

CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE MORA (*Rubus glaucus* Benth) OBTENIDOS BAJO DIFERENTES CONDICIONES

CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF BLACKBERRY (*Rubus glaucus* Benth) EXTRACTS OBTAINED UNDER DIFFERENT CONDITIONS

Jennifer PILAR ROJAS-Llanes, Magíster en Química, Jairo René MARTÍNEZ, Ph.D., Elena E. STASHENKO*, Ph.D.

Recibido: Marzo 11 de 2014. Aceptado: Septiembre 18 de 2014

RESUMEN

Antecedentes: La mora contiene compuestos fenólicos que contribuyen a su capacidad antioxidante. El método más común para aislar estas sustancias es la extracción con solventes, que puede asistirse con ultrasonido para aumentar el contenido de analitos extraídos. **Objetivos:** Determinar las condiciones de tipo y concentración de solvente en agua, y de tiempo de extracción asistida con ultrasonido, con las cuales se obtiene el mayor contenido de compuestos fenólicos y el valor de capacidad antioxidante más alto en extractos de mora andina (*Rubus glaucus* Benth). Comparar la capacidad antioxidante de los extractos de mora con la de antioxidantes de referencia como el di-*tert*-butilhidroxitolueno (BHT) y el α -tocoferol. **Métodos:** Se hicieron tres diseños de experimentos de dos factores con tres niveles cada uno. Las variables fueron la concentración de acetona, etanol o metanol en agua y el tiempo de extracción asistida con ultrasonido. Los observables-respuesta fueron el contenido total de compuestos fenólicos, que se determinó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, y la capacidad antioxidante, determinada mediante el ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno). Se calculó el coeficiente de correlación entre las dos variables de respuesta. Se comparó la capacidad antioxidante de los extractos de mora, obtenidos bajo las condiciones inferidas como óptimas, con las del BHT y del α -tocoferol. **Resultados:** Los extractos adquiridos con soluciones acuosas de acetona al 31% (v/v), asistiendo la extracción con ultrasonido durante 100 min, mostraron los mayores contenidos de compuestos fenólicos (30 ± 1 mg ácido gálico/g mora seca), y los valores de capacidad antioxidante más altos (273 ± 6 mmol Trolox[®]/g mora seca). El coeficiente de correlación entre las dos variables de respuesta fue 0,92. Los extractos de mora presentaron mejor capacidad antioxidante que el BHT y el α -tocoferol. **Conclusiones:** Bajo las condiciones óptimas de extracción, con las soluciones acuosas de acetona se obtuvieron el mayor contenido de compuestos fenólicos y el valor de capacidad antioxidante más alto. Se observó una relación lineal entre las dos variables de respuesta. Los extractos de mora, obtenidos bajo las mejores condiciones halladas, presentaron mayor capacidad antioxidante en comparación con la de los compuestos de referencia analizados.

Palabras clave: Mora andina, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, ORAC, ultrasonido.

¹ Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS. Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM. Universidad Industrial de Santander. Carrera 27, Calle 9, edificio 45. Bucaramanga, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: elenastashenko@gmail.com

ABSTRACT

Background: Blackberry contains phenolic compounds that contribute to their antioxidant capacity. The most common method used to isolate these substances is the conventional solvent extraction, which can be assisted by ultrasound in order to increase the content of extracted analyte. **Objectives:** Determining the conditions of solvent type and concentration, and ultrasound-assisted extraction time, under which the highest content of phenolic compounds and antioxidant capacity are obtained, in Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth) extracts. To compare the antioxidant capacity of blackberry extracts with those of reference antioxidants, such as di-*tert*-butylhydroxytoluene (BHT) and α -tocopherol. **Methods:** Three experimental designs, of two factors with three levels, were done to provide the data for the analysis of variance. Variables were the acetone, ethanol or methanol concentration in water and the duration of ultrasound-assisted extraction. The response variables were the total content of phenolic compounds, which was determined with the Folin-Ciocalteu reagent and the antioxidant capacity, measured by ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay. The correlation coefficient between the two response variables was calculated. The blackberry extracts' antioxidant capacity, obtained under isolation conditions inferred as optimal was compared with those of BHT and α -tocopherol. **Results:** Extracts obtained with an aqueous solution of 31% acetone (v/v), performing ultrasound-assisted extraction for 100 min, showed the highest content of phenolic compounds (30 ± 1 mg gallic acid/g dry blackberry), and antioxidant capacity (273 ± 6 μ mol Trolox[®]/g dry blackberry). The correlation coefficient between the total phenolic compounds content and antioxidant capacity was 0.92. Blackberry extracts presented higher antioxidant capacity than BHT and α -tocopherol. **Conclusions:** Under optimum conditions of extraction, the aqueous solutions of acetone afforded the highest content of phenolic compounds and highest antioxidant capacity value. There was a linear relationship between the two response variables analyzed. Blackberry extracts, under the improved conditions found, presented higher antioxidant capacity than the reference compounds analyzed.

Keywords: Andean blackberry, phenolic compounds, antioxidant capacity, ORAC, ultrasound.

INTRODUCCIÓN

La mora (familia Rosaceae, género *Rubus*) es una fruta distribuida a nivel mundial. Se cosechan tanto especies nativas como cultivares mejorados (1). La mora andina, o mora de Castilla (*R. glaucus* Benth), es nativa de las zonas tropicales de América, principalmente, Colombia y Ecuador (2), y se distingue por su color rojo oscuro y sabor (3). La mora de Castilla posee capacidad antioxidante, atribuida a su contenido de compuestos fenólicos (4-5).

La extracción con solventes es el método más común para aislar compuestos fenólicos de diferentes matrices. Los medios extractantes más usados son soluciones acuosas de acetona, etanol y metanol (6). Los solventes orgánicos pueden removerse del extracto por rotoevaporación. Varios factores tales como el tipo y la concentración de solvente, y el tiempo de extracción, contribuyen a la eficiencia de la técnica y, de esta manera, a la bioactividad de los extractos (7).

Uno de los inconvenientes de la extracción con solventes es el tiempo requerido (7), motivo por el

cual la extracción puede ser asistida por ultrasonido (8), radiación de microondas (9) y métodos enzimáticos (10). El ultrasonido es una tecnología económica y sencilla (11) que mejora el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos, con menores temperaturas y tiempos que los requeridos en la extracción convencional con solventes (12-13). Las microcorrientes fluídicas que genera resultan en una mayor penetración del solvente en el material vegetal (14).

Por lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron determinar las condiciones de tipo y concentración de solvente en agua y de tiempo de extracción asistida con ultrasonido, bajo las cuales se obtenga el mayor contenido de compuestos fenólicos y el valor de capacidad antioxidante más alto en extractos de mora de Castilla. Así mismo, comparar la capacidad antioxidante de los extractos, obtenidos bajo las mejores condiciones, con las del di-*tert*-butilhidroxitolueno (BHT) y del α -tocoferol, antioxidantes utilizados ampliamente en productos para el consumo humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La mora de Castilla (12,5 kg), adquirida en la Central de Abastos de Bucaramanga-Colombia, se licuó, se secó en un liofilizador de bandejas *VirTis Advantage Plus* (Gardiner, New York, EE.UU.) y se almacenó a temperatura ambiente (24°C), bajo ausencia de luz, hasta su extracción con solventes. El índice de madurez de la mora utilizada, determinado según la Norma Técnica Colombiana 4106 (15), fue 2,2; valor que representa un grado de maduración 4, en una escala de 1-6.

Reactivos

Se utilizaron acetona (99,9%), etanol (99,9%) y metanol (99,9%), reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N, bifosfato de potasio (99%), hidróxido de sodio (99%) y ácido clorhídrico (37%), adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). El clorhidrato de 2,2'-azo-bis-(2-amidino-propano) (AAPH) (98%), el Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico) (97%), la fluoresceína [benzoato disódico de 2-(3-oxo-6-óxido-3H-xanten-9-il)] (99%), el ácido gálico (99%), el BHT y el (\pm)- α -tocoferol se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Todas las soluciones se prepararon con agua tipo I, producida por un equipo purificador *Millipore* (Molsheim, Francia).

Diseño de experimentos

Selección de factores y niveles

Se evaluaron los efectos de agua, acetona, etanol y metanol, y de soluciones acuosas de estos solventes orgánicos (25, 50 y 75%, v/v), sobre el contenido total de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla. Para esto, se pesó mora liofilizada (0,50 g), se adicionó el solvente a evaluar (10 mL), y se dispuso la suspensión en un baño de ultrasonido (*Elmasonic S15H*, Singen, Alemania), de 37 kHz de frecuencia y 35 W de potencia ultrasónica efectiva, durante 2 min. Se separó el residuo por filtración (papel filtro *Whatman* No. 1) y se extrajo dos veces más (en total 30 mL de solvente y 6 min de extracción). Se utilizaron los solventes con los cuales se lograron los mejores resultados en el análisis anterior, para obtener extractos a 3, 30, 60, 90, 120 y 150 min, con y sin ultrasonido. Los extractos se almacenaron, a 4

°C, bajo ausencia de luz, hasta la determinación del contenido de compuestos fenólicos y de capacidad antioxidante.

Análisis estadístico de datos

Todos los experimentos se hicieron por triplicado y los resultados se expresaron como el valor medio \pm la desviación estándar. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de los resultados y se determinaron sus diferencias honestamente significativas (HSD, por sus siglas en inglés), mediante la prueba de Tukey, a un nivel de confianza del 95%.

Con base en los resultados obtenidos en las pruebas anteriores, se escogieron los factores y niveles para la realización de los diseños de experimentos. Las variables de respuesta fueron el contenido total de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante. Se realizó el ANOVA de los resultados obtenidos con los diseños experimentales y, mediante regresión lineal múltiple, se formularon modelos polinómicos para predecir las variables de respuesta. Se compararon los errores de predicción obtenidos con seis polinomios de primer y segundo orden y se escogió el polinomio que proporcionó el mejor ajuste, de acuerdo con la determinación de la raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE, por sus siglas en inglés) y del coeficiente de determinación (R^2). Se realizó validación cruzada mediante la aleatorización reiterativa de la distribución de los datos entre los conjuntos de calibración y de validación, para determinar los coeficientes de las ecuaciones de los modelos. Se elaboraron gráficas de contorno con los modelos obtenidos, mediante el uso del *software STATISTICA release 8*.

Confirmación de los puntos predichos como óptimos

Se hicieron extracciones, por triplicado, bajo las condiciones predichas como óptimas según las gráficas de contorno de los modelos, y se procedió a determinar su contenido de compuestos fenólicos y de capacidad antioxidante.

Determinación del contenido total de compuestos fenólicos

Se determinó el contenido total de compuestos fenólicos, utilizando el reactivo de Folin y Ciocalteu, 1927 (16), y un método estandarizado en nuestro centro de investigación, con base en el procedimiento publicado por Magalhaes *et al.*, 2006 (17).

Se utilizó un lector de placas *Turner Biosystems Inc., Modulus™ II. Microplate Multimode Reader* (Sunnyvale, CA, EE.UU.), que opera en la región visible del espectro electromagnético, equipado con placas de poliestireno de 96 pozos. Se prepararon una solución del reactivo de Folin-Ciocalteu (2 N) en agua tipo I, (1:4 v/v), y una solución acuosa de hidróxido de sodio 0,35 M. Los extractos se diluyeron en agua (10x). En cada pozo de la placa, se depositaron muestra diluida (50 µL), solución del reactivo de Folin-Ciocalteu (50 µL) y solución de hidróxido de sodio (100 µL). La absorbancia se midió a 750 nm, a 25°C. El equipo leyó la placa de 96 pozos cada 2 min durante 30 min. Se graficó la absorbancia versus el tiempo en el que se hizo cada lectura. El valor utilizado, para el análisis de resultados, fue aquel en el que la absorbancia alcanzó su estado estacionario. Para realizar la curva de calibración se usó ácido gálico como sustancia patrón. La concentración de compuestos fenólicos se expresó como mg de ácido gálico/g de mora seca (mg AG/g PS). Cada medición se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como el valor promedio \pm la desviación estándar.

Determinación de la capacidad antioxidante

Se determinó la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), utilizando el método de Ou *et al.*, 2001 (18), con algunas modificaciones. Los extractos se diluyeron (50x) en *buffer* fosfato (75 mM, pH 7,4), y, en cada pozo de la placa se depositaron extracto diluido (25 µL) y solución de fluoresceína (150 µL, $8,16 \times 10^{-5}$ mM, en *buffer* fosfato); se incubaron a 37°C, durante 20 min, y se agregó la solución de AAPH (25 µL, 153 mM, en *buffer* fosfato). La fluorescencia se midió con longitudes de onda de excitación de 490 nm y de emisión de 510 nm, durante 90 min, a 37°C. Para realizar los blancos, la muestra (25 µL) se reemplazó por *buffer* fosfato. La capacidad antioxidante se determinó a partir de la diferencia entre el área bajo la curva de fluorescencia (ABC), de cada muestra, y el ABC del blanco. Para calcular los mmol Trolox®/g de mora seca (mmol Trolox®/g PS), previa realización de una curva de calibración con Trolox® (análogo hidrosoluble de la vitamina E), se utilizó el área neta obtenida. Cada medición se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como el valor promedio \pm la desviación estándar.

RESULTADOS

La figura 1 ilustra los resultados de contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla obtenidos en la primera serie de experimentos, en los que se varió el solvente y se utilizó el mismo tiempo de extracción (6 min). Los extractos adquiridos con soluciones acuosas de acetona al 25% (v/v) tuvieron el mayor contenido de compuestos fenólicos, y el valor de capacidad antioxidante más alto. No se observaron diferencias significativas con las soluciones al 50%. Entre las soluciones acuosas de etanol y metanol no se observaron diferencias significativas y, con estos solventes, los mejores resultados se lograron con soluciones al 50%. Los resultados más bajos se obtuvieron cuando se utilizaron los solventes orgánicos al 100%.

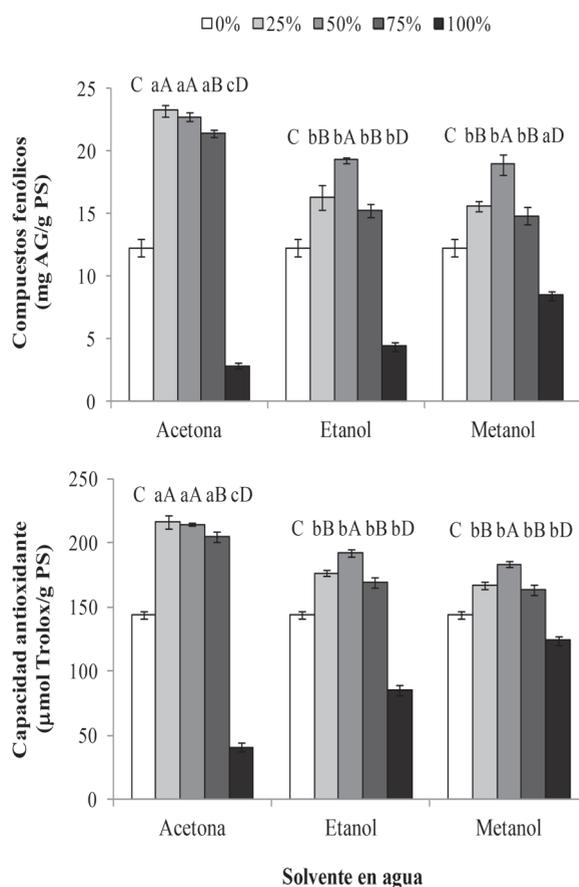


Figura 1. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla obtenidos con diferentes solventes, durante 6 min. Cada extracción se hizo por triplicado. Distintas letras, minúsculas o mayúsculas, indican diferencias significativas ($p < 0,050$), según la prueba de Tukey,

entre los solventes de extracción o entre los porcentajes de cada solvente en agua, respectivamente.

Con base en los resultados mostrados en la figura 1, se utilizaron soluciones acuosas de acetona al 25%, y de etanol y metanol al 50%, para evaluar los efectos del tiempo de extracción, con y sin ultrasonido, sobre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla. En todos los ensayos, se obtuvieron mejores resultados cuando las extracciones se asistieron con ultrasonido y, a partir de los 90 min no se observaron diferencias significativas (figura 2).

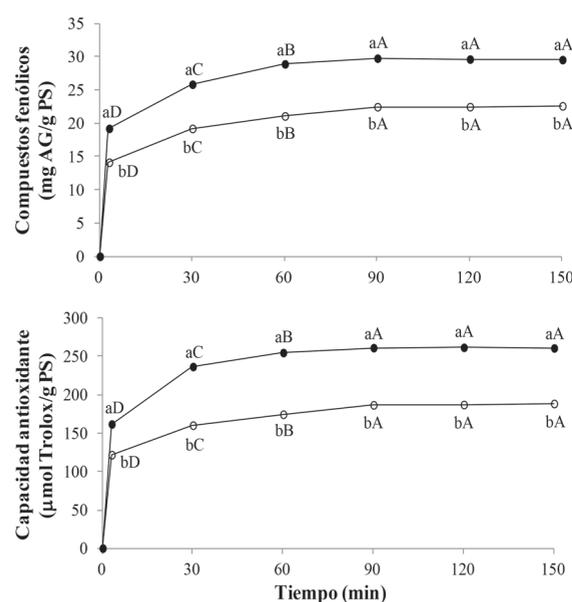


Figura 2. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla obtenidos con soluciones acuosas de acetona (25%, v/v) durante diferentes tiempos de extracción con (●) y sin (○) ultrasonido. Distintas letras minúsculas representan diferencias significativas ($p < 0,050$), según el ANOVA, entre los tratamientos con y sin ultrasonido. Distintas letras mayúsculas representan diferencias significativas ($p < 0,050$), según la prueba de Tukey, entre los tiempos de extracción.

Con el propósito de evaluar, simultáneamente, el efecto del porcentaje de solvente en agua y del tiempo de extracción asistida con ultrasonido, se hicieron diseños de experimentos (factoriales, 3^2)

con soluciones acuosas de acetona, etanol y metanol. Los niveles se escogieron de acuerdo con los resultados mostrados en las figuras 1 y 2. En el caso de la acetona, los niveles para el porcentaje de solvente en agua fueron 10, 25 y 40% (v/v). En los casos del etanol y metanol, los niveles fueron 25, 50 y 75% (v/v). Los niveles para el tiempo de extracción fueron 30, 60 y 90 min, con los tres solventes.

En las tablas 1-3 se incluyen los modelos polinómicos, que presentaron el error de predicción más bajo (menor RMSE, mayor R^2) para el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla, adquiridos con soluciones acuosas de acetona (tabla 1), etanol (tabla 2) y metanol (tabla 3). Los datos de contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante obtenidos en los diseños de experimentos no se muestran pero están disponibles para los interesados. En todos los casos, el polinomio de segundo orden respecto a A (porcentaje de solvente en agua) y a B (tiempo de extracción asistida con ultrasonido) proporcionó el mejor ajuste. También, se presenta en las tablas 1-3 el valor óptimo proyectado según las gráficas de contorno para cada uno de estos observables, junto con el valor experimental hallado para las condiciones predichas como óptimas.

Tabla 1. Modelos establecidos por los diseños de experimentos, para la obtención de extractos de mora de Castilla, con soluciones acuosas de acetona.

Parámetro del modelo	Contenido de compuestos fenólicos (mg AG/g PS)	ORAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g PS)
Ecuación	$6,1 + 1,2A + 0,08B - 0,02A^2 - 0,0002B^2$	$95,67 + 7,42A + 0,76B - 0,12A^2 - 0,0024B^2$
R^2	0,97	0,99
RMSE	0,60	0,36
Condiciones de extracción óptimas según gráficas de contorno	A = 30; B = 100	A = 31; B = 100
Valor óptimo	Según gráficas de contorno	262
	Experimental*	30 ± 1

AG: Ácido gálico. PS: Peso seco de mora. A: Porcentaje de acetona en agua (v/v). B: Tiempo de ultrasonido (min). R^2 : coeficiente de determinación. RMSE: raíz cuadrada del error cuadrático medio. *Valor medio \pm desviación estándar ($n = 3$).

Tabla 2. Modelos establecidos por los diseños de experimentos, para la obtención de extractos de mora de Castilla, con soluciones acuosas de etanol.

Parámetro del modelo	Contenido de compuestos fenólicos (mg AG/g PS)	ORAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g PS)
Ecuación	$12,704 + 0,262A + 0,113B - 0,00300A^2 - 0,000472B^2$	$148,407 + 2,595A + 0,163B - 0,0279A^2 + 0,00281B^2$
R ²	0,98	0,99
RMSE	0,041	0,23
Condiciones de extracción óptimas según gráficas de contorno	A = 44; B = 100	A = 47; B = 100
Valor óptimo	Según gráficas de contorno	25
	Experimental*	24,8 \pm 0,3
		253
		254 \pm 2

AG: Ácido gálico. PS: Peso seco de mora. A: Porcentaje de etanol en agua (v/v). B: Tiempo de ultrasonido (min). R²: coeficiente de determinación. RMSE: raíz cuadrada del error cuadrático medio. *Valor medio \pm desviación estándar ($n = 3$).

Tabla 3. Modelos establecidos por los diseños de experimentos, para la obtención de extractos de mora de Castilla, con soluciones acuosas de metanol.

Parámetro del modelo	Contenido de compuestos fenólicos (mg AG/g PS)	ORAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g PS)
Ecuación	$8,034 + 0,456A + 0,0346B - 0,00442A^2 + 0,000320B^2$	$100,982 + 3,169A + 0,509B - 0,0311A^2 + 0,00143B^2$
R ²	0,94	0,96
RMSE	0,094	0,65
Condiciones de extracción óptimas según gráficas de contorno	A = 52; B = 100	A = 51; B = 100
Valor óptimo	Según gráficas de contorno	26
	Experimental*	24,5 \pm 0,5
		247
		242 \pm 2

AG: Ácido gálico. PS: Peso seco de mora. A: Porcentaje de metanol en agua (v/v). B: Tiempo de ultrasonido (min). R²: coeficiente de determinación. RMSE: raíz cuadrada del error cuadrático medio. *Valor medio \pm desviación estándar ($n = 3$).

Las gráficas de contorno de los modelos establecidos (figura 3) predijeron que los mejores resultados de las variables de respuesta los presentarían los extractos obtenidos con soluciones acuosas de acetona, etanol y metanol al 31, 46 y 52%, respec-

tivamente, durante 100 min de extracción asistida con ultrasonido; bajo estas condiciones, no se encontraron diferencias significativas entre los resultados predichos y los obtenidos experimentalmente (tablas 1-3).

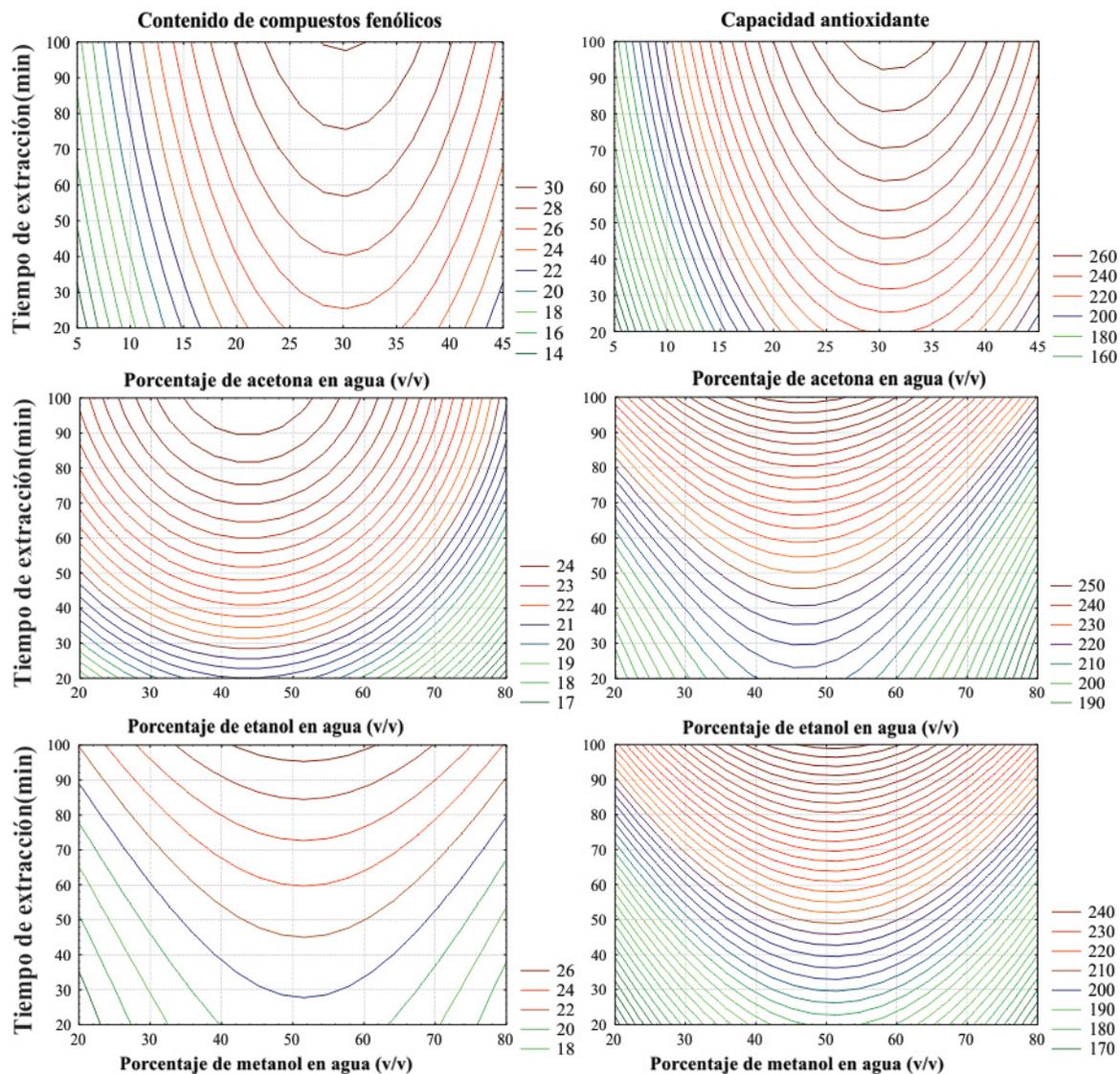


Figura 3. Gráficas de contorno para el efecto del porcentaje de solvente en agua y del tiempo de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla.

La proximidad de las condiciones óptimas predichas entre el modelo para el contenido de compuestos fenólicos y el de capacidad antioxidante, con cada solvente evaluado, es consistente con el alto valor del coeficiente de correlación (0,92) encontrado para los resultados experimentales (figura 4).

Las capacidades antioxidantes (mmol Trolox[®]/g extracto seco) de los extractos de mora obtenidos experimentalmente bajo las condiciones reportadas como óptimas en las tablas 1-3, fueron alrededor del 50% más altas que las del BHT y el α -tocoferol, antioxidantes comerciales ampliamente utilizados en las industrias de alimentos y cosméticos (tabla 4).

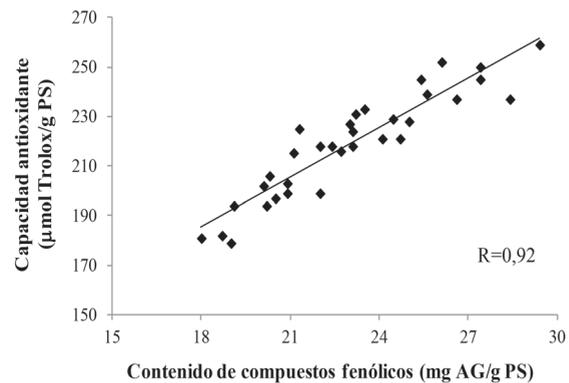


Figura 4. Correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla.

Tabla 4. Comparación de la capacidad antioxidante de extractos de mora de Castilla con la de sustancias de referencia.

Extracto o sustancia	Capacidad antioxidante
Extracto de mora obtenido con acetona (31%) ^a	955 ± 7 ^b
Extracto de mora obtenido con etanol (46%) ^a	898 ± 5 ^b
Extracto de mora obtenido con metanol (52%) ^a	859 ± 6 ^b
Di- <i>tert</i> -butilhidroxitolueno (BHT)	664 ± 8 ^c
α-Tocoferol	560 ± 7 ^c

^aPorcentaje (v/v) de solvente orgánico, en agua, utilizado para la extracción.

^bValor expresado como mmol Trolox[®]/g extracto seco. Valor medio ± desviación estándar ($n = 3$). ^cValor expresado como mmol Trolox[®]/g sustancia. Valor medio ± desviación estándar ($n = 3$).

DISCUSIÓN

La evaluación del efecto de solventes con distintas polaridades, sobre el contenido de compuestos fenólicos en extractos de mora de Castilla, indicó que el valor de esta variable respuesta, no dependió únicamente de las polaridades de las soluciones extractantes, sino que hubo otros factores a los que pueden atribuirse las diferencias en los resultados. Se encontró, que la aplicación de ultrasonido afectó positivamente el contenido de compuestos fenólicos en los extractos y, que los valores obtenidos tuvieron correlación directa con los de capacidad antioxidante. Los mejores resultados presentados por los extractos de mora, en comparación con los del BHT (tabla 4) y del α-tocoferol, antioxidantes de referencia ampliamente usados, sugieren que estos extractos, eventualmente, podrían constituir una buena alternativa a los antioxidantes comerciales de uso común.

En las extracciones realizadas durante el mismo tiempo (6 min, con ultrasonido) y con diferentes solventes puros (figura 1), se observó que el menor contenido de compuestos fenólicos se obtuvo con la acetona. Esto puede deberse a que las sustancias fenólicas presentes en la mora de Castilla son elagitaninos, antocianinas, glucósidos del ácido elágico, de la quercetina y del kaempferol, epicatequina, proantocianidinas, ácido gálico y ésteres de los ácidos gálico, caféico, cumárico y ferúlico (4, 19-21), compuestos cuyas estructuras los hacen preferiblemente extraíbles por solventes polares próticos, mediante la formación de enlaces de hidrógeno (22-23). El mejor resultado obtenido cuando la extracción se realizó con metanol (100%),

respecto al conseguido con etanol (100%), puede atribuirse a que el metanol contiene un fragmento alifático más pequeño que el del etanol y, de esta manera, se enlaza con los compuestos fenólicos más fácilmente (24).

Los extractos obtenidos con mezclas solvente orgánico-agua mostraron mayor contenido de compuestos fenólicos que los presentados por los extractos adquiridos con agua o con los solventes orgánicos al 100%. Esto puede atribuirse a varios factores, el principal de ellos es la estructura molecular de los analitos, que contiene fragmentos polares y no polares, cuya proporción los hace selectivamente extraíbles por determinada mezcla de solventes (25). Es por esto que los extractos obtenidos con las soluciones acuosas de metanol, a pesar de ser soluciones extractantes más polares, de acuerdo con el índice de polaridad de Snyder (22), que las soluciones acuosas de etanol y acetona, presentaron contenidos de compuestos fenólicos iguales a los logrados con las soluciones acuosas de etanol, e inferiores a los conseguidos con las soluciones acuosas de acetona (figura 1).

Otros factores que pueden contribuir en el mayor contenido de compuestos fenólicos de los extractos obtenidos con las soluciones acuosas, son, por un lado, que el agua hincha el material vegetal, y le permite a los solventes penetrar más fácilmente en la matriz sólida, lo que aumenta la extractabilidad (26) y, de otra parte, que los solventes orgánicos inactivan la polifenoloxidasas, enzima que oxida los compuestos fenólicos, lo que puede disminuir el contenido de estas sustancias en los extractos obtenidos con agua al 100% (27).

En este estudio, además del efecto de los solventes, se evaluó la influencia del ultrasonido sobre el contenido de compuestos fenólicos y, se encontró que su aplicación favoreció la extracción de estos componentes, en todos los tiempos evaluados (figura 2). Las ondas ultrasónicas pueden producir ruptura celular y reducción del tamaño de partícula, lo que permite mayor área de contacto entre las fases sólida y líquida y, de esta manera, un mejor acceso del solvente a los compuestos de interés (28). El uso de ultrasonido se ha incrementado porque mediante su empleo se han logrado mejores resultados, en comparación con otras técnicas tales como calentamiento, radiación de microondas, métodos enzimáticos (28), extracción Soxhlet, agitación orbital, agitación magnética, o agitación en vórtice (29).

En la figura 3, se observa que los seis modelos matemáticos obtenidos, predicen que los mejores resultados se logran, si la extracción se asiste con ultrasonido durante 100 min. Este tiempo es notoriamente inferior al empleado por otros autores quienes llevaron a cabo la extracción durante 24, 48 y 72 h (4, 30-31), sin el uso de ultrasonido, y obtuvieron contenidos de compuestos fenólicos similares a los de este trabajo.

El interés en la extracción de compuestos fenólicos radica en su potencial capacidad antioxidante (32). En este estudio, los extractos de mora de Castilla, presentaron habilidad para neutralizar los radicales peroxilo generados durante el desarrollo del ensayo ORAC, pero esta capacidad, al igual que el contenido de compuestos fenólicos, dependió de las condiciones de obtención de los extractos (figuras 1-2 y tablas 1-3). Los resultados indicaron una correlación directa entre las dos variables de respuesta analizadas (figura 4), es decir, un aumento del contenido de compuestos fenólicos en los extractos de mora estuvo acompañado por un incremento de su capacidad antioxidante. Cho *et al.*, 2005 (33), y Wada y Ou, 2002 (34), también obtuvieron relaciones lineales ($R=0,99$ y $R=0,95$, respectivamente) entre estas dos variables.

La mayor capacidad antioxidante de los extractos de mora de Castilla, en comparación con las del BHT y del α -tocoferol (tabla 4), puede atribuirse a su composición en antocianinas (35), elagitaninos, ácido gálico y glucósidos de quercetina y kaempferol (4, 19-21). Estos resultados sugieren que los extractos de mora podrían constituir una alternativa a los antioxidantes comerciales, lo cual es de gran interés porque el uso del BHT se ha restringido debido a su potencial carcinogénico (36).

Limitaciones

Las limitaciones de este estudio estriban en el hecho de no haber determinado la composición de los extractos, de manera que no se pudo establecer si las diferencias son solo de cantidad o, también, de composición. De otra parte, el color de los extractos de mora, podría limitar su uso como antioxidante natural en algunos productos alimenticios y cosméticos, pero, en otros, constituiría un valor agregado debido a que podría utilizarse como pigmento natural. No obstante, se requiere más investigación respecto a la capacidad antioxidante de los extractos de mora en emulsiones, y, también, se necesita evaluar sus cito- y genotoxicidades.

CONCLUSIONES

Los extractos de mora de Castilla, obtenidos bajo las condiciones de extracción predichas como óptimas, presentaron mayor capacidad antioxidante que las del BHT y del α -tocoferol, antioxidantes utilizados en las industrias de alimentos y cosméticos. El mayor contenido de compuestos fenólicos, 30 ± 1 mg AG/g PS, y el mayor valor de capacidad antioxidante, 273 ± 6 mmol Trolox[®]/g PS, se obtuvieron con soluciones acuosas de acetona al 31% (v/v), realizando la extracción asistida con ultrasonido, durante 100 min. Se encontró una relación lineal ($R=0,92$) entre las dos variables de respuesta analizadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, Contrato RC 0572-2012, por el financiamiento de la investigación. Jennifer Pilar Rojas-Llanes agradece al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias, por la beca para realizar estudios de Doctorado (Convocatoria 494 de 2009).

Conflicto de intereses: Los autores manifiestan que no existe ningún conflicto de interés con los resultados publicados.

REFERENCIAS

1. Finn CE, Clark JR. Emergence of blackberry as a World crop. *Chron Horticult.* 2011; 51(3): 13-18.
2. Arozarena I, Ortiz J, Hermosín-Gutiérrez I, Urretavizcaya I, Salvatierra S, Córdova I, *et al.* Color, ellagitannins, anthocyanins, and antioxidant activity of Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) wines. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60: 7463-7473.
3. Schreckinger ME, Lotton J, Lila MA, Gonzalez E. Berries from South America: A comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. *J. Med Food.* 2010; 13 (2): 233-246.
4. Garzón GA, Riedl KM, Schwartz SJ. Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (*Rubus glaucus* Benth). *J. Food Sci.* 2009; 74(3): 227-232.
5. Vasco C, Ruales J, Kamal-Eldin A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem.* 2008; 111: 816-823.
6. Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 4076-4082.
7. Aybastier Ö, Isik E, Sahin S, Demir C. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. *Ind. Crops Prod.* 2013; 44: 558-565.
8. Khan MK, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier AS, Dangles O, Chemat F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavonone

- glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. Food Chem. 2010; 119: 851-858.
9. Moreira MM, Morais S, Barros AA, Delerue-Matos C, Guido LF. A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis. Anal. Bioanal. Chem. 2012; 403: 1019-1029.
 10. Li BB, Smith B, Hossain Md. Extraction of phenolics from citrus peels II. Enzyme-assisted extraction method. Sep. Purif. Technol. 2006; 48: 189-196.
 11. Bhat R, Kamaruddin NSB, Min-Tze L, Karim AA. Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. Ultrason. Sonochem. 2011; 18: 1295-1300.
 12. Romdhane M, Gourdon C. Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound. Chem. Eng. J. 2002; 87: 11-19.
 13. Xia T, Shi S, Wan X. Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion. J. Food Eng. 2006; 74: 557-560.
 14. Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, Mason TJ. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. Ultrason. Sonochem. 2001; 8: 137-142.
 15. Norma Técnica Colombiana 4106. Frutas frescas. Mora de Castilla. Especificaciones. Bogotá: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación; 1997. 15 p.
 16. Folin O, Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. J. Biol. Chem. 1927; 73(2): 627-650.
 17. Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC, Rangel AOSS. Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products. J. Agric. Food Chem. 2006; 54: 5241-5246.
 18. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. J. Agric. Food Chem. 2001; 49: 4619-4626.
 19. Mertz C, Cheynier V, Günata Z, Brat P. Analysis of phenolic compounds in two blackberry Species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by High-performance liquid chromatography with Diode array detection and electrospray ion trap Mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 2007; 55: 8616-8624.
 20. Vasco C, Riihinen K, Ruales J, Kamal-Eldin A. Phenolic compounds in *Rosaceae* fruits from Ecuador. J. Agric. Food Chem. 2009; 57 (4): 1204-1212.
 21. Osorio C, Hurtado N, Dawid C, Hofmann T, Heredia-Mira FJ, Morales AL. Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits. Food Chem. 2012; 132: 1915-1921.
 22. Markom M, Hasan M, Wan WR, Singh H, Jahim JM. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. Sep. Purif. Technol. 2007; 52: 487-496.
 23. Delgado-Vargas F, Paredes-López O. Natural colorants for food and nutraceutical uses. Boca Ratón, Estados Unidos: CRC Press; 2002. 342 p.
 24. Galanakis CM, Goulas V, Gekas V. Predicting the solubilization preference of natural phenols to different solvents. Conference paper: 11th International Congress on Engineering and Food. Atenas, Grecia: National Technical University of Athens. 2011; 1-6.
 25. Barwick VJ. Strategies for solvent selection - a literature review. Trac-Trends Anal. Chem. 1997; 16(6): 293-309.
 26. Genterbach DD. Solid-liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals. En: Shi J, Mazza G, Maguer ML. Functional foods biochemical and processing aspects. Vol. 2. Boca Ratón, Estados Unidos: CRC Press; 2002. 331-366.
 27. González-Montelongo R, Lobo MG, González M. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. Food Chem. 2010; 119: 1030-1039.
 28. Huang W, Xue A, Niu H, Jia Z, Wanga J. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. Food Chem. 2009; 114: 1147-1154.
 29. Luthria DL, Biswas R, Natarajan S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. Food Chem. 2007; 105: 325-333.
 30. Connor AM, Finn CE, McGhie TK, Alspach PA. Genetic and environmental variation in anthocyanins and their relationship to antioxidant activity in blackberry and hybridberry cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 2005; 130(5): 680-657.
 31. Pantelidis GE, Vasilakakis M, Manganaris GA, Diamantidis Gr. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. Food Chem. 2007; 102: 777-783.
 32. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 2010; 15: 7313-7352.
 33. Cho MJ, Howard LR, Prior RL, Clark JR. Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. J. Sci. Food Agric. 2005; 85: 2149-2158.
 34. Wada L, Ou B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon Caneberries. J. Agric. Food Chem. 2002; 50: 3495-3500.
 35. Wang H, Cao G, Prior RL. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. J. Agric. Food Chem. 1997; 45: 304-309.
 36. Bauer AK, Dwyer-Nield LD, Hankin JA, Murphy RC, Malkinson AM. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant C57BL/6 mice. Toxicol. 2001; 169: 1-15.