



Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia

**ESTUDIO DE INHIBIDORES ENZIMATICOS
PRESENTES EN FRUTILLA (*FRAGARIA
ANANASSA*) APLICANDO ANALISIS EFECTO
DIRIGIDO SOBRE CROMATOGRAFIA PLANAR**

**POR: CONSTANZA ALEJANDRA BUSTAMANTE
SEGURA**

**Trabajo de Fin de Carrera presentada a la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Concepción para optar al título de Químico Farmacéutico**

Profesora Patrocinante: Dra. Karem Henríquez Aedo

Departamento de Ciencia y Tecnología de los alimentos
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Marzo, 2021
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del Documento



AGRADECIMIENTOS

A Astrid.

A mi familia por acompañarme, apoyarme y soportarme durante todo el proceso que me han llevado hasta este punto.

A mis amigos Joaquín, Luis, Fernando, Rayen, Yercov, Manuel y Kevin que me escucharon hablar hasta el cansancio.

A mis compañeras de laboratorio, quienes entregaron cada una algo especial al proceso de elaboración de esta tesis con su apoyo incondicional.

Finalmente a mis profesores guías por la confianza y todos los conocimientos que me entregaron a lo largo de este camino.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de contenidos.....	IV
Índice de tablas.....	VI
Índice de figuras.....	VII
Resumen.....	2
Abstract.....	3
1. Introducción.....	4
1.1. Enfermedades crónicas no transmisibles.....	4
1.2. Alimentos funcionales.....	8
1.3. Frutilla.....	10
1.4. Compuestos fenólicos.....	12
1.5. Obtención de compuestos bioactivos.....	15
1.6. Detección de compuestos bioactivos.....	18
2. Hipótesis.....	22
3. Objetivos.....	22
3.1. General.....	22
3.2. Específicos.....	22
4. Materiales y métodos.....	23
4.1. Reactivos y solventes.....	23
4.2. Recolección de muestra.....	24
4.3. Análisis químico proximal.....	24
4.3.1. Porcentaje de Humedad.....	24
4.3.2. Porcentaje de grasa total.....	25
4.3.3. Porcentaje de proteína.....	25
4.3.4. Porcentaje de ceniza.....	26
4.3.5. Porcentaje de fibra cruda.....	26

4.3.6.	Porcentaje de hidratos de carbono.....	27
4.4.	Preparación del extracto.....	27
4.5.	Diseño de experimentos.....	30
4.6.	Cuantificación de polifenoles totales.....	31
4.7.	Capacidad antioxidante.....	32
4.7.1.	Método ORAC.....	32
4.7.2.	Método DPPH.....	33
4.8.	Análisis funcional.....	34
4.8.1.	Separación cromatográfica.....	34
4.8.2.	Bioensayo acetilcolinesterasa.....	35
4.8.3.	Bioautografía <i>Bacillus subtilis</i>	36
4.8.4.	Capacidad antioxidante.....	37
4.9.	Análisis estadístico.....	37
5.	Resultados y Discusión.....	39
5.1.	Caracterización química de frutilla.....	39
5.2.	Screening de solvente.....	40
5.3.	Screening de tiempo.....	42
5.4.	Optimización de método de extracción.....	43
5.5.	Caracterización del extracto optimizado.....	50
5.6.	Comparación de métodos de extracción Maceración vs Microondas.....	51
5.7.	Detección de compuestos bioactivos.....	53
5.7.1.	Inhibición de Acetilcolinesterasa.....	53
5.7.2.	Bioautografía <i>Bacillus subtilis</i>	55
5.7.3.	Capacidad antioxidante DPPH.....	57
6.	Conclusiones.....	59
7.	Bibliografía.....	61
8.	Anexos.....	66

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Clasificación de compuestos fenólicos a partir de su esqueleto de carbonos	13
Tabla 5-1: Análisis químico proximal de frutilla por 100 g de muestra fresca	39
Tabla 5-2: Factores y rangos definidos para el diseño de experimentos....	44
Tabla 5-3: Condiciones experimentales y sus respectivas respuestas.....	44
Tabla 5-4: Condiciones óptimas de extracción para la maximización de las respuestas.....	50
Tabla 5-5: Tabla comparativa de métodos de extracción, evaluando polifenoles totales, capacidad antioxidante por método ORAC y DPPH.....	52



INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. <i>Fragaria ananassa</i>	10
Figura 1-2. Mecanismos fundamentales de calentamiento por microonda.....	17
Figura 1-3. Patrones de calentamiento convencionales e inducidos por microondas.....	18
Figura 4-1. Esquema de método de extracción convencional, Maceración...	29
Figura 4-2. Esquema de método de extracción asistido por microondas.....	30
Figura 5-1. Contenido de polifenoles totales a distintos porcentajes de etanol.....	41
Figura 5-2. Contenido de polifenoles totales a distintos tiempos de extracción.....	42
Figura 5-3. (A) Gráfico de superficie de respuesta para optimización de polifenoles totales. (B) Grafico de Pareto estandarizado para polifenoles totales.....	46
Figura 5-4. (A) Gráfico de superficie de respuesta para optimización de ORAC. (B) Grafico de Pareto estandarizado para ORAC.....	48
Figura 5-5. (A) Gráfico de superficie de respuesta para optimización de DPPH. (B) Grafico de Pareto estandarizado para DPPH.....	49
Figura 5-6. Cromatograma HPTLC de extracto de frutilla. Bioensayo Acetilcolinesterasa.....	54
Figura 5-7. Cromatograma HPTLC de extracto de frutilla. Bioautografía <i>Bacillus subtilis</i>	56
Figura 5-8. Cromatograma HPTLC de extracto de frutilla. Bioautografía <i>Bacillus subtilis</i>	57
Figura 5-9. Cromatograma HPTLC de extracto de frutilla. Capacidad antioxidante DPPH.....	58

RESUMEN

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como: enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias crónicas, diabetes y cáncer representan un 71% de las muertes en la población entre 30 y 70 años a nivel mundial. La frutilla (*Fragaria ananassa*), ha sido estudiada por poseer propiedades beneficiosas para la salud, especialmente por sus compuestos de carácter fenólico, los cuales se han asociado a la reducción del riesgo de padecer ECNT, caracterizando a la frutilla como alimento funcional. El objetivo del presente trabajo fue identificar compuestos bioactivos presentes en la frutilla, para lo cual se utilizó la plataforma HPTLC-bioensayo. Se optimizó el proceso de extracción asistido por microondas aplicando un diseño central compuesto (DCC). Para ello, se determinaron las condiciones óptimas de extracción (solvente, temperatura y tiempo de extracción), y las cuales fueron 60 % v/v de etanol, 45,5°C y 7 minutos. Los resultados de los bioensayos revelaron que el extracto de frutilla contiene al menos un compuesto inhibidor de acetilcolinesterasa, un compuesto inhibidor del crecimiento de *Bacillus subtilis* y al menos 2 compuestos que aportan a la capacidad antioxidante del extracto. Concluyéndose que la extracción asistida por microondas mejora la eficiencia del proceso de extracción y que la frutilla contiene compuestos bioactivos beneficiosos para la salud.

ABSTRACT

Chronic non-communicable diseases (NCDs) such as diabetes, cancer, and cardiovascular and chronic respiratory diseases represent 71% of worldwide deaths in 30 and 70 years old population. Strawberry (*Fragaria ananassa*) has been studied for having beneficial properties for health due to the presence of phenolic compounds, which have been associated with a reduction in the risk of suffering from NCD. Thus, strawberry has been defined as a functional food. The objective of the present work was to detect bioactive compounds present in strawberry applying HPTLC-bioassay. Microwave-assisted extraction process was optimized applying a face-centered central composite design (CCD) with which the following optimal conditions for solvent composition, temperature and extraction time were established: 60% v / v of ethanol, 45.5 ° C and 7 minutes. Bioassays results the presence of at least one acetylcholinesterase inhibitor compound, one *Bacillus subtilis* growth inhibitor compound and at least 2 antioxidant compounds in strawberry. This it is possible to conclude that microwave-assisted extraction improves the extraction efficiency and strawberry contains compounds with beneficial activity for human health.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades crónicas no transmisibles.

Actualmente el mundo atraviesa por una denominada “transición epidemiológica” debido a que las causas de enfermedad y la mortalidad ya no son las mismas que enfrentaba la población hace 50 años atrás. La industrialización, la urbanización, el desarrollo económico y la globalización han aumentado la esperanza de vida de la población general, esto ha generado el aumento de la incidencia de enfermedades típicas de la vejez como el alzhéimer y el Parkinson. Por otro lado estas aristas también han repercutido negativamente en forma de hábitos alimenticios inapropiados, disminución de la actividad física y aumento en el consumo de tabaco, tres factores que están estrechamente relacionados con enfermedades lenta progresión como lo son las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) las cuales son reconocidas a nivel mundial como una epidemia creciente tanto a países desarrollados como países en vías de desarrollo.(Organización Mundial de la Salud, 2003; Valenzuela B, Valenzuela, Sanhueza, & Morales I, 2014)

Las ECNT son en la actualidad uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, son definidas por la organización mundial de la salud (OMS) como enfermedades de larga duración y de lenta progresión. Entre estas se encuentran enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias crónicas, diabetes

y cáncer. Estas enfermedades se caracterizan por tener altas tasas de mortalidad, siendo causante del 71% de las muertes a nivel mundial el año 2018, de este porcentaje las enfermedades cardiovasculares presentan una mayor prevalencia siendo responsables del 31% (17,6 millones de personas) de muertes, las neoplasias un 16% (9 millones de personas) y la diabetes mellitus tipo II un 3% (1,7 millones de personas), según el último reporte publicado por la OMS. En Chile las ECNT siguen el mismo patrón que muestran a nivel mundial representando aproximadamente el 85% de las muertes al año y predominando con un 27% las enfermedades cardiovasculares (OMS, 2018).

Desde un punto de vista fisiológico la mayoría de estas enfermedades pueden verse afectadas por el desarrollo descontrolado de los radicales libres, los cuales pueden ser definidos como un átomo o molécula con uno o más electrones no apareados en el último orbital, capaz de reaccionar con múltiples biomoléculas a través de su oxidación. Dentro de este concepto, estas moléculas reciben el nombre de especies reactivas del oxígeno (ERO). Si bien estos compuestos son productos de factores externos e internos con los que convivimos a diario, y en pequeñas concentraciones participan en diferentes procesos celulares, un aumento de su producción o una disminución de compuestos antioxidantes en nuestro organismo puede producir un desbalance necesario para desencadenar procesos que dañan las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y que alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc.)

promoviendo el desarrollo de las enfermedades antes mencionadas, este proceso se conoce como Estrés Oxidativo (Elejalde Guerra, 2001; Sánchez-Valle V, 2013). Un ejemplo claro se encuentra en la oxidación del colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad) el cual sería uno de los puntos clave en el desarrollo de la aterosclerosis, uno de los grandes factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. La molécula de LDL oxidada no es reconocida por el receptor de LDL y es absorbida por los macrófagos, formando células espumosas, precursoras de la placa aterosclerótica.

Otra ECNT de gran incidencia en la población es la diabetes mellitus tipo 2, esta enfermedad se caracteriza por una deficiencia relativa de insulina causada por la disfunción de las células β pancreáticas y la resistencia a la insulina en los órganos diana (Chatterjee, Khunti, & Davies, 2017). El avance de la enfermedad genera complicaciones en diversos sistemas del cuerpo humano incluyendo complicaciones micro-vasculares como retinopatías, nefropatías, neuropatías. Esta última puede derivar en úlceras que si no son tratadas correctamente pueden provocar infecciones polibacterianas, las cuales pueden terminar en sepsis y/o la amputación del miembro afectado. Esta complicación sumada al desarrollo de resistencias en patógenos se ha convertido hoy en día en un problema importante. Aproximadamente el 78% de los compuestos con actividad antimicrobiana son derivados de plantas, ya sea producidos semisintéticamente a partir de productos naturales, o sintetizados químicamente sobre la base de la estructura de los productos naturales por lo que encontrar nuevos compuestos

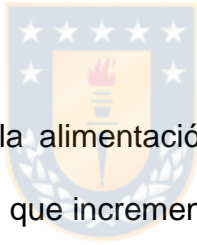
que presenten actividad antibacteriana es de vital importancia para seguir combatiendo estas enfermedades. (Demain, 2009; Jamshidi-Aidji & Morlock, 2015)

Otro grupo de enfermedades de carácter relevante por su incidencia en Chile, son las enfermedades neurodegenerativas, siendo el Alzheimer (EA) la más frecuente, y se estima que afecta a más de 24 millones de personas en el mundo (Reitz, Brayne, & Mayeux, 2011). Si bien su etiopatogenia no está completamente elucidada, se describe la presencia de placas beta-amiloides y ovillos neurofibrilares, los cuales producen una atrofia de las neuronas colinérgicas en distintas regiones cerebrales, lo cual provoca una reducción de la actividad colinérgica que sería de vital importancia en el desarrollo de la EA. Por lo tanto, la búsqueda de moléculas que eviten el déficit de acetilcolina, ha sido uno de los grandes desafíos para retrasar el avance de la enfermedad. Un enfoque para evitar el déficit de acetilcolina es inhibir la enzima acetilcolinesterasa, esta enzima actúa provocando la hidrólisis rápida del neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis colinérgicas. Los inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, como donapezilo y galantamina, este último de origen natural obtenido desde plantas del género *Galanthus*, son entonces una parte importante del tratamiento, debido a que la inhibición de la enzima favorecería la permanencia del neurotransmisor en el espacio sináptico. Debido a que está comprobada la existencia de estos inhibidores en plantas, es que surge el interés del estudio con intención de identificar posibles farmacoforos para el desarrollo de nuevos medicamentos

(Fuentes G & Slachevsky Ch, 2005; Galarce-Bustos, 2019; McGleenon, Dynan, & Passmore, 1999).

Por lo tanto, encontrar moléculas con actividad biológica que permitan retrasar o reducir el desarrollo de enfermedades ha sido un gran desafío. Esta búsqueda se ha centrado principalmente en los alimentos con actividad funcional, los cuales permitan nutrir y otorgar un efecto saludable al consumidor.

1.2. Alimentos funcionales



Entendiendo entonces que la alimentación es uno de los factores de riesgo modificables en las ECNT es que incrementa en la población la conciencia de lo que se consume. Japón fue una de las primeras potencias en desarrollar un sistema que permitiera a su población adquirir alimentos que proporcionaran un beneficio a la salud adicional a la nutrición, desarrollando el concepto de “Alimento Funcional”(Durán C & Valenzuela B, 2010). En occidente *The American Dietetic Association* (ADA) acepta como alimento funcional aquellos alimentos que contengan componentes beneficiosos para la salud más allá de su aporte nutricional, ya sea dentro de la composición natural del mismo como aquellos que han sido modificados o manipulados para incrementar su contribución a una dieta saludable (American Diet Association, 1999).

Estos alimentos son de carácter variado y entre ellos podemos encontrar algunos como el aceite de oliva, la leche y algunos frutos rojos como el arándano, el maqui y la frutilla, esta última es de especial interés para esta investigación. Los cuales tienen en común la presencia de compuestos químicos que si bien no ejercen un rol nutricional, puesto que no son sustancias indispensables para el organismo, su consumo supone una protección adicional contra la acción nociva de sustancias provenientes de la dieta y del entorno ambiental que afectan la salud de la población (Araya L & Lutz R, 2003). Estos compuestos, denominados compuestos bioactivos, son estudiados y reconocidos por sus propiedades beneficiosas en el cuerpo humano y entre ellos se encuentran los compuestos fenólicos, los cuales han demostrado en diferentes estudios sus efectos beneficiosos para la salud, incluyendo entre ellos la disminución del estrés oxidativo. Otros beneficios destacados en diversos estudios son su efecto funcional en algunas patologías como: dislipidemia, hiperglicemia, procesos inflamatorio asociado al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, procesos neurodegenerativos y su potencial como agentes antibacterianos, entre otros (Battino, 2009; Daglia, 2012; Lutz R, 2012; Shukitt-Hale, Lau, & Joseph, 2008).

1.3. Frutilla

La frutilla (Fig. 1-1) pertenece a la familia de la *Rosaceae*, genero *Fragaria*. Es una planta herbácea, perenne que es una de las plantas alimenticias más importantes de todo el mundo, con una producción mundial que duplica a todas las demás bayas combinadas. Su producción alcanzó los 9,22 millones de toneladas (nivel mundial) en 2017, siendo el principal productor China (40,3% de la producción mundial total) (Fierascu, 2020). En Chile, es cultivada principalmente en las regiones Metropolitana y del Maule, siendo su destino mayoritario el consumo interno. Actualmente se comercializa la especie *Fragaria ananassa* la cual tiene un componente de origen chileno debido al entrecruzamiento entre la *Fragaria chiloensis* y la especie europea *Fragaria virginiana*. (Pefaur Lepe, 2014)



Figura 1-1. *Fragaria ananassa* planta de frutilla (A) y el fruto comestible (B)

Históricamente su consumo ha sido reportado alrededor de todo el mundo desde pueblos pre-colombinos como los Picunches y Mapuches en Chile, hasta romanos o la antigua China. En la medicina tradicional de nuestro país, esta planta ha reportado usos principalmente en el tratamiento de diarreas e indigestiones (Fierascu, 2020; Urrieta, 1933).

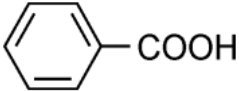
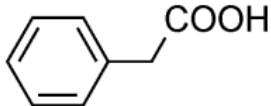
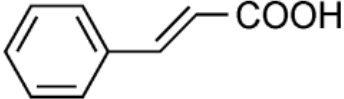
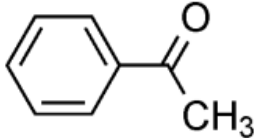
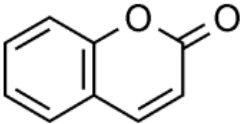
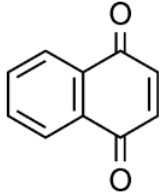
Esta fruta presenta una combinación de macronutrientes, vitaminas y fibras declaradas en *National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release (U.S. Department of Agriculture, 2019) (Anexo N°1)* en la que destaca su contenido de vitamina C, la cual aporta directamente en el potencial antioxidante de esta fruta (Niziol, 2019). Además se han detectado más de 40 compuestos polifenólicos distintos, entre ellos glucósidos de quercetina, kaempferol, cianidina, pelargonidina y ácido elágico, junto con flavonoles, derivados de ácido *p*-cumárico y elagitaninos esto posiciona a la frutilla como un alimento con gran cantidad de polifenoles y gran capacidad antioxidante, por lo tanto, con alta probabilidad de entregar efectos beneficiosos para la salud (Aaby, 2007; Basu, 2014).

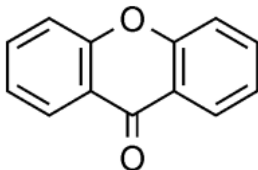
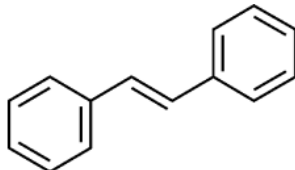
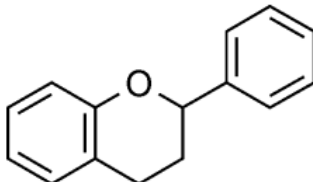
1.4. Compuestos fenólicos

Estos compuestos anteriormente mencionados por su actividad sobre la salud son un amplio y heterogéneo grupo de compuestos presentes principalmente en las plantas y son originados del metabolismo secundario de estas, cumpliendo funciones variadas dentro de la planta. Generalmente, los alimentos contienen una mezcla compleja de compuestos fenólicos, los que a su vez son afectados por numerosos factores medioambientales como la luz, el grado de madurez o el estado de conservación, lo que puede provocar una variación en el contenido total de polifenoles dentro de una misma especie (Quiñones, 2012).

Estos se caracterizan químicamente por presentar un fenol en su estructura y variadas sustituciones de hidroxilo, sin embargo existe una variedad tan amplia de compuestos que esta clasificación química se divide en subgrupos de compuestos polifenólicos, dividiéndolos según el número de carbonos en su esqueleto estructural (Tabla 1-1) (Crozier, 2009).

Tabla 1-1: Clasificación de compuestos fenólicos a partir de su esqueleto de carbonos (Crozier, 2009).

Esqueleto	Clasificación	Estructura Básica
C6-C1	Ácidos fenólicos	
C6-C2	Acetofononas	
C6-C2	Ácidos Fenilacéticos	
C6-C3	Ácidos Hidroxicinámicos	
C6-C3	Cumarinas	
C6-C4	Naftoquinonas	

C6-C1-C6	Xantinas	
C6-C2-C6	Estilbenos	
C6-C3-C6	Flavonoides	

Los flavonoides son el grupo más abundante de compuestos fenólicos en la naturaleza, y se encuentran principalmente en las hojas y en la piel de las frutas. Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo "C" de pirano heterocíclico. Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos y por lo tanto son estructuras polifenólicas. Se encuentran en su mayoría unidos por un enlace covalente a un azúcar, generalmente glucosa, formando un glucósido, estos se pueden encontrar como C-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de enlaces carbono-carbono o como O-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de átomos de

oxígeno, siendo este último el mayoritario (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004).

1.5. Obtención de compuestos bioactivos

Para obtener estos compuestos anteriormente mencionados, el proceso de extracción es crucial, este consta en aplicar selectivamente uno o una mezcla de solventes. Para ello existen distintos tipos de técnicas de extracción como la maceración, percolación, la extracción Soxhlet, extracción con fluidos supercríticos, asistida por ultrasonido, asistida por microondas, entre otras, las cuales deben ser seleccionadas y optimizadas de acuerdo a las características fisicoquímicas de las sustancias que se desean obtener (Kalia, 2008). Optimizar este proceso no solo mejora el posterior estudio, sino que mejora la utilización de recursos al ajustar el uso de solvente y el tiempo que tarda el procedimiento. (De Monte et al., 2014).

Se realizará durante esta investigación la comparación de dos métodos de extracción de compuestos fenólicos, correspondientes a extracción por maceración (método convencional) y extracción asistida por microondas (MAE) (método avanzado de extracción). Se seleccionó el MAE como método avanzado de extracción debido a las ventajas atribuibles a esta técnica, entre las que se encuentran la disminución del tiempo de extracción y el uso de menores cantidades de solventes en comparación a otras técnicas de extracción. Además, dada la presencia de agua en los propios alimentos, el presente proyecto

estudiará la factibilidad de extraer compuestos bioactivos utilizando el agua presente en la muestra y la adición solo de solventes amigable con el medio ambiente (Lopez-Avila, 2000; Poole, 2020; Theocharis & Andlauer, 2013).

Extracción por maceración es un proceso de extracción sólido-líquido en el cual la matriz vegetal se encuentra en contacto con uno o una mezcla de solventes a una temperatura específica, con o sin agitación esporádica, para que los compuestos de interés solubles en dicho solvente migren al seno del solvente. En el caso de extracción de polifenoles, los solventes varían habitualmente entre agua, metanol, etanol y acetona, dependiendo de la polaridad de los compuestos que se desee extraer. El proceso puede estar influenciado por el solvente, el tiempo de maceración, la relación matriz solvente, el área de muestra expuesta, la temperatura de extracción y los tratamientos previos a la extracción de la muestra, como el grado de molienda y el secado de la muestra (Colvin, 2018).

MAE es una técnica de vanguardia que utiliza las ondas electromagnéticas de alta frecuencia denominadas microondas, las cuales interactúan con la materia causando movimiento molecular por movimiento de iones y por rotación de dipolos (fig. 1-2). Estos dos procesos aseguran un calentamiento uniforme de las muestras o solventes permeables a

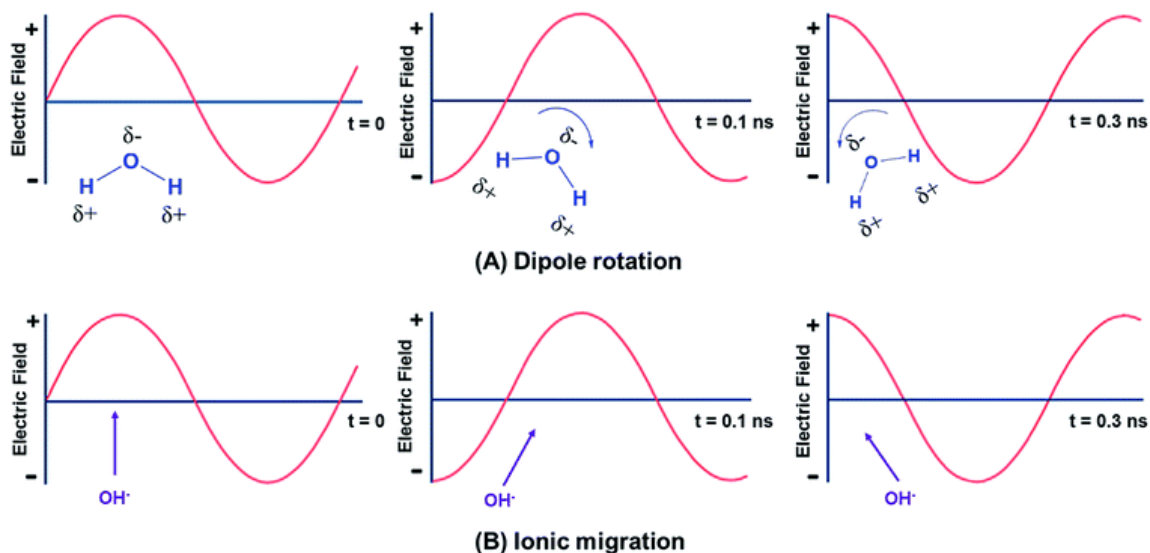


Figura 1-2. Mecanismos fundamentales de calentamiento por microonda (A) Rotación dipolar (B) Migración iónica. (Zhang, Rajagopalan, Lei, Ruan, & Sharma, 2017)

las microondas. Este aumento de temperatura a diferencia de la aplicación típica de calor que ocurre desde las paredes del sistema hacia el centro, comienza desde el centro del sistema y se disipa hacia el exterior (Fig. 1-3). La velocidad de calentamiento estará dada principalmente por el momento dipolar del sistema y la constante dieléctrica del compuesto sometido a la microonda, un mayor momento dipolar provocará un calentamiento más rápido del sistema. La extracción de los compuestos de interés puede enfocarse de dos maneras, dependiendo de las características de la muestra y del solvente de extracción necesario para posteriores análisis. Si los compuestos objetivo contenidos en una muestra absorbente de microondas rodeada por un solvente de baja constante

dieléctrica (solvente de baja polaridad) se pueden extraer por expulsión de la muestra caliente al solvente (relativamente) frío. Alternativamente, si el solvente es absorbente de microondas (extracción con un solvente polar), entonces el calor se produce a través del sistema de extracción y fluye desde el solvente a la muestra con contribuciones de la muestra, si esta también es absorbente de microondas.

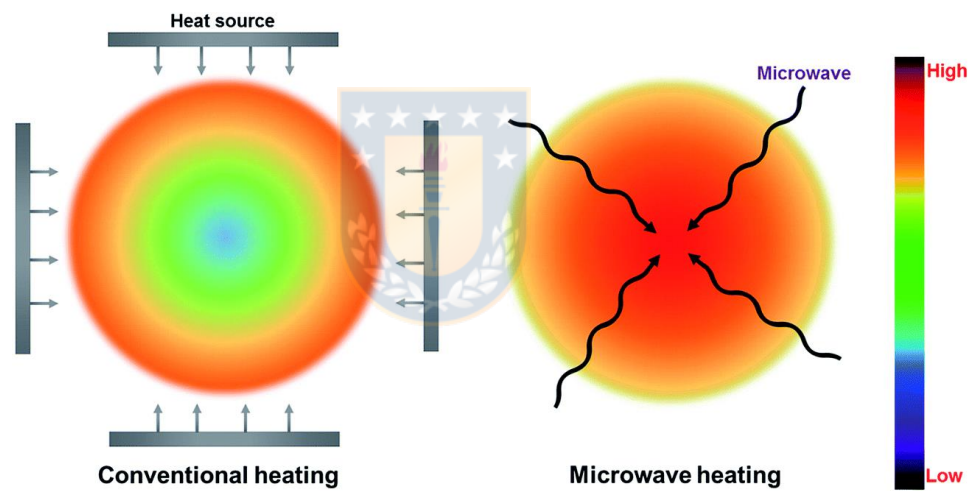


Figura 1-3. Patrones de calentamiento convencionales e inducidos por microondas. (Zhang et al., 2017)

1.6. Detección de compuestos bioactivos

Para separar los compuestos obtenidos a partir de un extracto existen variadas técnicas, entre ellas las más usadas en el área de los alimentos es: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), Cromatografía de Capa Fina (TLC) y la Cromatografía de Gases (GC) dependiendo de las características de los compuestos que se deseen separar. En general las tres técnicas consisten en la interacción del extracto con una fase estacionaria y una fase móvil donde el principio de separación se basa en que los diversos componentes de una muestra dependiendo de la afinidad relativa, se adherirá a la fase estacionaria o se moverá con la fase móvil, con una relación velocidad de elución inversamente proporcional a la afinidad por la fase estacionaria (Baez, 2017). Estos métodos de separación, asociados a dispositivos que monitorizan las especies químicas separadas se han convertido en los principales métodos para separar, identificar y cuantificar compuestos en muestras líquidas y gaseosas. Los detectores utilizados dependerán del tipo de cromatografía y del tipo de compuesto que se desea detectar, siendo los más comunes detectores UV, arreglo de diodos (DAD), detector de ionización de llama (FID), entre otros. Un detector menos común debido a su costo es el acoplado a espectrometría de masas (MS) el cual tiene como ventaja, sobre los anteriores mencionados, la capacidad de entregar suficiente información para dilucidar la estructura química de los compuestos

separados(Houck & Siegel, 2015; Nikolin, Imamović, Medanhodžić-Vuk, & Sober, 2004).

En este caso se utilizará cromatografía de capa fina la cual es una de las técnicas de separación más utilizadas para la separación y el análisis de compuestos en muestras de alimentos, debido a que es una técnica flexible, simple, accesible y menos costosa comparada con HPLC y GC. Para detectar individualmente los compuestos con actividad funcional se implementará el Análisis de Efecto Dirigido (AED) a través de bioensayos de inhibición enzimática *in situ* sobre placas de cromatografía de capa fina de alta eficiencia (High Performance Thin-Layer Chromatography-HPTLC).

El AED no persigue directamente aislar una molécula en particular, sino que detectar primero el efecto biológico para posteriormente identificar la molécula responsable de éste. Realizar este ensayo sobre cromatografía planar presenta numerosas ventajas. Dado que el bioensayo se realiza después de la separación cromatográfica, permite rápidamente detectar la o las moléculas responsables de la bioactividad. Como el solvente utilizado en la separación analítica es evaporado previo al bioensayo, este no interfiere con la actividad biológica del bioensayo, compatibilizando de esta manera los tradicionales solventes orgánicos utilizados en cromatografía con moléculas biológicas lábiles como enzimas y bacterias (Bräm & Wolfram, 2017; Teh & Morlock, 2015).

En el presente trabajo se utilizará AED para detectar compuestos con capacidad antioxidante, inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa y antibacterianos.



2. HIPOTESIS

La frutilla posee compuestos bioactivos con potencial efecto beneficioso sobre enfermedades crónicas no transmisibles

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

Detectar compuestos polifenólicos y derivados con actividad antioxidante, inhibidores de acetilcolinesterasa y antibacterianos en frutilla (*Fragraria ananassa*) aplicando AED-HPTLC/Bioensayo

3.2. ESPECIFICOS

1. Evaluar la composición bromatológica de la frutilla (*Fragraria ananassa*)
2. Optimizar mediante diseño central compuesto la extracción de compuestos polifenólicos presentes en la frutilla aplicando extracción asistida por microondas.
3. Detectar la presencia de compuestos bioactivos en frutilla (*Fragraria ananassa*) con capacidad antioxidante, antimicrobiano e inhibidor enzimático de acetilcolinesterasa mediante HPTLC/Bioensayo.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Reactivos y solventes

Éter dietílico, ácido sulfúrico, sulfato de potasio, ácido bórico, hidróxido de sodio (40% p/v), ácido clorhídrico (30% v/v), etanol absoluto, acetona, ácido acético (glacial), ácido fórmico, sodio dihidrogenofosfato monohidrato (NaH_2PO_4), di-Sodio hidrogenofosfato (Na_2HPO_4), metanol, acetato de etilo, 2-butanona, rojo de pirogalol (PGR), fosfato monopotásico (KH_2PO_4), fosfato dipotásico (K_2HPO_4), Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) adquirido de Merck, Darmstadt, Alemania. Agua ultrapura (18 M Ω cm) fue producida por el sistema Simplicity de Millipore. Reactivo Folin-Ciocalteu 0,2 N, bicarbonato de sodio, ácido gálico, 2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH), trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametiltroman-2-carboxílico), 2,2-Difenil-1-picrilaidrazil (DPPH). Acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* (anguila eléctrica) (E.C 3.1.17), 1-naphthyl acetate. Fast Blue B salt, donepezilo y oxitetraciclina adquirido de Sigma- Aldrich, St. Louis, Mo., U.S.A. Medio de cultivo Muller-Hilton Difco. Adquirido de Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma., U.S.A.

Para los análisis se utilizaron microplacas Costar (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma., U.S.A.) y placas HPTLC, cubiertas con una capa de silica gel 60 F₂₅₄ de 5 x 10 cm de Merck, Darmstadt, Alemania

4.2 Recolección de la muestra

La frutilla fue recolectada en la Vega Monumental de la ciudad de Concepción, región del Biobío, Chile (36° 49' 38" S, 73° 03' 01" O). Las muestras fueron lavadas y almacenadas en bolsas ziploc a -20°C.

4.3 Análisis químico proximal

La composición bromatológica de las muestras será determinada evaluando el contenido de humedad, grasas, cenizas, proteínas, fibras y carbohidratos. Para ello serán utilizados los métodos oficiales de la Association Official of Analytical Chemists (AOAC)(AOAC, 2012).

4.3.1 Porcentaje de Humedad (%):

La muestra homogenizada fue depositada en una cápsula, pesada e incubada a 100 °C por 12 horas. Luego se introdujo en un desecador por 30 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente. Finalmente, la cápsula con el contenido deshidratado fue pesado. El cálculo de porcentaje de húmeda fue calculado por

diferencia entre ambos pesos, este se expresó g de agua por cada 100 g de muestra.

4.3.2 Porcentaje de Grasa total (%):

La muestra obtenida en 3.1 se traspasó a un vaso de aluminio el cual junto con un matraz de fondo redondo se adoso a un extractor Soxhlet. Se realizó la extracción con éter dietílico durante 4 horas en un baño de 98°C. Terminada la extracción se llevó a estufa a 70°C hasta no percibir olor a solvente. Finalmente, se masó el vaso de aluminio y se calculó el porcentaje en base a lo obtenido, teniendo en cuenta que se trataba de una muestra seca.

4.3.3 Porcentaje de proteínas (%):

Se tomaron 2 g de muestra y se adicionaron 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, 0,5 g de catalizador (mezcla de selenio) y una punta de espátula de sulfato de potasio, ésta mezcla se calentó durante aproximadamente 4 horas. Luego, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó agua destilada para iniciar la dilución del ácido. El contenido fue traspasado a un matraz aforado de 100 mL para terminar de aforar con agua destilada. La etapa de destilación fue realizada en el equipo Gerhardt Vapodest 20. Se adiciono 20 mL de la muestra

digerida, 100 mL de una solución de ácido bórico (4% p/v), indicadores rojo de metilo y verde de bromocresol que le imparten un color rojo y una cantidad suficiente de NaOH (40% p/v), durante 4 minutos. Finalmente tituló la solución obtenida con ácido sulfúrico 0,5 N hasta la desaparición del color azul y el viraje al color rojo del indicador. Se calculó el % de proteínas con la siguiente formula:

$$\text{proteína (100 g de muestra)} = \text{gasto} * 1,4 * 6,25 \text{ g de muestra}$$

4.3.4 Porcentaje de cenizas (%):

En un crisol se pesaron 5 g de muestra molida, y se incinero en mechero bajo campana, una vez que ésta dejó emitir vapores, se trasladó el crisol a la mufla y se mantuvo en un rango de temperatura de 525 a 550°C durante 16 horas. Finalmente, se llevó a un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente, para finalmente pesarlo. El porcentaje de cenizas se calculó con la diferencia del peso de referencia.

4.3.5 Porcentaje de fibra cruda (%):

Se agregó 2 g de muestra, 250 mL de agua y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado en un matraz de 500 mL. Este se llevó a ebullición durante una hora. Posteriormente se filtró y se colecto el residuo remanente en el filtro, al cual se le

agrego 250 mL de agua, 30 mL de NaOH 40% p/v y se llevó a ebullición por una hora. Se filtró nuevamente, se blanqueó la fibra lavando con agua y agregando ácido clorhídrico al 30 % v/v, etanol y éter. El filtro se llevó a estufa a 70°C por 30 minutos para después pesarlo.

4.3.6 Porcentaje de Hidratos de carbono (%):

Se calculó por diferencia del 100%, todos los nutrientes calculados anteriormente.

Las determinaciones quedaron expresadas en g de nutriente por cada 100 g de muestra.



4.4 Preparación del extracto

Previa extracción se seleccionó al azar un mínimo de 100 g de frutilla fresca la cual se trozó y mezcló para asegurar una muestra representativa. Ambos métodos de extracción fueron realizados por triplicado.

Para la extracción por maceración se utilizó el procedimiento descrito por Speisky (2012) (Fig. 4-1). Este consiste en pesar 15 g de muestra en un matraz al cual se le añadió 150 mL solvente de extracción compuesto de acetona, agua ultrapura

y ácido acético en una proporción 70:29,5:0,5 (v/v/v). La homogenización de la muestra fue realizada con ultraturrax por un periodo de 3 minutos a 8000 rpm, y luego la extracción por maceración fue realizada incubando la mezcla por 40 minutos a 30°C agitando por 10 segundos cada 10 minutos. El extracto obtenido fue centrifugado a 12519 xg por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante fue colectado y reservado a 4°C mientras que el pellet fue sometido nuevamente al proceso de extracción. El sobrenadante obtenido de la segunda extracción fue mezclado en vortex con el sobrenadante de la primera extracción.

Para MAE (Fig. 4-2) se utilizó un microondas Milestone Ethos X, rotor SK-15 Shelton (CT, U.S.A.) a una potencia constante de 500 W. Fueron masados 3 g de muestra, a los cuales se les adicionó 15 mL del solvente de extracción a optimizar (etanol, agua y ácido fórmico), se homogenizó durante 2 minutos a velocidad media y se agregó al vaso de alta presión junto con un agitador magnético. Todas las extracciones se realizaron con agitación constante durante el proceso de extracción. El extracto obtenido fue centrifugado a 12519 xg por 15 min a 4°C. El extracto fue filtrado sobre filtros 0,22 µm y posteriormente el filtrado fue almacenado a -20°C.

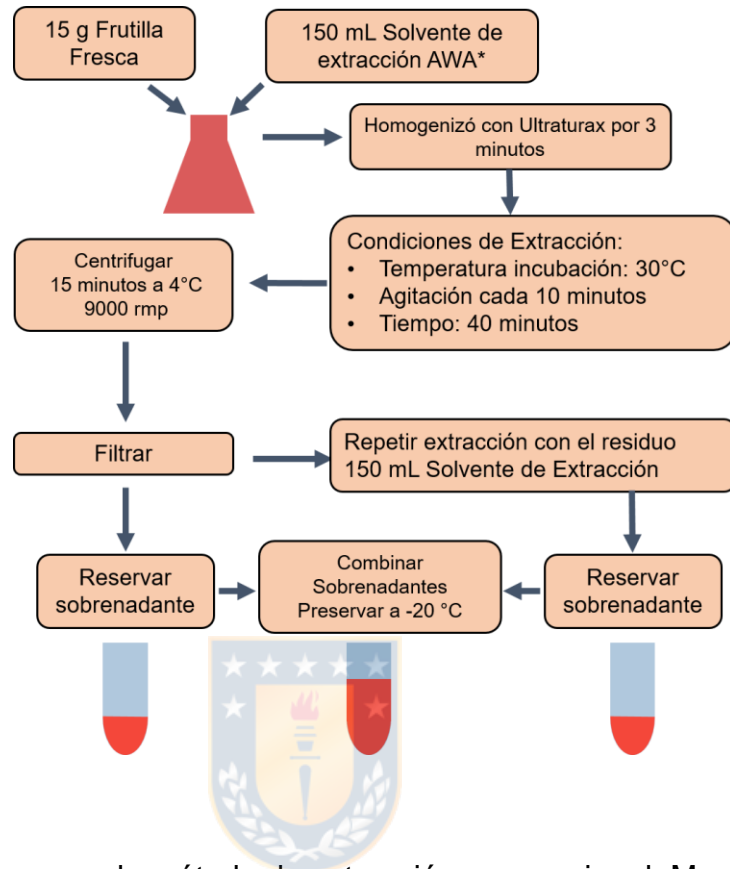


Figura 4-1. Esquema de método de extracción convencional, Maceración.

*AWA: acetona, agua ultrapura y ácido acético en una proporción 70:29,5:0,5 (v/v/v)

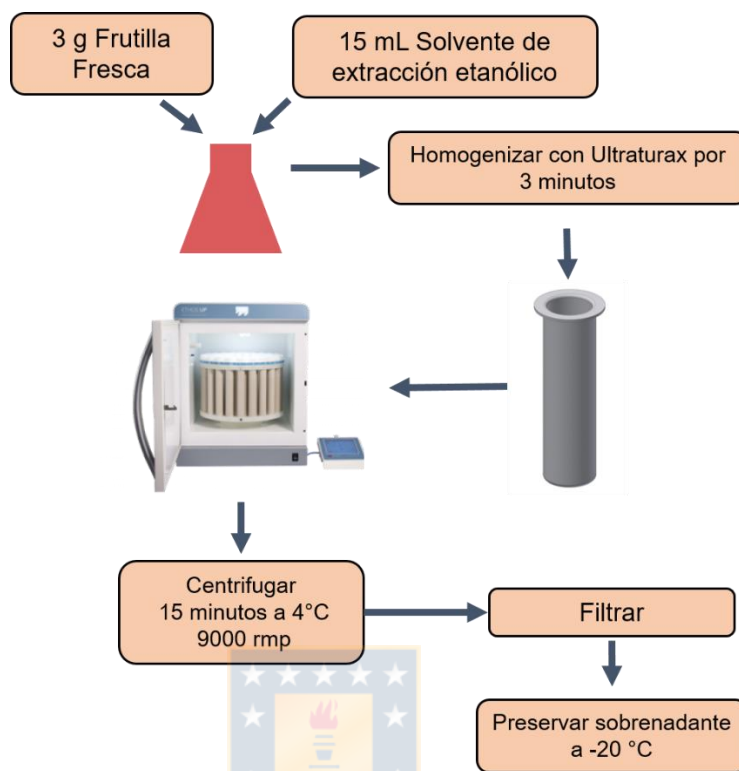


Figura 4-2. Esquema de método de MAE.

4.5 Diseño de experimentos

Para la optimización MAE se utilizó un diseño central compuesto, centrado en las caras, el cual utilizó como variables el tiempo de extracción entre 5 a 15 minutos, la temperatura de extracción entre 40 a 60° C y el porcentaje de etanol en el extracto entre 40 a 60% v/v y se evaluó como respuesta la cuantificación de polifenoles totales, y la capacidad antioxidante por ORAC y DPPH.

4.6 Cuantificación de polifenoles totales

Se realizó utilizando el método colorimétrico Folin-Ciocalteu, de acuerdo con el procedimiento descrito por Singleton y Rossi. Este se basa en que el reactivo Folin-Ciocalteu se reduce al oxidar fenoles, formando óxidos azules de tungsteno y molibdeno. Esta coloración presenta una absorción máxima a 725nm, la cuales proporcional a los compuestos polifenólicos presentes en la muestra.(Singleton & Rossi, 1965)

Se mezclaron 15 μL de extracto (diluido 1:3 v/v) con 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu 0,2 N y 100 μL de bicarbonato de sodio. Se utilizó como estandar ácido gálico, a una concentración de 60 g/L, y se diluyó para preparar una curva de calibración de 0,02 a 0,3 mg/mL. El ensayo fue realizado en triplicado ($n=3$) en microplaca Costar de 96 pocillos. La cuantificación fue realizada en un multilector de microplacas Tecan NanoQuant (Infinite M200-PRO), utilizando como blanco agua ultrapura. La placa se mantuvo al interior del equipo en oscuridad durante 1 hora y 30 minutos, y luego se midió la absorbancia a 725 nm. Los resultados se determinaron a partir de la ecuación lineal de la curva estándar preparada con ácido gálico y se expresaron como mg de ácido gálico equivalente por 100 g de muestra fresca (mg EAG/100 g MF). Cada muestra se ensayó por triplicado.

4.7 Capacidad antioxidante

4.7.1 Metodo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

La capacidad antioxidante de las diferentes muestras se evaluó aplicando la metodología basada en la capacidad de absorción de radicales del oxígeno, en la cual el compuesto 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) a 37°C produce radicales peroxilo ($RO_2\cdot$) que oxidan a la molécula de rojo de pirogalol (PGR), produciendo una disminución progresiva de la absorbancia a 540 nm. A través de la donación de H^+ las moléculas antioxidantes son capaces de estabilizar los radicales peroxilo evitando así la disminución de la absorbancia del PGR. De acuerdo con lo anterior, se cuantifica la capacidad antioxidante del extracto al comparar la disminución de la señal en presencia y ausencia de antioxidante. (Amarowicz, 2019; Ortiz et al., 2012; Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001).

Se preparó una solución de buffer fosfato (75 mM) que se ajustó a pH 7,4. Este buffer se utilizó para preparar las soluciones de PGR (64 μ M), AAPH (120 mM) y trolox (1 mM). Trolox fue utilizado para la curva de calibración de 100 a 600 μ M. Para la reacción se mezcló 194 μ L de buffer fosfato, 20 μ L de trolox y 15 μ L de muestra diluida (1:8 v/v) o 15 μ L de estándar. Para el blanco se utilizó 209 μ L del buffer fosfato con 20 μ L de PGR 35 y para el control de la reacción 230 μ L del buffer fosfato con 20 μ L de PGR. Fueron agregados a la placa 21 μ L de AAPH e incubado por 30 minutos a 37° C, a todos los pocillos con excepción del control

de la reacción. Posteriormente, se midió la absorbancia de las mezclas a 540 nm cada un minuto, por una hora y media. Utilizando el programa GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA) se calculó el área bajo la curva (AUC) de estos datos cinéticos, con los cuales se obtuvo una ecuación lineal con la curva estándar de trolox y los resultados se expresaron como micromol (μmol) equivalentes de trolox (ET) por 100 gramos de muestra. Cada muestra se ensayó por triplicado

4.7.2 Método DPPH

La capacidad antioxidante fue evaluada con el método del radical DPPH según un protocolo previamente estandarizado en el laboratorio. El radical de color violeta se decolora en presencia de antioxidantes y esta diferencia es medida a longitud de onda de 517 nm.

Para cuantificar se realizó una curva de calibración de trolox en soluciones etanólicas de 50 a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El extracto se trabajó diluido en proporción 1:7 v/v. El blanco consistió de una mezcla 1:1 v/v de etanol y agua ultrapura. Se preparó una solución metanólica de DPPH 0,5 $\mu\text{mol}/\text{L}$. En cada pocillo de la microplaca se dispusieron 150 μL de esta solución de DPPH y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. Posteriormente se añadió a cada pocillo 30 μL de muestra, estándar o blanco, según corresponda, se agitó la microplaca y se mantuvo en el equipo por 15 minutos. Concluido ese tiempo se volvió a medir la

absorbancia, y se calculó el porcentaje de actividad neutralizante de radicales o %RSA, por sus siglas en inglés.

$$\%RSA = [(A_{inicial} - A_{final}) / A_{inicial}] \times 100,$$

Donde $A_{inicial}$ corresponde a la absorbancia antes de añadir la muestra y A_{final} a la absorbancia pasados los 15 minutos. Los resultados se obtuvieron de la ecuación lineal con la curva estándar de trolox y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de trolox (ET) por 100 gramos de muestra. Para cada muestra o blanco, la reacción se llevó a cabo por triplicado.



4.8 Análisis Funcional

4.8.1 Separación cromatográfica

Los distintos compuestos presentes en el extracto fueron separados por cromatografía de capa fina de alta eficiencia (HPTLC). Se sembró el extracto en placa HPTLC cubierta con una capa de 200 μm de sílica gel 60 F₂₅₄, empleando el aplicador automático ATS-4 (CAMAG, Muttenz, Suiza), utilizando las siguientes especificaciones: ancho de banda 5 mm y velocidad de sembrado 180 nL/s, para todas las placas. La separación cromatográfica se realizó utilizando una fase móvil compuesta de etilacetato, 2-butanona, ácido fórmico y agua ultra pura en proporción 49,3:35,2:8,5:7 v/v/v/v, para los bioensayos acetilcolinesterasa y

bioautografía *Bacillus subtilis*, y una mezcla de acetato de etilo, tolueno, ácido fórmico, metanol y agua ultra pura en proporción 50:18:12:12:12 v/v/v/v/v para evaluar la capacidad antioxidante. Las placas se desarrollaron hasta los 7 cm, una vez terminado el desarrollo la placa fue secada a 120°C por 30 minutos en placa calefactora (CAMAG TLC Plate Heater III). Los resultados de la separación fueron foto-documentados con el visualizador de TLC (CAMAG) bajo iluminación de luz blanca, a 366 nm y 254 nm.

4.8.2 Bioensayo acetilcolinesterasa:

Para el bioensayo se utilizaron volúmenes de sembrado de 3 y 5 µL de extracto y como control positivo donepezilo en solución acuosa (0,1 mg/mL) y las condiciones previamente descritas en 4.8.1. Una vez seca la placa se atomizó con buffer fosfato (0,1 M) ajustado a pH 7,4, secándola a 60°C por 30 minutos. Luego, la placa fue atomizada con sustrato 1-naftil acetato, preparado disolviendo 15 mg de sustrato en solución etanol:agua (1:1 v/v), y secada a 60°C por 10 minutos. Posteriormente se atomizó enzima acetilcolinesterasa (0,5 U/ml en buffer fosfato 0,1 M a pH 7,4) y se incubó dentro de una cámara húmeda acondicionada en el laboratorio, en estufa a 37°C por 15 minutos. Pasado ese tiempo, se atomizó con una solución acuosa de Fast Blue (0,75 mg/ml) el cual interacciona con el producto de la reacción enzimática, generándose una sal de diazonio de color púrpura, lo que permite observar los posibles compuestos

inhibidores como segmentos decolorados dentro del campo púrpura. El resultado se documentó con el visualizador de TLC (CAMAG) bajo iluminación de luz blanca (Marston, Kissling, & Hostettmann, 2002).

4.8.3 Bioautografía *Bacillus subtilis*

Sobre la placa se sembró el extracto en volúmenes de 3 y 5 μL en una placa y 13 y 15 μL en otra y como control positivo 6 μL de oxitetraciclina disuelta en una mezcla de metanol/agua en proporción 40:60 % v/v (1 mg/mL) utilizando las condiciones descritas en 4.8.1.

Para desarrollar el ensayo se utilizó un método optimizado en el laboratorio. Para lo cual se preparó la cepa *Bacillus subtilis* del cepario del laboratorio, preservadas a -86°C . Desde una placa de agar Muller-Hilton, se tomó una colonia, se agregó a un matraz con medio de cultivo Muller-Hilton e incubó en estufa a 37°C por 48 horas en condiciones de aerofilia. Posteriormente, una alícuota se inoculó en caldo Muller-Hilton e incubados en por 7 horas a 37°C en condiciones de aerofilia, para alcanzar una concentración final de 10^7 UFC/mL

Luego, para realizar el bioensayo, la placa previamente sembrada y desarrollada se atomizó con buffer fostato pH 7,4 y fue secada a 100°C por 30 minutos. Una vez seca, se sumergió en la suspensión bacteriana previamente incubada, utilizando un dispositivo de inmersión TLC (CAMAG; tiempo de inmersión 6 s,

velocidad de inmersión 3,5 cm/s). Esta placa se incubó en estufa a 37° C por 2 horas, en posición horizontal dentro de una cámara acondicionada humedecida con agua destilada. Pasado el tiempo de incubación la placa se atomizó con una solución de MTT al 0,2% p/v preparado con buffer PBS y se dejó reaccionar por 30 minutos dentro de la incubadora. El resultado se documentó bajo iluminación de luz blanca.

4.8.4 Capacidad Antioxidante

Los distintos compuestos presentes en el extracto fueron separados por cromatografía de capa fina de alta eficiencia (HPTLC), sobre la cual se aplicó el extracto en volúmenes de 3 y 5 μL , y como control positivo ácido gálico. Siguiendo la metodología descrita en 4.8.1. Una vez seca se sumergió en una solución metanólica de DPPH al 2% p/v y se dejó secar a temperatura ambiente en oscuridad por 15 minutos. La placa fue documentada con luz blanca.

4.9 Análisis estadísticos.

Los datos obtenidos fueron evaluados utilizando estadística descriptiva [media y desviación estándar (SD)]. Mediante un modelo de regresión lineal se realizaron las curvas de calibración. Los resultados fueron evaluados aplicando análisis paramétricos: análisis de varianza (ANOVA), análisis de t-student (comparación

de medias), todos con un nivel de significancia (α) de 0.05, para lo cual se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA). Los diseños de experimentos (DOE) de optimización fueron establecidos y analizados mediante el programa StatGraphics Centurion XV versión 15.1.02 (Rockville, MD, USA) y Modde versión 7.0 (Umetrics. Umea, Suecia).



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización química de Frutilla

Los resultados del análisis químico proximal realizados a la muestra se pueden observar en la Tabla 5-1. Todos los resultados experimentales, al ser comparados con la bibliografía *National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release*, no presentaron diferencias estadísticamente significativa.



Tabla 5-1: Análisis químico proximal de frutilla por 100 g de muestra fresca^a

Nutriente	% Referencia	Químico proximal (%)	Valor p
Agua	90,95	90,05 ± 0,12	0,069
Proteína	0,67	0,94 ± 0,01	0,893
Lípidos totales	0,30	0,10 ± 0,04	0,970
Carbohidratos	7,68	7,40 ± 0,37	0,900
Fibra Cruda	2,00	1,15 ± 0,31	0,080
Ceniza	0,40	0,35± 0,00	0,990

^a Cada muestra fue realizada por triplicado ($n=3$)

De acuerdo con los datos obtenidos, la muestra fresca de frutilla destaca por su contenido de humedad ($90,05 \pm 0,12\%$) similar a otros frutos conocidos como “berrys” como el arándano (84,21%), frambuesa (85,75%) y moras (88,15%). Sin embargo presenta un contenido de carbohidratos reducido en comparación a estos mismos, 14,49%, 11,94%, 9,61% respectivamente. (U.S. Department of Agriculture, 2019)

5.2 Screening de Solvente

Para determinar el solvente a utilizar durante el proceso de optimización se seleccionaron dos solventes con el fin de comparar su rendimiento durante el mismo proceso de extracción asistida por microondas, se seleccionó acetona en concentración 70%, pues es utilizado como solvente de extracción por Speisky (2012), extracción que se utilizara para comparar el rendimiento de MAE optimizada contra una extracción por maceración y se comparó con etanol en concentración 58% v/v el cual se seleccionó tomando en consideración su carácter polar, constante dieléctrica y uso frecuente en procesos de extracción de polifenoles. En la tabla se observa que la cuantificación de polifenoles determinada por método Folin-Ciocalteu (F-C) es significativamente mayor utilizando acetona ($p < 0,05$) (Fig. 5-1).

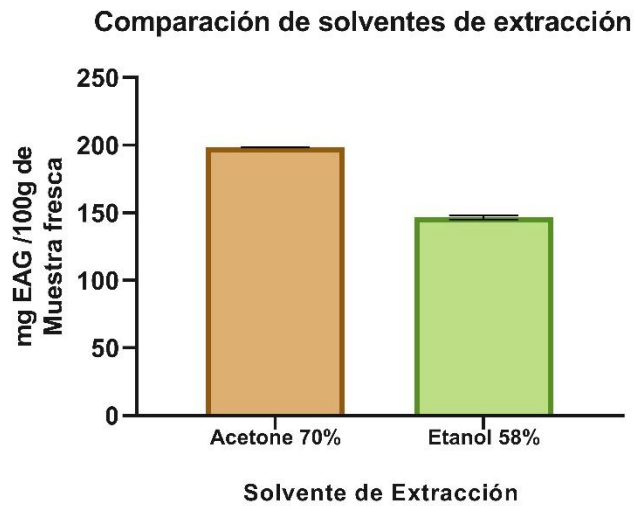


Figura 5-1. Contenido de polifenoles totales (Media \pm SEM), expresado en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de muestra fresca utilizando dos opciones de solvente.

Con respecto al resultados acerca de la elección del solvente a utilizar se consideró, además de la diferencia estadística, el impacto ambiental de ambos solventes, si bien el solvente acetona presentó un extracto con una cuantificación de polifenoles estadísticamente mayor, se tomó en cuenta que, según “*The National Pollutant Inventory*”, este solvente presenta una vida media de 22 días y causa daño a la diversidad marina cuando alcanza el mar al momento de desecharse, mientras que el solvente etanol demora horas en descomponerse y en cantidades pequeñas no presenta mayor impacto en el ambiente (National Pollutant Inventory, s.f.) y enfocando la investigación a generar un método de extracción más verde se decidió utilizar etanol. Esta decisión se apoya también

en los resultados de Kalia (2008) quien obtiene mejores resultados de polifenoles totales utilizando como solvente etanol.

5.3 Screening de Tiempo

Para determinar el rango de tiempo de extracción se comparó la diferencia entre el tiempo inicial de extracción de 45 minutos y un tiempo de 10 minutos utilizando el solvente previamente seleccionado y una temperatura promedio de 50° C, resultando en la tabla, en la que se observó que existe una diferencia significativa al extraer durante 45 minutos (Fig. 5-2).

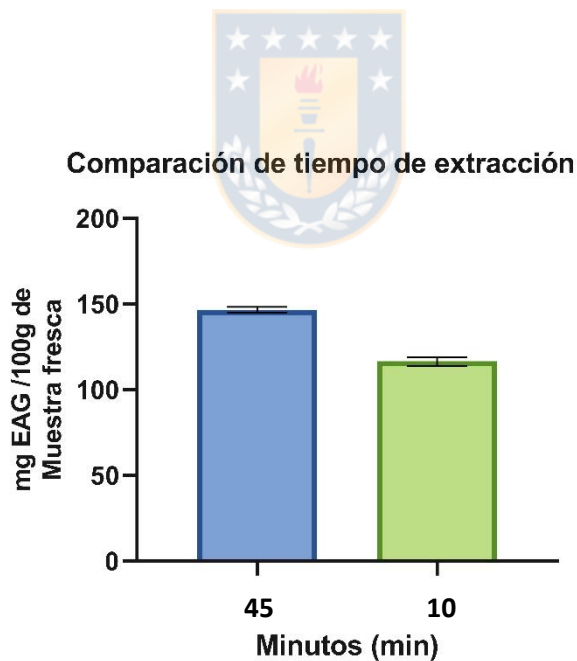


Figura 5-2. Contenido de polifenoles totales (Media \pm SEM), expresado en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de muestra fresca (MF) utilizando diferentes tiempos de extracción.

Se observa que aun cuando la diferencia estadística indica que el promedio de polifenoles totales obtenidos pasados 45 minutos ($146,66 \pm 2,86$ mg EAG/100g MF) es mayor que la obtenida en 10 minutos ($116,51 \pm 4,40$ mg EAG/100 g MF), la diferencia numérica no es mayor a un 20% en un tiempo 4 veces menor, debido a esto, se planteó que utilizar un rango de tiempo de extracción reducido, que sumado a los factores temperatura y porcentaje de solvente, los cuales fueron evaluados en esta investigación, podría ser una ventaja para la optimización del proceso extractivo asistido por microonda. Esta aproximación concuerda con autores como Kalia (2008) y Song (2011) quienes utilizan y destacan como una de las ventajas del microondas el acotado tiempo de extracción.



5.4 Optimización de método de extracción

Para la optimización del proceso de extracción se utilizó un diseño central compuesto, centrado en las caras, el cual es una efectiva herramienta estadística para optimizar el proceso de extracción de polifenoles, utilizando un reducido número de experimentos, pero asegurando un óptimo estudio de la interacción entre las variables (Arvindekar & Laddha, 2016).

Debido a que la extracción se enfoca en obtener polifenoles, se consideró como factores significativos la temperatura y el tiempo de extracción debido a que estos parámetros pueden provocar inestabilidad y pérdida de actividad dichos

polifenoles, por otro lado se adicionó a la optimización la cantidad de etanol en la mezcla de solventes para asegurar la mejor afinidad de los polifenoles por el solvente de extracción (Tabla 5-2). Las respuestas a evaluar fueron, la cuantificación de polifenoles totales (PT), la capacidad antioxidante por método ORAC y por método DPPH buscando en cada caso la maximización de la respuesta. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5-3.

Tabla 5-2. Factores y rangos definidos para el diseño de experimentos

Factor	Rango
Tiempo (min)	5 - 15
% de etanol (v/v)	40 - 60
Temperatura (°C)	40 - 60

Tabla 5-3. Condiciones experimentales y sus respectivas respuestas. ^a

Factores			Respuestas		
Tiempo (min)	% Etanol (v/v)	Temperatura (°C)	PT (mg EAG/100g MF)	ORAC (μMol ET/100 g MF)	DPPH (mg ET/100g MF)
5	40	40	121,33 ± 22,18	1970,78 ± 161,12	328,42 ± 12,41
15	40	40	154,00 ± 13,31	1170,91 ± 92,87	315,62 ± 11,42
5	60	40	144,43 ± 8,87	3577,40 ± 16,30	324,47 ± 1,69

15	60	40	165,16 ± 1,46	1152,80 ± 30,67	365,07 ± 14,99
5	40	60	126,55 ± 4,52	2548,57 ± 51,58	345,54 ± 2,69
15	40	60	162,55 ± 7,26	993,28 ± 40,01	392,46 ± 10,70
5	60	60	182,10 ± 8,07	1663,48 ± 33,03	256,32 ± 10,45
15	60	60	185,37 ± 32,47	1022,73 ± 59,08	277,94 ± 8,27
5	50	50	118,76 ± 2,42	2446,74 ± 71,59	290,68 ± 5,26
15	50	50	158,35 ± 2,14	1352,62 ± 88,32	354,32 ± 15,24
10	40	50	172,63 ± 11,35	1156,02 ± 31,89	454,12 ± 38,24
10	60	50	152,14 ± 2,15	1304,34 ± 53,19	422,51 ± 14,53
10	50	40	152,31 ± 9,24	1478,60 ± 23,93	326,58 ± 18,48
10	50	60	145,87 ± 7,27	1335,23 ± 8,68	316,27 ± 11,95
10	50	50	191,23 ± 8,41	1572,05 ± 126,62	484,35 ± 12,09
10	50	50	176,98 ± 4,32	1247,23 ± 325,85	419,97 ± 20,16

^a Todos los experimentos se realizaron por triplicado ($n = 3$). Los resultados se expresan como media ± DS.

Los datos experimentales de cada respuesta fueron ajustados en un modelo de segundo grado. Un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia (α) de 0.05 fue realizado para cada una de las respuestas para determinar cuáles de los factores afectan significativamente tanto la variable eficiencia de extracción como la capacidad antioxidante del extracto por método ORAC y DPPH.

En el gráfico de Pareto (Fig. 5-3.B) asociado los polifenoles totales del extracto, se aprecia que ninguno de los factores estudiados afectó significativamente la eficiencia de extracción de polifenoles ($p>0,05$), esto puede estar relacionado con que si bien está demostrado que estos factores son influyentes (Setyaningsih, 2015; Sparr Eskilsson & Björklund, 2000) no están en los rangos apropiados para que estadísticamente sea significativos, lo que se observa en el gráfico de superficie de respuesta en el cual se aprecia que el máximo de optimización se encuentra en un extremo (Fig. 5-3.A). Las condiciones óptimas entregadas por el modelo para la extracción de polifenoles totales, consideran 10 minutos de extracción, 60 % v/v de etanol y 59° C.

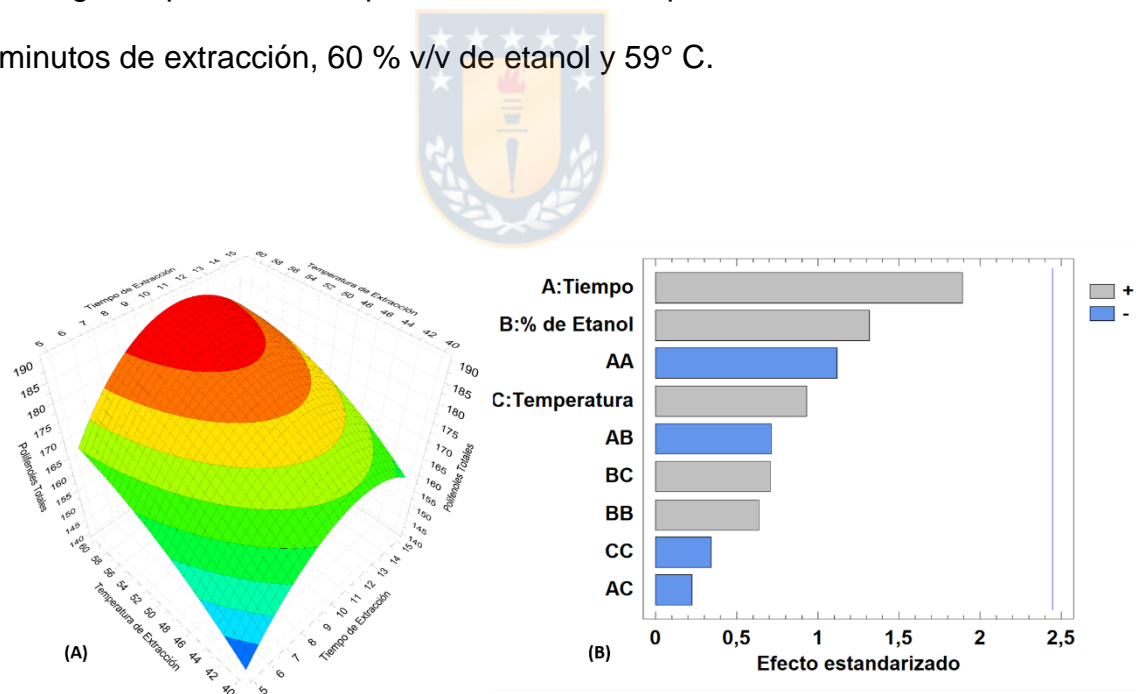


Figura 5-3. (A) Gráfico de superficie de respuesta para optimización de polifenoles totales, mostrando el efecto del tiempo y la temperatura de extracción manteniendo constante el % de etanol en 60% v/v. (B) Grafico de Pareto estandarizado para polifenoles totales.

Con respecto a la capacidad antioxidante por método ORAC, el análisis de varianza determinó que el único valor que afectó significativamente la capacidad antioxidante fue el tiempo de extracción, esto se puede apreciar en el gráfico de Pareto (Fig. 5-4.B). Este parámetro afecta al modelo de manera inversamente proporcional, es decir, al disminuir el tiempo de extracción aumenta la capacidad antioxidante por método ORAC del extracto. Esto se apoya por lo encontrado por Sparr Eskilsson and Björklund (2000) quienes señalan que el tiempo necesario para alcanzar la temperatura deseada en la muestra de manera homogénea es menor que utilizando métodos de extracción convencionales, debido al mecanismo de generación de calor por microondas, por lo que someter a la muestra a periodos prolongados de tiempo podría generar la degradación de compuestos de interés. Por otro lado el modelo presentó un gráfico de superficie (Fig. 5-4.A) que no muestra un comportamiento de campana lo que sugiere que los factores pueden ser modificados para mejorar la optimización. Las condiciones óptimas entregadas por el modelo para maximizar la capacidad antioxidante por método ORAC, consideran 7 minutos de extracción, 60 % v/v de etanol y 40° C.

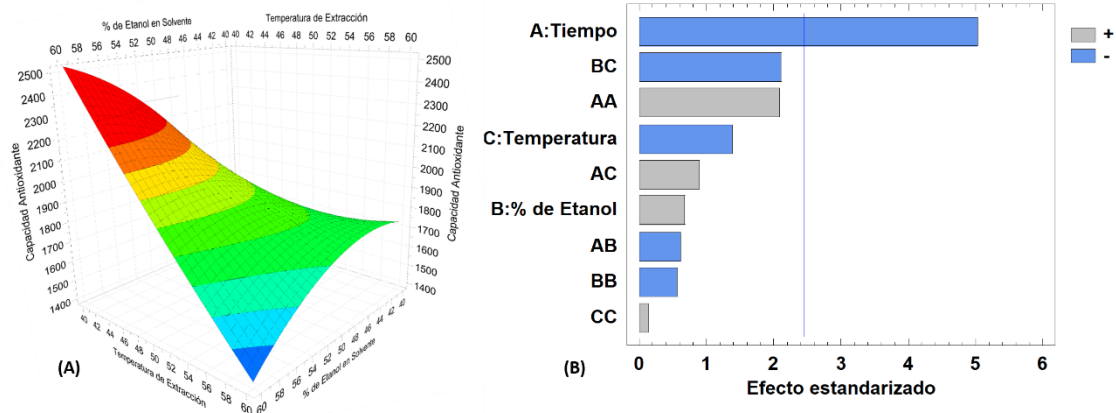


Figura 5-4. (A) Gráfico de superficie de respuesta para optimización de ORAC, mostrando el efecto de la temperatura y el % de solvente manteniendo constante el tiempo de extracción en 7 minutos. (B) Grafico de Pareto estandarizado para ORAC.

El análisis de varianza para la capacidad antioxidante por método DPPH determinó que el tiempo y la temperatura en términos cuadráticos fueron los factores que afectaron significativamente ($p < 0,05$) al modelo, afectando, en ambos casos, de manera inversamente proporcional, lo que se observa en el gráfico de Pareto (Fig. 5-5.B). La relación inversamente proporcional entre el tiempo y la respuesta se explica porque, como ya se mencionó con anterioridad, el acotado tiempo de extracción es una de las ventajas del microondas puesto que la elevación de la temperatura es uniforme y afecta no solo al solvente sino que también a la matriz debido a su contenido de agua. Por otro lado, la relación inversamente proporcional entre la temperatura y la respuesta pareciera ir en contra de lo que afirman autores como Sparr Eskilsson and Björklund (2000) y

Setyaningsih (2015), quienes aseguran que el uso de temperaturas elevadas mejoran la extracción debido a que aumenta la fluidez del solvente y permite un mejor paso del solvente hacia la matriz. Por otro lado, esto se puede explicar por la variabilidad de polifenoles presentes en la frutilla, y que estos podrían ser afectados por el aumento de temperatura, como afirman Routray and Orsat (2012) quienes destacan que el aumento de temperatura puede afectar el resultado de la extracción, y por lo tanto, la capacidad antioxidante del extracto debido a la descomposición de los compuestos presentes en la muestra. El gráfico de superficie de respuesta (Fig. 5-5.A) sugiere que la respuesta máxima se obtendrá con un tiempo de extracción de 10 minutos, 60% v/v de etanol y 45°C.

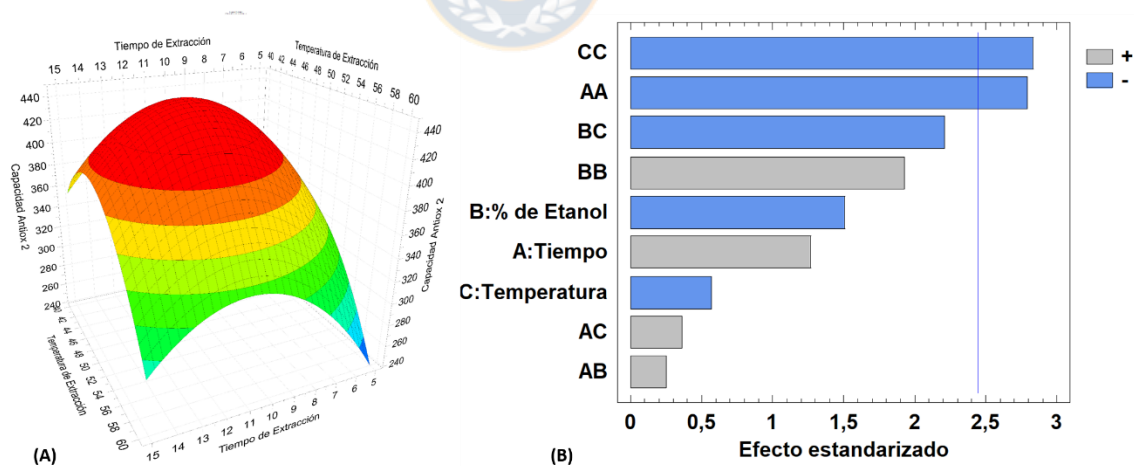


Figura 5-5. (A) Gráfico de superficie de respuesta para optimización de DPPH, mostrando el efecto del tiempo y temperatura de extracción de extracción manteniendo constante el % de etanol en 60% v/v. (B) Grafico de Pareto estandarizado para DPPH.

Considerando lo anterior, con intención de maximizar todas las anteriormente mencionada, se realizó una optimización de respuesta múltiple de la cual se obtuvieron las condiciones que se detallan en la tabla 5-4.

Tabla 5-4. Condiciones óptimas de extracción para la maximización de las respuestas

Factor	Óptimo
Tiempo (min)	7,0
% de Etanol (% v/v)	60,0
Temperatura (°C)	45,5

5.5 Caracterización del extracto optimizado

Una vez optimizada la extracción, se procedió a determinar los polifenoles totales (PT), capacidad antioxidante por ORAC y DPPH. Se obtuvo un extracto con $191,84 \pm 9,17$ mg EAG por 100 g de muestra, $1719,65 \pm 240,27$ μ mol ET en 100 g de muestra y $262,49 \pm 33,42$ mg ET en 100 g de muestra.

Estos resultados de PFT y ORAC fueron comparados con la base de datos de “Actividad antioxidante y de contenido de polifenoles totales en frutas” (INTA, 2013) en el cual se rescata que el contenido de polifenoles está dentro del rango reportado (148 - 343 mg EAG/100 g MF), mientras que la capacidad antioxidante medida por ORAC se presenta por debajo del rango presentado en el portal antioxidantes (2594 – 5433 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g MF}$). Por otro lado la capacidad antioxidante medida por DPPH fue superior a la presentada por Nowicka, Kucharska, Sokół-Łętowska, and Fecka (2019) quienes investigan 90 cultivos distintos de frutilla (189,80 mg ET/100g de MF).



5.6 Comparación de métodos de extracción Maceración vs Microondas

Al comparar el método optimizado con el método obtenido de la bibliografía se observó que la cuantificación de PT no es significativamente mayor ($p > 0,05$). Sin embargo, la capacidad antioxidante del extracto optimizado si fue significativamente mayor en ambos ensayos realizados, como se observa en la tabla 5-5.

Tabla 5-5. Tabla comparativa de métodos de extracción, evaluando polifenoles totales, capacidad antioxidante por método ORAC y DPPH. Expresado como promedio \pm desviación estándar.

	Maceración	Microonda	<i>p</i>
F-C (mg EAG/100 g MF)	222,01 \pm 32,51	191,84 \pm 9,17	0,6396
ORAC (μ g ET/100 g MF)	1262,74 \pm 171,77	1831,56 \pm 71,03	0,0061
DPPH (mg ET/100 g MF)	103,32 \pm 4,36	262,49 \pm 33,42	<0,0001

El extracto fue analizado por triplicado para cada ensayo ($n = 3$). Los resultados se expresan como media \pm DS



Si bien el contenido de polifenoles totales no fue mayor que la maceración, si lo es la capacidad antioxidante por ambos métodos, esto sumado a la disminución del tiempo de extracción desde 80 minutos a 7 minutos y al uso de una menor cantidad de solvente (300 mL vs 15 mL), nos indican que el método MAE es un método eficiente con respecto al método convencional. Resultados similares, utilizando distintas matrices al comparar estos métodos de extracción, fueron reportados por Kalia (2008) quien, si bien no obtiene un aumento significativo de los polifenoles totales, gracias a la utilización del microondas redujo de una noche de extracción por maceración a 6 minutos MAE. También los resultados de Li et al. (2017) quienes obtienen un mejor rendimiento de extracción con 71 minutos

MAE a diferencia de 24 horas de maceración, y Zhao, Zhang, Li, Meng, and Li (2018) los que reducen al igual que Li et al. (2017) una maceración de 24 horas a una extracción de 45 minutos gracias a la utilización del microondas.

5.7 Detección de compuestos con bioactividad

5.7.1 Inhibición de acetilcolinesterasa.

La realización del bioensayo de acetilcolinesterasa se puede observar en la figura 5-6.D donde se evidencia una banda incolora con un factor de retención (R_F) de 0,64 que indicaría la presencia de un compuesto inhibidor. Sin embargo este resultado no se evidenció en placas con el extracto de muestra fresca, sino que en un extracto donde la muestra fue previamente deshidratada en estufa a 40°C por 24 hrs. hecho que nos indica que el compuesto responsable de la inhibición enzimática en el extracto de frutilla fresca se no encuentra en concentración suficiente para ser observado en el ensayo.

La actividad neuroprotectora del consumo de frutillas ha sido evidenciada en ratones de avanzada edad como fue reportado por Shukitt-Hale et al. (2008) mientras que la actividad inhibidora de acetilcolinesterasa ha sido reportada previamente en otras especies del genero *Fragaria* y ha sido asociado a

compuestos de tipo flavonoide, especialmente el flavonol quercetina (Kamila Borowiec & Zapp, 2019).

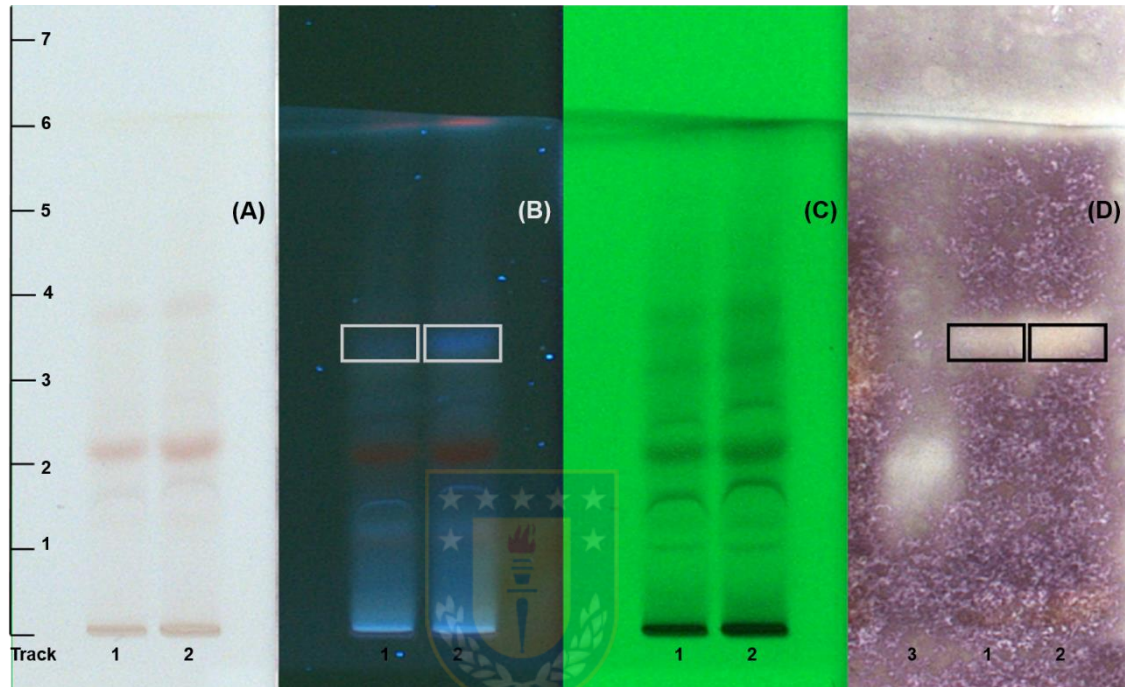


Figura 5-6. Cromatograma HPTLC de extracto de frutilla deshidratada en placa silica gel 60 F₂₅₄ utilizando como fase móvil etilacetato/2-butanona/ácido fórmico/agua ultra pura (49,3:35,2:8,5:7 v/v/v/v). Foto-documentación bajo luz blanca (A), foto-documentación a 366 nm (B), foto-documentación a 254 nm (C), bioensayo HPTLC-Acetilcolinesterasa, control positivo donepezilo 5 µL, track 3 foto-documentado bajo luz blanca (D)

5.7.2 Bioautografía *Bacillus subtilis*

La bioautografía de *Bacillus subtilis* puede apreciarse en la figura 5-7 y figura 5-8 en donde se evidencia una franja de inhibición cerca de la base del sembrado. Esta banda se presenta en todos los volúmenes sembrados (3, 5, 13 y 15 μL). Indicando la presencia de un compuesto inhibidor de crecimiento de bacilos Gram positivo. Esta actividad no ha sido profundamente descrita como otros efectos beneficiosos presentes en la frutilla, aunque existe evidencia que tanto la especie de frutilla utilizada en esta investigación, como la frutilla silvestre, presentan actividad sobre *Staphylococcus aureus*. Gomes et al. (2018) no hace mayores acercamientos hacia el carácter químico de las moléculas responsables de la actividad que en su caso caracteriza como bacteriostática, mientras que Cárdenas-Valdovinos et al. (2018) utiliza un extracto rico en antocianos y les atribuye los efectos inhibitorios a este grupo de compuestos. Por otro lado, Nohynek et al. (2006) agrega que además de la actividad sobre *S. aureus* la frutilla presenta actividad sobre *Helicobacter pylori* y *Staphylococcus epidermidis* y atribuye la actividad a los elagitaninos presentes en la muestra. Basado en todo lo anterior no es posible hacer una aproximación sobre la naturaleza de este compuesto, por lo que una optimización de la separación y pruebas de identificación serían recomendables.

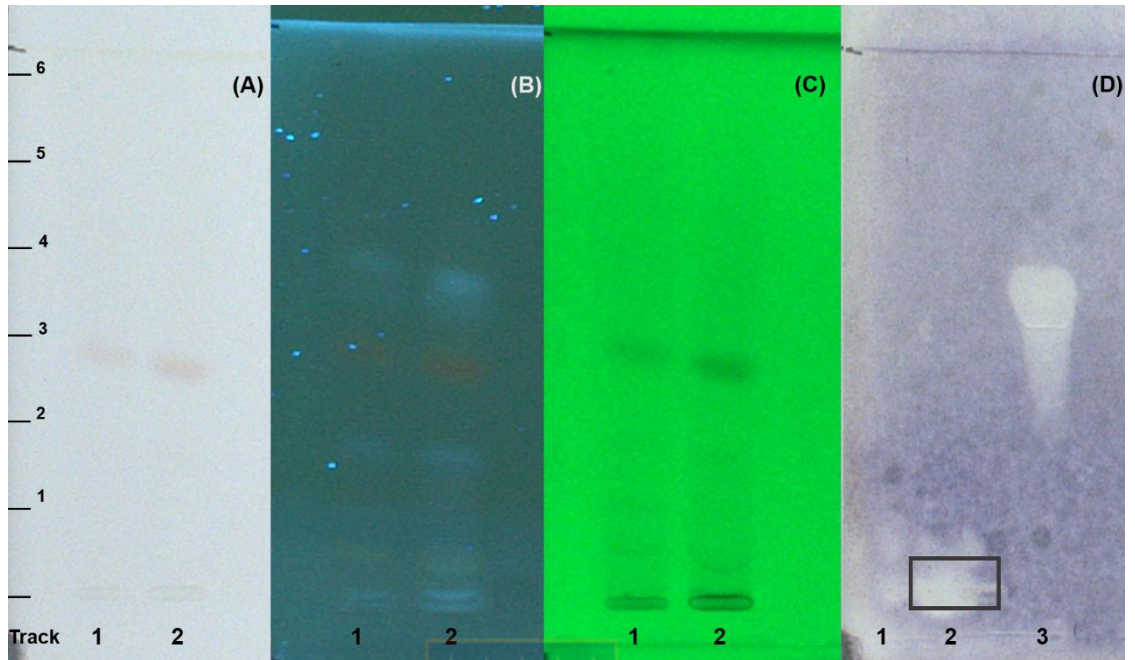


Figura 5-7. Cromatograma HPTLC de extracto de frutilla, volumen de sembrado 3 y 5 μL en silica gel 60 F_{254} utilizando como fase móvil etilacetato/2-butanona/ácido fórmico/agua ultra pura (49,3:35,2:8,5:7 v/v/v/v). Foto-documentación bajo luz blanca (A), foto-documentación a 366 nm (B), foto-documentación a 254 nm (C), bioautografía HPTLC-*Bacilo subtilis*, control positivo oxitetraciclina 6 μL track 3, foto-documentado bajo luz blanca (D)

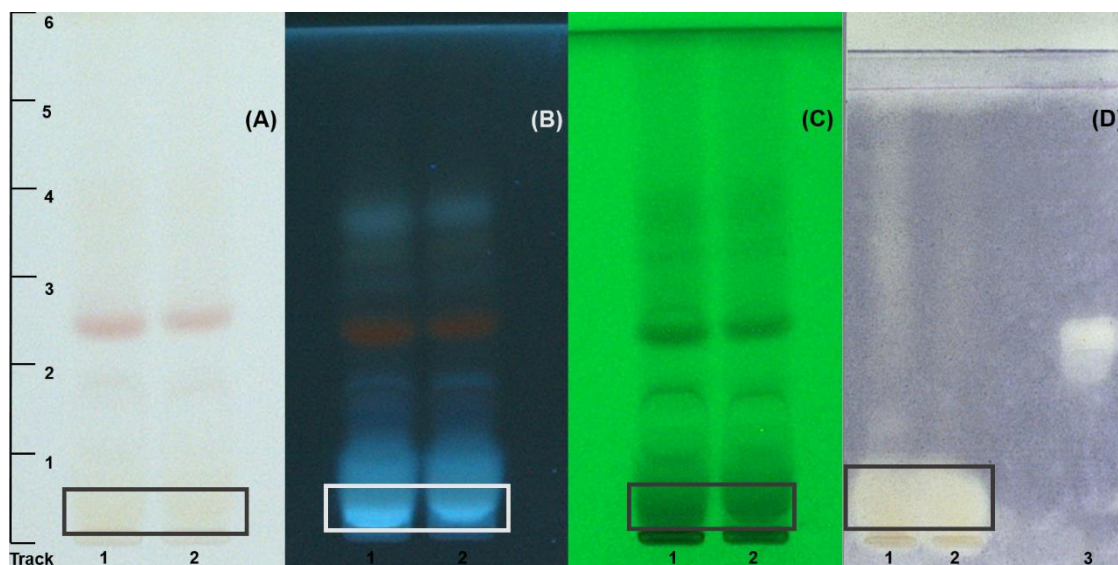


Figura 5-8. Cromatograma HPTLC de extracto de frutilla, volumen de sembrado 13 y 15 μL en silica gel 60 F₂₅₄ utilizando como fase móvil etilacetato/2-butanona/ácido fórmico/agua ultra pura (49,3:35,2:8,5:7 v/v/v/v). Foto-documentación bajo luz blanca (A), foto-documentación a 366 nm (B), foto-documentación a 254 nm (C), bioautografía HPTLC-*Bacilo subtilis*, control positivo oxitetraciclina 6 μL track 3, foto-documentado bajo luz blanca (D)

5.7.3 Capacidad antioxidante. DPPH

El ensayo de capacidad antioxidante se observa en la figura 5-9.D, en el cual se puede apreciar una serie de compuestos antioxidantes, los que presentan R_f 0,2, 0,31, 0.34 y 0,58. La capacidad antioxidante del extracto de frutilla fue comprobada previamente a través de ensayos por microplaca, el aporte de cada compuesto al poder antioxidante del extracto es de interés para posteriormente identificar estos compuestos. El poder antioxidante de la frutilla, según Nowicka

et al. (2019), Basu (2014) y Fierascu (2020), está asociado principalmente a derivados de elagitaninos y procianidinas.

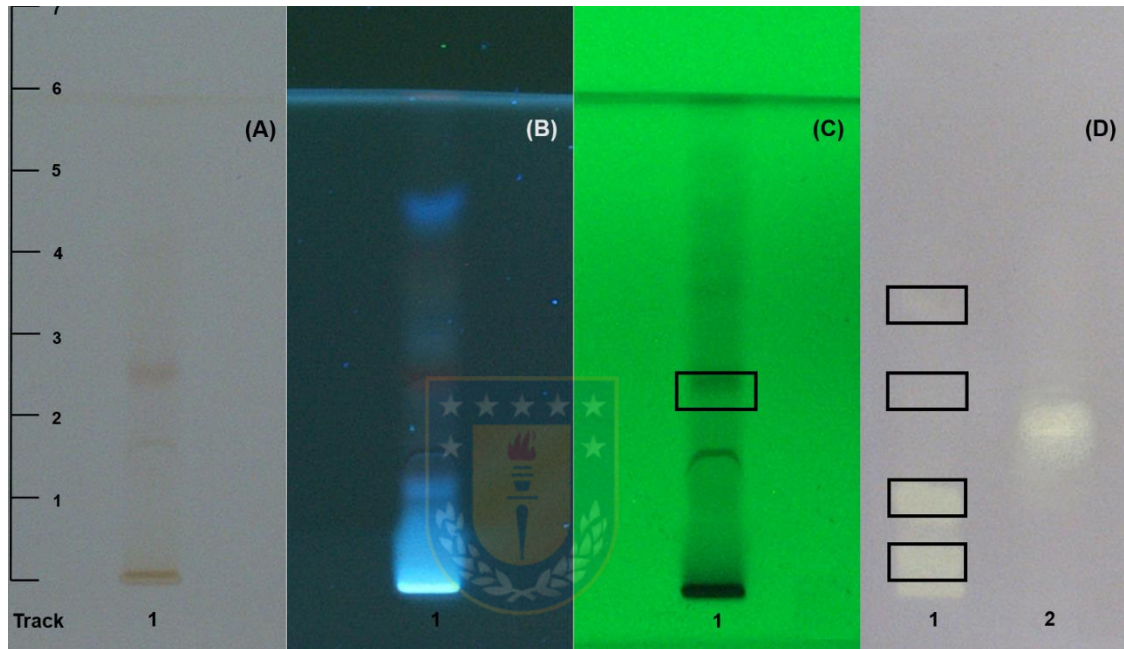


Figura 5-9. Cromatograma HPTLC de extracto de frutilla en silica gel 60 F₂₅₄ utilizando como fase móvil etilacetato/tolueno/ácido fórmico/metanol/agua ultra pura (50:18:12:12:12 v/v/v/v/v). Foto-documentación bajo luz blanca (A), foto-documentación a 366 nm (B), foto-documentación a 254 nm (C), Capacidad Antioxidante por DPPH, control positivo acido gálico 5 µL track 3, foto-documentado bajo luz blanca (D)

6. CONCLUSIONES

Con respecto a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos se concluye que la muestra de frutilla estudiada presenta características bromatológicas similares a las reportadas en bibliografía y se destaca que frente a otras frutas dentro del grupo de los frutos rojos contiene menos carbohidratos totales. Por otro lado la optimización del proceso MAE mediante la utilización de un diseño de experimentos central compuesto (DCC), en la cual se obtuvo como condiciones óptimas: 60,0 % v/v de etanol, 7,0 minutos y 45,5° C permitió reducir el tiempo de extracción aproximadamente en un 91 % y el volumen de solvente de extracción en un 95%, obteniendo además un extracto con un mayor poder antioxidante, promoviendo la utilización de técnicas de extracción verdes. El extracto obtenido de la optimización demostró, gracias a la plataforma HPTLC-Bioensayo, poseer compuestos con capacidad antioxidante, actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa y *Bacillus subtilis*.

De esta manera se acepta la hipótesis de que la frutilla contiene compuestos bioactivos potencialmente beneficiosos para enfermedades crónicas no transmisibles, demostrable mediante HPTLC-Bioensayo.

A pesar de esto, como proyección de este trabajo se sugiere realizar una comparación de los perfiles de polifenoles en los extractos obtenidos por maceración y microondas. Optimizar la separación de los compuestos y realizar ensayos para dilucidar la estructura química de estos compuestos lo que

permitiría el estudio a profundidad de la actividad de estos compuestos puros. Además de estudiar el efecto tanto del extracto como de los compuestos en experimentos *in vivo* para corroborar su funcionalidad.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Aaby, K., Ekeberg, D., Skrede, G. (2007). Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*, 55(11), 4395-4406. doi: 10.1021/jf0702592
- Amarowicz, Ryszard, Pegg, Ronald B. (2019). Chapter One - Natural antioxidants of plant origin. In I. C. F. R. Ferreira & L. Barros (Eds.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 90, pp. 1-81): Academic Press.
- American Diet Association, ADA. (1999). Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(10), 1278-1285. doi: /10.1016/S0002-8223(99)00314-4
- AOAC. (2012). In G. Latimer (Ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC International*. (19th edition ed.). Gaithersburg, Maryland, USA: AOAC International.
- Araya L, Héctor, & Lutz R, Mariane. (2003). Alimentos Funcionales y Saludables. *Revista chilena de nutrición*, 30, 8-14.
- Arvindekar, A. U., & Laddha, K. S. (2016). An efficient microwave-assisted extraction of anthraquinones from *Rheum emodi*: Optimisation using RSM, UV and HPLC analysis and antioxidant studies. *Industrial Crops and Products*, 83, 587-595.
- Baez, Evelio; Quiñones, Janet; Santiesteban-Toca, Cosme E.; Molina-Torres, Jorge. (2017). Analysis System of HPTLC plate images. *11*, 92-104.
- Basu, Arpita; Nguyen, Angel; Betts, Nancy; J Lyons, Timothy. (2014). *Strawberry As a Functional Food: An Evidence-Based Review* (Vol. 54).
- Battino, Maurizio; Beekwilder, Jules; Denoyes, Béatrice; Laimer, Margit; McDougall, Gordon; Mezzetti, Bruno. (2009). *Bioactivities of berries relevant to human health* (Vol. 67 Suppl 1).
- Bräm, Sarah, & Wolfram, Evelyn. (2017). *Recent Advances in Effect-directed Enzyme Assays based on Thin-layer Chromatography* (Vol. 28).
- Cárdenas-Valdovinos, Jeanette Guadalupe, Oyoque-Salcedo, Guadalupe, Loeza-Lara, Pedro Damián, Oregel-Zamudio, Ernesto, Angoa-Pérez, María Valentina, & Mena-Violante, Hortencia Gabriela. (2018). Antibacterial potential of anthocyanic extracts of strawberry on *Staphylococcus aureus* associated to bovine mastitis. *Acta universitaria*, 28, 52-57.
- Colvin, Domnic. (2018). A Review on Comparison of the Extraction Methods Used in Licorice Root: Their Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 07. doi: /10.4172/2167-0412.1000323
- Crozier, A., Jaganath, I., Clifford M. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*, 26(8), 1001-1043.

- Chatterjee, Sudesna, Khunti, Kamlesh, & Davies, Melanie J. (2017). Type 2 diabetes. *The Lancet*, 389(10085), 2239-2251. doi: /10.1016/S0140-6736(17)30058-2
- Daglia, Maria. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174-181. doi: /10.1016/j.copbio.2011.08.007
- De Monte, C., Carradori, S., Granese, A., Battista Di Pierro, G., Leonardo, C., & De Nunzio, C. (2014). Modern extraction techniques and their impact on the pharmacological profile of *Serenoa repens* extracts for the treatment of lower urinary tract symptoms. *BMC urology*, 14, 63-63. doi: /10.1186/1471-2490-14-63
- Demain, Arnold L. (2009). Antibiotics: Natural products essential to human health. *Medicinal Research Reviews*, 29(6), 821-842. doi: /10.1002/med.20154
- Durán C, Rodrigo, & Valenzuela B, Alfonso. (2010). La Experiencia Japonesa con los Alimentos Funcionales FOSHU: ¿Los Verdaderos alimentos funcionales? *Revista chilena de nutrición*, 37, 224-233.
- Elejalde Guerra, J.I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18, 50-59.
- Fierascu, R. C.; Temocico, G.; Fierascu, I.; Ortan, A.; Babeanu, N. E. (2020). *Fragaria* Genus: Chemical Composition and Biological Activities. *Molecules*, 25(3). doi: /10.3390/molecules25030498
- Fuentes G, Patricio, & Slachevsky Ch, Andrea. (2005). Enfermedad de Alzheimer: Actualización en terapia farmacológica. *Revista médica de Chile*, 133, 224-230.
- Galarce-Bustos, O., Pavón, J., Henríquez-Aedo, K., Aranda, M. (2019). Detection and identification of acetylcholinesterase inhibitors in *Annona cherimola* Mill. by effect-directed analysis using thin-layer chromatography-bioassay-mass spectrometry. *Phytochem Anal*, 30(6), 679-686. doi: /10.1002/pca.2843
- Gomes, Fernanda, Martins, Natália, Barros, Lillian, Rodrigues, Maria Elisa, Oliveira, M. Beatriz P. P., Henriques, Mariana, & Ferreira, Isabel C. F. R. (2018). Plant phenolic extracts as an effective strategy to control *Staphylococcus aureus*, the dairy industry pathogen. *Industrial Crops and Products*, 112, 515-520. doi: /10.1016/j.indcrop.2017.12.027
- Houck, Max M., & Siegel, Jay A. (2015). Chapter 6 - Separation Methods. In M. M. Houck & J. A. Siegel (Eds.), *Fundamentals of Forensic Science (Third Edition)* (pp. 121-151). San Diego: Academic Press.
- INTA. (2013). (ORAC) Base de Datos de Actividad Antioxidante y de Contenido de Polifenoles Totales (PFT) en Frutas. Retrieved Junio, 2020, from <http://www.portalantioxidantes.com/orac-base-de-datos-actividad-antioxidante-y-contenido-de-polifenoles-totales-en-frutas/>
- Jamshidi-Aidji, Maryam, & Morlock, Gertrud E. (2015). Bioprofiling of unknown antibiotics in herbal extracts: Development of a streamlined direct bioautography using *Bacillus subtilis* linked to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1420, 110-118. doi: /10.1016/j.chroma.2015.09.061

- Kalia, K., Sharma, K., Harsh Pratap, S., Bikram, S. (2008). Effects of Extraction Methods on Phenolic Contents and Antioxidant Activity in Aerial Parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and Quantification of Its Phenolic Constituents by RP-HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10129-10134. doi: 10.1021/jf802188b
- Kamila Borowiec, D. S., & Zapp, J. (2019). Activity-guided purification reveals quercetin as the most efficient cholinesterase inhibitor in wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit extract. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(5), 386-394. doi: /10.9755/ejfa.2019.v31.i5.1957
- Li, Y., Li, S., Lin, S. J., Zhang, J. J., Zhao, C. N., & Li, H. B. (2017). Microwave-Assisted Extraction of Natural Antioxidants from the Exotic *Gordonia axillaris* Fruit: Optimization and Identification of Phenolic Compounds. *Molecules*, 22(9). doi: /10.3390/molecules22091481
- Lopez-Avila, V. (2000). EXTRACTION | Microwave-Assisted Extraction. In I. D. Wilson (Ed.), *Encyclopedia of Separation Science* (pp. 1389-1398). Oxford: Academic Press.
- Lutz R, Mariane. (2012). ¿Podemos Hablar de Alimentos Funcionales en Chile? *Revista chilena de nutrición*, 39, 211-216.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727
- Marston, A., Kissling, J., & Hostettmann, K. (2002). A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*, 13(1), 51-54. doi: 10.1002/pca.623
- McGleenon, B. M., Dynan, K. B., & Passmore, A. P. (1999). Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol*, 48(4), 471-480. doi: 10.1046/j.1365-2125.1999.00026.x
- National Pollutant Inventory, NPI. (s.f.). Substance fact sheets. 2020, from <http://www.npi.gov.au/substances/fact-sheets>
- Nikolin, B., Imamović, B., Medanhodžić-Vuk, S., & Sober, M. (2004). High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. *Bosn J Basic Med Sci*, 4(2), 5-9. doi: 10.17305/bjbms.2004.3405
- Nohynek, Liisa J., Alakomi, Hanna-Leena, Kähkönen, Marja P., Heinonen, Marina, Helander, Ilkka M., Oksman-Caldentey, Kirsi-Marja, & Puupponen-Pimiä, Riitta H. (2006). Berry Phenolics: Antimicrobial Properties and Mechanisms of Action Against Severe Human Pathogens. *Nutrition and Cancer*, 54(1), 18-32. doi: 10.1207/s15327914nc5401_4
- Nowicka, Agnieszka, Kucharska, Alicja Z., Sokół-Łętowska, Anna, & Fecka, Izabela. (2019). Comparison of polyphenol content and antioxidant capacity of strawberry fruit from 90 cultivars of *Fragaria × ananassa* Duch. *Food Chemistry*, 270, 32-46. doi: /10.1016/j.foodchem.2018.07.015

- OMS, Organización Mundial de la Salud. (2018). Noncommunicable Diseases Country Profiles 2018 (pp. 1-64): Organización Mundial de la Salud.
- Organización Mundial de la Salud, OMS. (2003). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Informe de Una Consulta Mixta de Expertos (pp. 1–86.): Organización Mundial de la Salud.
- Ortiz, Rocío, Antilén, Mónica, Speisky, Hernán, Aliaga, Margarita E., López-Alarcón, Camilo, & Baugh, Steve. (2012). Application of a Microplate-Based ORAC-Pyrogallol Red Assay for the Estimation of Antioxidant Capacity: First Action 2012.03. *Journal of AOAC International*, 95(6), 1558-1561. doi: 10.5740/jaoacint.CS2012_03
- Ou, Boxin, Hampsch-Woodill, Maureen, & Prior, Ronald L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626. doi: 10.1021/jf010586o
- Pefaur Lepe, Javiera (2014). *El mercado de las frutillas*. www.odepa.gob.cl.
- Poole, Colin F. (2020). Chapter 1 - Milestones in the Development of Liquid-Phase Extraction Techniques. In C. F. Poole (Ed.), *Liquid-Phase Extraction* (pp. 1-44): Elsevier.
- Quiñones, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27, 76-89.
- Reitz, Christiane, Brayne, Carol, & Mayeux, Richard. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 7(3), 137-152. doi: 10.1038/nrneurol.2011.2
- Routray, Winny, & Orsat, Valérie. (2012). Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 409-424. doi: 10.1007/s11947-011-0573-z
- Sánchez-Valle V, Méndez-Sánchez N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Med Sur*, 20(3), 161-168.
- Setyaningsih, W., Saputro, I. E., Palma, M., Barroso, C. G. (2015). Optimisation and validation of the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. *Food Chemistry*, 169, 141-149. doi: /10.1016/j.foodchem.2014.07.128
- Shukitt-Hale, Barbara, Lau, Francis C., & Joseph, James A. (2008). Berry Fruit Supplementation and the Aging Brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 636-641. doi: 10.1021/jf072505f
- Singleton, V.L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic and phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Song, Jiangfeng; Li, Dajing; Liu, Chunquan; Zhang, Ying. (2011). Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from Ipomoea batatas leaves and its antioxidant activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3), 282-287. doi: /10.1016/j.ifset.2011.03.001

- Sparr Eskilsson, Cecilia, & Björklund, Erland. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250. doi: /10.1016/S0021-9673(00)00921-3
- Speisky, H., Lopez-Alarcon, C., Gomez, M., Fuentes, J., Sandoval-Acuna, C. (2012). First web-based database on total phenolics and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of fruits produced and consumed within the south Andes region of South America. *J Agric Food Chem*, 60(36), 8851-8859. doi: /10.1021/jf205167k
- Teh, Sue-Siang, & Morlock, Gertrud. (2015). *Analysis of Bioactive Components of Oilseed Cakes by High-Performance Thin-Layer Chromatography-(Bio)assay Combined with Mass Spectrometry* (Vol. 2).
- Theocharis, G., & Andlauer, W. (2013). Innovative microwave-assisted hydrolysis of ellagitannins and quantification as ellagic acid equivalents. *Food Chemistry*, 138(4), 2430-2434. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.12.015
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. . (2019). FoodData Central fdc.nal.usda.gov. Retrieved Abril, 2019, from fdc.nal.usda.gov.
- Urrieta, Carlos. (1933). *Diccionario de Medicación Herbaria*. Santiago, Chile: Editorial Nacimiento.
- Valenzuela B, Alfonso, Valenzuela, Rodrigo, Sanhueza, Julio, & Morales I, Gladys. (2014). Alimentos funcionales, nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Revista chilena de nutrición*, 41, 198-204.
- Zhang, Xuesong, Rajagopalan, Kishore, Lei, Hanwu, Ruan, Roger, & Sharma, Brajendra K. (2017). An overview of a novel concept in biomass pyrolysis: microwave irradiation. *Sustainable Energy & Fuels*, 1(8), 1664-1699. doi: 10.1039/C7SE00254H
- Zhao, Cai-Ning, Zhang, Jiao-Jiao, Li, Ya, Meng, Xiao, & Li, Hua-Bin. (2018). Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Melastoma sanguineum* Fruit: Optimization and Identification. *Molecules*, 23, 2498. doi: 10.3390/molecules23102498

8. ANEXOS

Composición química de Frutilla

Nutriente	Unidad	Valor por 100 g
Agua	g	90,95
Energía	kcal	32
Proteína	g	0,67
Total Lípidos	g	0,3
Carbohidratos	g	7,68
Fibra	g	2
Azúcar total	g	4,89
Minerales	Unidad	Valor por 100 g
calcio	mg	16
Fierro	mg	0,41
Magnesio	mg	13
Fosforo	mg	24
Potasio	mg	153
Sodio	mg	1
Zinc	mg	0,14
Vitaminas	Unidad	Valor por 100 g
Ácido Ascórbico	mg	58,8
Tiamina	mg	0,024
Riboflavina	mg	0,022
Niacina	mg	0,386
Vitamina B6	mg	0,047
Folato	ug	24
Vitamina A	ug	1
Vitamina E	mg	0,29
Vitamina K	ug	2,2
<i>National Nutrient Database for Standard Reference Legacy (U.S. Department of Agriculture, 2019)</i>		