sup>. Los análisis de  $\text{IC}_{50}$  del radical DPPH<sup>+</sup> se realizaron por triplicado.

### Actividad antioxidante ABTS

Se determinó por medio del método del radical libre propuesto por Ozgen *et al.* (2006). Se utilizó reactivo ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), grado analítico Merck), mezclando persulfato de potasio 2,45 mM y ABTS 7 mM en agua, se dejó reposar durante 16 horas. El radical ABTS<sup>•+</sup> se ajusta con tampón acetato de sodio-ácido acético (20 mM a pH 4,5) hasta obtener una absorbancia de 0,700 ± 0,01 a una longitud de onda de 734 nm. Finalmente se agregó 0,1 mL de extracto (cada extracto a una concentración de 25 mg/mL) y se añadieron 3 mL de ABTS<sup>•+</sup> además de un blanco sin muestra, se dejó en oscuridad por 30 min y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm. El resultado se expresó como porcentaje de inhibición de ABTS<sup>•+</sup> utilizando la ecuación 2.

Para el IC<sub>50</sub> de ABTS<sup>•+</sup> se utilizó una curva de 10-50 mg/mL de muestra, se determinó el IC<sub>50</sub> a partir del gráfico de porcentaje de inhibición versus la concentración de la muestra, definido como la cantidad de la muestra (mg/mL de muestra) necesaria para obtener un 50% de inhibición del radical ABTS<sup>•+</sup>. Los análisis de IC<sub>50</sub> de ABTS<sup>•+</sup> se realizaron en triplicado.

### Estandarización de datos

Los datos de los distintos tipos de polifenoles se estandarizaron por la siguiente fórmula:

Ecuación 3

$$mg/g = \frac{eq \left( \frac{mg}{L} \right) \times L}{g} \times FD$$

Donde eq (mg/L) = concentración por equivalente de la curva; L = volumen del extracto final en litro; g = masa soluto del extracto final en gramos y FD = factor de dilución.

### Análisis estadístico

Para determinar si existen diferencias significativas entre las muestras en cada uno de los análisis, se realizó un

ANDEVA de un factor y posteriormente un test de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significancia del 95% para determinar diferencias de las medias entre los distintos berries analizados en cada uno de los polifenoles analizados y la actividad antioxidante, usando 25 repeticiones para cada análisis. Para determinar la relación entre cada una de las variables analizadas se determinó el coeficiente de correlación de Pearson. Se realizó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis, con un nivel de significancia del 95% para observar diferencias en IC<sub>50</sub> de DPPH<sup>•+</sup> y ABTS<sup>•+</sup> entre los distintos berries. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statgraphic Plus 5.1.

### RESULTADOS

Los distintos análisis de polifenoles evaluados en cada uno de los berries (tabla 1) muestran un importante contenido de metabolitos secundarios en las especies nativas. *Aristolelia chilensis* es el berry analizado con mayor contenido de polifenoles totales, seguido y, con valores similares *L. apiculata* y *U. molinae*; en el caso de la especie introducida, *V. corymbosum* presenta el contenido más bajo de todos. Para los flavonoides del tipo flavonas y flavonoles totales, *A. chilensis* es el mayor estadísticamente (P<0,05) seguido de *U. molinae*. El contenido de antocianinas totales es uno de los análisis más comunes para este tipo de extracto en berries, y donde claramente *A. chilensis* obtuvo el mayor contenido, diferenciándose significativamente de los otros berries analizados. Situación similar a lo anterior se manifiesta en proantocianidinas totales, destacando también *B. darwinii* para este tipo de flavonoides. Los ácidos fenólicos totales fueron mayores en *B. darwinii* mostrando diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) respecto a todos los demás berries evaluados; misma situación para taninos totales seguido por *U. molinae*.

Por una parte, el poder antioxidante de los berries evaluados (tabla 2) indican que el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH<sup>•+</sup> corresponde a *A. chilensis*, siendo significativamente mayor estadísticamente (P<0,05). Por otra parte, *V. corymbosum* presentó el menor poder antioxidante. En tanto para el IC<sub>50</sub> en DPPH<sup>•+</sup>, *A. chilensis* necesita una concentración aproximada de 3,70 mg/mL, donde *U. molinae*, *B.*

	Polifenoles Totales <sup>A</sup>	Flavonas y Flavonoles <sup>B</sup>	Antocianinas Totales <sup>C</sup>	Proantocianidinas Totales <sup>D</sup>	Ácidos Fenólicos <sup>E</sup>	Taninos Totales <sup>A</sup>
<i>U. molinae</i>	28,8 ± 0,82b	6,15 ± 0,20b	0,076 ± 0,014e	6,25 ± 0,38e	7,13 ± 0,19b	9,34 ± 0,49b
<i>A. chilensis</i>	41,7 ± 1,06a	7,64 ± 0,33a	3,41 ± 0,022a	21,46 ± 1,08a	5,99 ± 0,17c	1,34 ± 0,25d
<i>B. darwinii</i>	22,6 ± 0,70c	3,13 ± 0,19c	0,043 ± 0,055d	17,08 ± 0,83b	15,87 ± 0,30a	10,57 ± 0,61a
<i>L. apiculata</i>	29,3 ± 1,06b	3,31 ± 0,30c	0,18 ± 0,011c	9,46 ± 0,52c	7,10 ± 0,18b	1,92 ± 0,52c
<i>V. corymbosum</i>	13,9 ± 0,55d	1,82 ± 0,25d	0,20 ± 0,010b	7,00 ± 0,40d	7,25 ± 0,17b	0,59 ± 0,18e

Tabla 1. Resultados de los distintos fenoles en los frutos de berries evaluados

<sup>A</sup>mg EAG g<sup>-1</sup> de MS; <sup>B</sup>mg EQ g<sup>-1</sup> de MS; <sup>C</sup>mg EC3G g<sup>-1</sup> de MS; <sup>D</sup>mg ECT g<sup>-1</sup> de MS; <sup>E</sup>mg EAC g<sup>-1</sup> de MS.

Los valores representan las medias y su desviación estándar. Distintas letras indican diferencia estadística (P<0,05).

*darwinii* y *L. apiculata* necesitan aproximadamente el doble de concentración y *V. corymbosum* el cuádruple en comparación a *A. chilensis*. En tanto para el ABTS<sup>+</sup>, el porcentaje de inhibición por parte de *A. chilensis* es muy alto, mostrando una alta sensibilidad con este método, siendo estadísticamente mayor a los demás berries evaluados; mientras *V. corymbosum* mostró un efecto inhibitorio muy por debajo en comparación con los berries nativos de Chile y Argentina.

Los coeficientes de correlación de Pearson (tabla 3) muestran en general altas relaciones positivas entre los parámetros analizados. Los polifenoles totales presentan una relación positiva con casi todos los tipos de polifenoles evaluados y está fuertemente relacionada con DPPH<sup>+</sup> y ABTS<sup>+</sup>. Los ácidos fenólicos, por su parte, presentaron una relación negativa con polifenoles totales y con algunos flavonoides. Los taninos totales y ácidos fenólicos no tuvieron relación con ambos tipos de actividad antioxidante.

## DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos, *A. chilensis* muestra una amplia diferencia en el contenido de distintos tipos de polifenoles, en especial en antocianinas totales (antocianidi-

nas unidas a una molécula de azúcar) y proantocianidinas totales, que son los flavonoides más importante en este tipo de frutos y que le dan la pigmentación a los berries entre rojo y azul y otras características organolépticas (Giusti y Jing, 2007; Lorrain *et al.*, 2013). Es así como Schreckinger *et al.* (2010) encontraron una alta cantidad de proantocianidinas en *A. chilensis*, estando la mayoría de estos en forma de dímeros (56%) y trímeros (14%), y Céspedes *et al.* (2010) encontraron catequinas y epicatequinas en extractos de este berry. Además, *A. chilensis* es la que obtuvo el mayor poder antioxidante observado por su acción de inhibir los radicales de DPPH<sup>+</sup> y ABTS<sup>+</sup>, actividad otorgada principalmente por el contenido de antocianinas totales al estar altamente correlacionada con ABTS<sup>+</sup> ( $r = 0,84$ ;  $P < 0,001$ ), necesitando una muy baja concentración de extracto para obtener el IC<sub>50</sub>. También su contenido de flavonas y flavonoles es alto para este berry, donde Fuentes *et al.* (2015) encontraron rutina y quercetina.

Los frutos de *U. molinae* presentan una alta concentración de flavonas y flavonoles totales, con menores contenido de antocianinas totales y proantocianidinas totales, dada la naturaleza de este berry al ser en su interior (endocarpio y mesocarpio) de un color blanquecino. Los flavonoles más comunes encontrados en berries son la quercetina y la miricetina (Rice-Evans *et al.*, 1996), y que están en alta

	DPPH <sup>+</sup>	DPPH <sup>+</sup> IC <sub>50</sub>	ABTS <sup>+</sup>	ABTS <sup>+</sup> IC <sub>50</sub>
	(%)	(mg mL <sup>-1</sup> )	(%)	(mg mL <sup>-1</sup> )
<i>U. molinae</i>	52,8 ± 0,77b	6,97 ± 0,09b	49,6 ± 1,27b	21,2 ± 0,23b
<i>A. chilensis</i>	77,7 ± 0,78a	3,70 ± 0,08a	97,6 ± 0,94a	12,2 ± 0,11a
<i>B. darwinii</i>	52,2 ± 0,78c	7,10 ± 0,09b	37,4 ± 1,56d	26,4 ± 0,23d
<i>L. apiculata</i>	49,3 ± 0,70d	8,08 ± 0,11c	44,1 ± 0,86c	24,0 ± 0,22c
<i>V. corymbosum</i>	26,4 ± 0,94e	15,40 ± 0,12d	4,6 ± 0,55e	42,0 ± 0,26e

Tabla 2. Poder antioxidante en frutos de berries

Los valores representan las medias y su desviación estándar. Distintas letras indican diferencia estadística ( $P < 0,05$ ).

	Polifenoles	Flavonas	Antocianinas	Proantocianidinas	Ácidos	Taninos	DPPH
	Totales	Flavonoles			Fenólicos	Totales	
Flavonas y Flavonoles	0,88***						
Antocianinas	0,78***	0,73***					
Proantocianidinas	0,60***	0,45***	0,74***				
Ácidos Fenólicos	-0,35***	-0,38***	-0,40***	0,25***			
Taninos Totales	ns	ns	-0,44***	ns	0,69***		
DPPH	0,95***	0,87***	0,78***	0,76***	ns	ns	
ABTS	0,97***	0,91***	0,84***	0,70***	-0,26**	ns	0,98***

Tabla 3. Correlación de Pearson entre los distintos fenoles analizados y su actividad antioxidante

\*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; ns: no significativo.

concentración en *U. molinae* (Junqueira-Gonçalves *et al.*, 2015; Ramírez *et al.*, 2015); también presenta una alta concentración de ácidos fenólicos y taninos totales. Los dos frutos anteriores son altamente consumidos en el sur de Chile, en los últimos años también se han incorporado especies del género *Berberis*; en nuestro estudio *B. darwinii* mostró niveles muy altos de proantocianidinas totales, aunque no así de antocianinas totales, que fueron muy bajos para este berry; centrándose su contenido de fenoles en taninos totales y particularmente en ácidos fenólicos, que es la especie de mayor contenido en este tipo de fenoles analizados. Otro berry endémico de Chile y Argentina estudiado recientemente es *L. apiculata*, con importantes contenidos de fenoles totales y ácidos fenólicos. Ramírez *et al.*, (2015) encontró nueve tipos de antocianinas en *L. apiculata*, flavonoides que dan el color característico de este fruto. Para el caso de *V. corymbosum* el nivel de fenoles totales fue estadísticamente menor ( $P < 0,05$ ) en comparación con los berries chilenos, destacando solo en su contenido de antocianinas totales, pero aún muy inferior a *A. chilensis*; y, además, posee una baja actividad antioxidante tanto en DPPH<sup>+</sup> y ABTS<sup>+</sup>, necesitando altas concentraciones para la obtención de IC<sub>50</sub>.

La medición de fenoles totales es la metodología más usada para una cuantificación rápida para distintos tipos de extractos de origen vegetal, mostrando una alta afinidad con otras mediciones de flavonoides, en especial con flavonas y flavonoles totales ( $r=0,88$ ;  $P < 0,001$ ) y antocianinas totales ( $r=0,78$ ;  $P < 0,001$ ); y está en relación directa con la actividad antioxidante en los extractos de berries. En el caso de las proantocianidinas, estas son moléculas de alto peso molecular compuestas por subunidades de flavan-3-ol (catequina, epicatequina, epigallocatequina) (Isaza, 2007), y están presentes en muchos vegetales, como en berries, en manzanas y en corteza de pinos (Khoddamiet *et al.*, 2013). El método colorimétrico utilizado para las proantocianidinas con vainillina en medio ácido puede proporcionar información sobre el grado de polimerización y el patrón de hidroxilación y estereoquímica de las subunidades flavan-3-ol, no obstante, en esta reacción puede haber una sobreestimación de proantocianidinas totales (Khoddamiet *et al.*, 2013), condición que se puede observar con *B. darwinii*, teniendo concentraciones muy elevadas abarcando casi la totalidad de sus fenoles totales. El contenido de antocianinas totales se correlacionan con las proantocianidinas totales en los berries analizados ( $r=0,74$ ;  $P < 0,001$ ), encontrándose estos flavonoides en muchos berries (Schreckinger *et al.*, 2010).

La reacción colorimétrica para flavonas y flavonoles totales pudiese estar sobreestimando su valor en el caso de *A. chilensis* debido a la reacción con AlCl<sub>3</sub>, reacción de color amarillo, pero que en esta especie fue de tonalidad azulada, posiblemente debido al alto contenido de antocianinas que interfieren en la lectura de la reacción. Algunos autores (Bunea *et al.*, 2011; Zapata *et al.*, 2013) añaden en esta reacción NaNO<sub>2</sub> y NaOH obteniendo una reacción colorimétrica rojo-naranja (510 nm) para estabilizar el color de los pigmentos; sin embargo, Pękal y Pyrzynska (2014) no recomiendan este procedimiento por sobreestimar los

valores de flavonas y flavonoles debido a que el NaNO<sub>2</sub> y NaOH reaccionan con los ácidos fenólicos y otros tipos de flavonoides presentes en los vegetales.

Los ácidos fenólicos también están presentes en los berries, entre los más comunes están ácido cafeico y ácido clorogénico, que han sido reportados en *U. molinae* (Junqueira-Gonçalves *et al.*, 2015; Ramírez *et al.*, 2015), los que poseen un alto poder antioxidante. Los ácidos fenólicos totales se encuentran relacionados con los taninos totales (taninos hidrolizables), dado que el ácido elágico es un dímero del ácido gálico. Aunque la metodología de taninos totales considera la precipitación de taninos condensados como de taninos hidrolizables, posiblemente la precipitación de taninos por la fracción V de la seroalbúmina de bovino esté más relacionado a la precipitación de taninos hidrolizables (unidades de ácido gálico o elágico unidos a carbohidratos), al no existir una correlación positiva entre el contenido de proantocianidinas totales y taninos totales en nuestro estudio.

## CONCLUSIONES

La cuantificación espectrofotométrica de los distintos compuestos fenólicos evaluados demuestra la variedad que puede presentar cada tipo de berry en la concentración de estos compuestos, entregando una caracterización química temprana que permite comparaciones cuantitativas, en forma rápida y a bajo costo, de distintos berries.

*Aristotelia chilensis* es quien presenta las mayores concentraciones de fenoles totales, antocianinas totales y proantocianidinas totales, y el que presenta mayor poder antioxidante, siendo varias veces mayor a *Vaccinium corymbosum*.

Todos los berries nativos del Cono Sur de América estudiados presentan altos contenidos de los compuestos fenólicos y alta capacidad antioxidante comparados con *Vaccinium corymbosum* L., indicando la importancia y potencial que posee la flora nativa en el sector silvo-agrario.

El análisis de flavonas y flavonoles totales con AlCl<sub>3</sub> no es recomendable para *Aristotelia Chilensis* debido a su alto contenido de pigmentos que interfieren en la reacción.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la ayuda financiera otorgada a través del Proyecto FAPERJ/UFRO 2015 FPJ 15-0010 Chile-Brasil y Becas Doctorales CONICYT folios N.° 21140816 y N.° 21120557.

## BIBLIOGRAFÍA

- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 99, 191–203.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol Int* 28(1), 25–30.

- BUNEA, A.; RUGINĂ, D.A.; PINTEA, A.M.; SCONȚA, Z.; BUNEA, C.I.; 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.
- CÉSPEDES, C.; VALDEZ-MORALES, M.; AVILA, J.G.; EL-HAFIDI, M.; ALARCÓN, J.; PAREDES-LÓPEZ, O. 2010. Phytochemical profile and the antioxidant activity of Chilean wild black-berry fruits, *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz (Elaeocarpaceae). *Food Chem.* 119, 886–895.
- CIMPOIU, C.; CRISTEA, M.; HOSU, A.; SANDRU, M.; SESERMAN, L. 2011. Antioxidant activity prediction and classification of some teas using neutral networks. *Food Chem.* 127, 1333–1328.
- CURIFUTA, M.; VIDAL, J.; SÁNCHEZ-VENEGAS, J.; CONTRERAS, A.; SALAZAR, L.; ALVEAR, M. 2012. The *in vitro* antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance. *Cien. Inv. Agr.* 39(2), 347–359.
- FREDES, C. 2009. Antioxidantes en berries nativos chilenos. *Bol. Latinoam. Caribe Plant Med. Aromat.* 8(6), 469–478.
- FUENTES, O.; CÉSPEDES, C.; SEPÚLVEDA, R. 2015. *Aristotelia chilensis*, rutin and quercetin ameliorates acute vascular endothelial dysfunction in rat thoracic aorta exposed to oxidative stress. *Bol. Latinoam. Caribe Plant Med. Aromat.* 14(1), 11–20.
- GIUSTI, M.; JING, P. 2007. Natural pigments of berries: functionality and application, p. 105–146. En ZHAO, Y.: *Berry fruit: value-added products for health promotion*. Ed. Taylor & Francis Group, Nueva York, EE. UU., p. 444.
- ISAZA, J.H. 2007. Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica* 13(33), 13–18.
- JUNQUEIRA-GONÇALVES, M.P.; YÁÑEZ, L.; MORALES, C.; NAVARRO, M.; CONTRERAS, R.A.; ZÚNIGA, G.E. 2015. Isolation and characterization of phenolic compounds and anthocyanins from Murta (*Ugni molinae* Turcz.) fruits. Assessment of antioxidant and antibacterial activity. *Molecules* 20, 5698–5713.
- KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954–3962.
- KHODDAMI, A.; WILKES, M.; ROBERTS, T.H. 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18, 2328–2375.
- KIRSCHBAUM, D. 2011. Cadena arándano en Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina. Disponible: <http://inta.gov.ar/documentos/cadena-arandano-en-argentina>, verificado 17 de julio de 2015).
- LATORRE, B.A.; TORRES, R.; SILVA, T.; EL FAR, K. 2013. Evaluation of the use of wound-protectant fungicides and biological control agents against stem canker (*Neofusicoccum parvum*) of blueberry. *Cien. Inv. Agr.* 40(3), 537–545.
- LORRAIN, B.; KY, I.; PECHAMAT, L.; TEISSEDRE, P.L. 2013. Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules* 18, 1076–1100.
- MARTÍNEZ-CRUZ, N.; ARÉVALO-NIÑO, K.; VERDE-STAR, M.; RIVAS-MORALES, C.; ORANDAY-CÁRDENAS, A.; NÚÑEZ-GONZÁLEZ, M.; MORALES-RUBIO, M. 2011. Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubusa denotrichus* Schltdl (zarzamora). *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 42(4), 66–71.
- MATKOWSKI, A.; TASARZ, P.; SZYPUŁA, E. 2008. Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *J. Med. Plant Res* 2(11), 321–330.
- NEVEU, V.; PEREZ-JIMÉNEZ, J.; VOS, F.; CRESPEY, V.; DU CHAFFAUT, L.; MENNEN, L.; KNOX, C.; EISNER, R.; CRUZ, J.; WISHART, D.; SCALBERT, A. 2010. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford)* 2010, 24.
- OZGEN, M.; REESE, N.; TULIO, A.; SCHEERENS, J.C.; MILLER, A.R. 2006. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1151–1157.
- PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K. 2014. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Anal. Methods* 7, 1776–1782.
- PRICE, M.L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L.G. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 26(5), 1214–1218.
- RAMÍREZ, J.E.; ZAMBRANO, R.; SEPÚLVEDA, B.; KENNELLY, E.J.; SIMIRGIOTIS, M.J. 2015. Anthocyanins and antioxidant capacities of six Chilean berries by HPLC–HR-ESI-ToF-MS. *Food Chem.* 176, 106–114.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20(7), 933–956.
- RICCO, R.; AGUDELO, I.; GARCÉS, M.; EVELSON, P.; WAGNER, M.; GURNI, A. 2011. Polifenoles y actividad antioxidante en *Equisetum giganteum* L. (Equisetaceae). *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* 10(4), 325–332.
- ROTHWELL, J.A.; PEREZ-JIMÉNEZ, J.; NEVEU, V.; MEDINA-REMÓN, A.; M'HIRI, N.; GARCÍA-LOBATO, P.; MANACH, C.; KNOX, C.; EISNER, R.; WISHART, D.S.; SCALBERT, A. 2013. Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database (Oxford)*, 70.
- RUIZ, A.; BUSTAMANTE, L.; VERGARA, C.; VON BAER, D.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; OBANDO, L.; MARDONES, C. 2015. Hydroxycinnamic acids and flavonols in native edible berries of South Patagonia. *Food Chem.* 167, 84–90.
- SCHRECKINGER, M.E.; WANG, J.; YOUSEF, G.; LILA, M.A.; GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. 2010. Antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of adipogenesis and inflammation by phenolic extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8966–8976.
- STALIKAS, S.D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 30, 3268–3295.
- WANG, S.Y. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of berry fruits as affected by genotype, preharvest conditions, maturity, and postharvest handling, pp. 147–186. En ZHAO Y.: *Berry fruit: value-added products for health promotion*. Ed. Taylor & Francis Group, Nueva York, EE. UU., p. 444.
- ZAPATA, K.; CORTES, F.B.; ROJANO, B.A. 2013. Polifenoles y actividad antioxidante del fruto de guayaba agria (*Psidium maraca*). *Inf. Tecnol.* 24(5), 103–112.