

MARÍA EUGENIA  
ROMERO RIOMÁN



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena

T  
E  
S  
I  
S  
D  
O  
C  
T  
O  
R  
A  
L  
2  
0  
2  
1



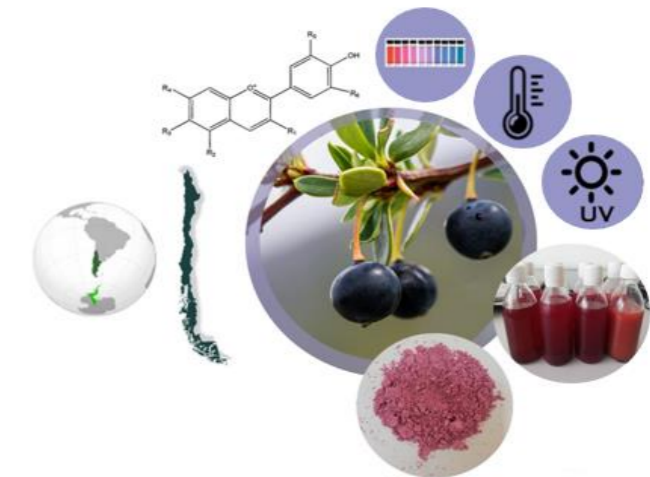
Universidad  
Politécnica  
de Cartagena

Campus  
de Excelencia  
Internacional

Micro/nanoencapsulación de compuestos bioactivos de calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) y evaluación *in vitro* de su potencial anti neurodegenerativo

### PhD Program:

Advanced Techniques for Research and Development in Food and Agriculture



**Author:** María Eugenia Romero Román

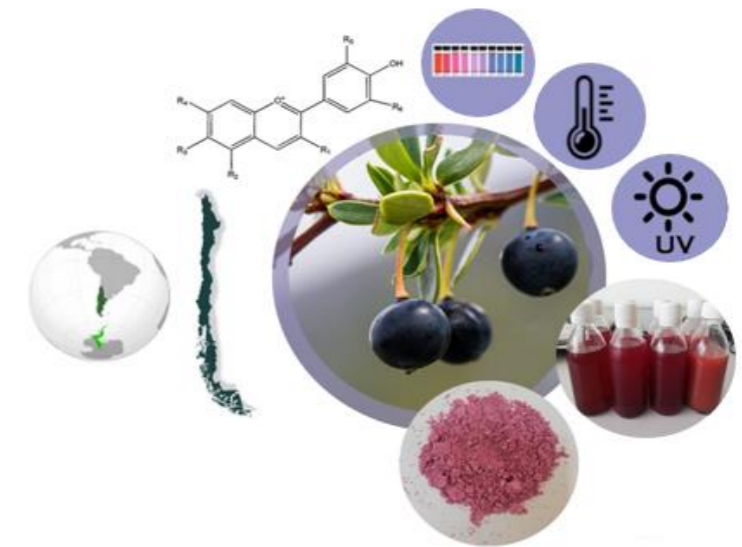
**Supervisors:** Cristina García Viguera, PhD.  
María Dolores López B., PhD.

**Tutor:** Pablo Fernández Escámez, PhD.

**Cartagena (2021)**

Micro/nanoencapsulación de compuestos bioactivos de calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) y evaluación *in vitro* de su potencial anti neurodegenerativo

**PhD Program:**  
*Advanced Techniques for Research and Development in Food and Agriculture*



**Author:** *María Eugenia Romero Román*  
**Supervisors:** *Cristina García Viguera, PhD.*  
*María Dolores López B., PhD.*  
**Tutor:** *Pablo Fernández Escámez, PhD.*

**Cartagena (2021)**



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena



Universidad  
de Concepción

---

## **Doctoral Thesis**

**Micro/nanoencapsulación de compuestos bioactivos de calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) y evaluación *in vitro* de su potencial anti neurodegenerativo**

**Micro/nanoencapsulation of bioactives from calafate berries (*Berberis microphylla* G. Forst) and *in vitro* evaluation of its anti-neurodegenerative potential**

### **Author:**

María Eugenia Romero Román

### **Supervisors:**

Cristina García Viguera, PhD.  
María Dolores López B., PhD.

### **Tutor:**

Pablo Fernández Escámez, PhD.

---

**Cartagena, 2021**

## **Agradecimientos**

Para no cambiar mi esencia podría empezar cantando “Gracias a la vida, que me ha dado tanto” porque así es, tengo tanto que agradecer y a quienes agradecer.

Empezaré por mi tutora de Tesis y Directora del Programa de Doctorado en Ciencias de la Agronomía, Dra. María Dolores López Belchí, mi reconocimiento especial por su apoyo, guía y gestión para el desarrollo del presente trabajo y la consecución del Convenio de co-tutela con la Universidad Politécnica de Cartagena para la obtención de la doble titulación. Gracias por sus consejos, su tiempo y sobre todo por confiar en mí. Gracias por todas las oportunidades que me ha brindado, por ser mi mentora e inspirarme a seguir creciendo. Todas mis vivencias del Doctorado llevan un poquito de usted.

Mi gratitud sincera a la Dra. Cristina García Viguera, Profesora de Investigación del CSIC y Responsable del Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables, en el Dpto. de Ciencia y Tecnología de Alimentos, del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) de Murcia quien brindó las facilidades para realizar parte de la Tesis en su Laboratorio. Gracias no solo por la oportunidad para hacer investigación, sino por su tiempo, paciencia y por los momentos amenos compartidos fuera del Laboratorio.

A los Dres. Richard Bastías, Mauricio Schoebitz, Paula Periago y Pablo Fernández por su colaboración en la supervisión, edición y corrección del trabajo de Tesis. A los catedráticos del Doctorado en Ciencias de la Agronomía por compartir sus conocimientos y experiencias que complementaron mi formación dentro del Programa. Al personal técnico de los Laboratorios de Análisis Químico de la Universidad de Concepción Campus Chillán y Concepción y del Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables del CEBAS-CSIC, Murcia.

Mención especial a la Secretaria de Educación Superior Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT-Ecuador) por el apoyo financiero a través de la Beca de Convocatoria Abierta, al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT REGULAR) por los recursos para el desarrollo de la tesis a través del Proyecto 1160899 y a la Universidad de Concepción por la beca UCO 1866 de internacionalización.

A todos quienes me apoyaron en esta etapa académica especialmente a mi familia. Ustedes sin importar la distancia han sido mi pilar fundamental para mantenerme firme a pesar de las circunstancias. A Sonia, mi madre, Manuel, mi padre (†) y mi abuelita Hilda (†), mi gratitud eterna ya que a ustedes les debo todo lo que soy. A Ma. Olivia y Ma. Cristina, mis hermanas y amigas, gracias por sus consejos y ayuda, por escucharme y darme aliento. A Alejandro, Patricio, Mafer por estar pendientes de mí.

A Danny, quien me acompañó durante el último y más difícil período del Doctorado. Gracias porque con mucho amor y paciencia me animó a seguir, gracias por la ayuda, los cafés y la compañía en las largas noches. A Noggy, mi hija perruna, quien desde su llegada solo sabe hacerme feliz. A mis amigos del alma Elena, Carlos, Mauri, Christian, Daniel y por su tiempo, consejos y buenas charlas. Al Dr. Walter Reyes, mi padre de la investigación, quien me motivó a empezar esta carrera de resistencia.

Y, aunque parezca no tener relación con la tesis, gracias a mis amigos músicos y a los coros que me acogieron, porque fueron mi soporte y me permitieron hacer lazos con gente maravillosa. La pasión, creatividad y espontaneidad en la ciencia siempre saldrán a flote cuando tengo música en mi vida. Al coro Silla del Sol, mi familia en Chile, simplemente gracias.

Finalmente, a todos quienes contribuyeron para llenar de buenos momentos y experiencias inolvidables mi estancia tanto en Chile como en España durante esta etapa de Doctorado.

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

### PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS

#### Publicación 1

**Título:** Native Species Facing Climate Changes: Response of Calafate Berries to Low Temperature and UV Radiation.

**Autores:** **María Eugenia Romero-Román**, Mauricio Schoebitz, Richard Bastías, Pablo Fernández, Cristina García-Viguera, María Dolores López-Belchí.

**Revista:** Foods

**Publicación:** 196,10 (1) 2021

**DOI:** <https://doi.org/10.3390/foods10010196>

#### Publicación 2

**Título:** Beyond bioactive compounds from calafate berries encapsulated by Spray drying: Neurological activities

**Autores:** **María Eugenia Romero-Román**, Mauricio Schoebitz, Richard Bastías, Pablo Fernández, Cristina García-Viguera, María Dolores López-Belchí.

**Revista:** Journal of Functional Foods

**Publicación:** En revisión

#### Publicación 3

**Título:** Model enriched juice based on calafate: Evaluation of Anthocyanin stability, quality and biological characteristics

**Autores:** **María Eugenia Romero-Román**, Cristina García-Viguera, Paula Periago, Richard Bastías, María Dolores López-Belchí.

**Revista:** Journal of Food Science

**Publicación:** En edición

### COMUNICACIONES A CONGRESOS

#### Ponencia 1

**Congreso:** Congreso Internacional de Química

**Título:** Caracterización de compuestos bioactivos en frutos nativos de Chile: énfasis en calafate

**Autores:** **María Eugenia Romero-Román**, María Dolores López-Belchí.

**Tipo de participación:** Oral

**Lugar:** Riobamba, Ecuador

**Fecha:** 1-2 Agosto 2018

#### Ponencia 2

**Congreso:** Agriculture and Food Chemistry

**Título:** Calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) the Chilean berry: unveiling its potential

**Autores:** **María Eugenia Romero-Román**, Belén Vera, María Dolores López-Belchí.

**Tipo de participación:** Poster

**Lugar:** Roma, Italia

**Fecha:** 5-6 Julio 2018

### Ponencia 3

**Congreso:** Encapsulation Training School  
**Título:** Encapsulation of calafate berry extract by Spray-drying to improve the bioavailability in humans  
**Autores:** **María Eugenia Romero-Román**, Mauricio Schoebitz, María Dolores López-Belchí.  
**Tipo de participación** Oral  
**Lugar:** Loughborough, UK  
**Fecha:** 15-19 Abril 2019

### Ponencia 4

**Congreso:** Agriculture and Food Chemistry  
**Título:** Changes on antioxidant profiles and physicochemical characteristics in growing wild calafate berry (*Berberis microphylla* G. Forst ) in response to abiotic stress  
**Autores:** **María Eugenia Romero-Román**, Mauricio Schoebitz, Richard Bastías, María Dolores López-Belchí.  
**Tipo de participación** Poster  
**Lugar:** Viena, Austria  
**Fecha:** 18-20 Junio 2019

### Ponencia 5

**Congreso:** Economía circular en la agricultura  
**Título:** Manejo y recuperación de residuos de cultivos e industria alimentaria para la obtención de compuestos bioactivos  
**Autores:** **María Eugenia Romero-Román**.  
**Tipo de participación** Oral  
**Lugar:** Concepción  
**Fecha:** Junio 2020

### Ponencia 6

**Congreso:** Workshop de Investigación Agroalimentaria  
**Título:** Calafate Berry extracts encapsulated by Spray-drying and stability assessment  
**Autores:** **María Eugenia Romero-Román**, Pablo Fernández, Cristina García-Viguera, María Dolores López-Belchí.  
**Tipo de participación** Oral  
**Lugar:** Cartagena, España  
**Fecha:** Julio 2020

### Ponencia 7

**Congreso:** Workshop de Jóvenes investigadores en Ciencias Agronómicas  
**Título:** Análisis del potencial de calafate para elaborar una bebida refrescante  
**Autores:** **María Eugenia Romero-Román**, Paula Periago, Cristina García-Viguera, María Dolores López-Belchí.  
**Tipo de participación** Oral  
**Lugar:** Concepción, Chile  
**Fecha:** Diciembre 2020

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA ADICIONAL

### Publicación 1

**Título:** Nuevas fuentes de antioxidantes naturales: Caracterización de compuestos bioactivos en cinco frutos nativos de Chile. Perfiles.  
**Autores:** **María Eugenia Romero-Román**, Pamela Jara, Felipe Noriega, Macarena Farías, María Dolores López-Belchí.  
**Revista:** Perfiles  
**Publicación:** 2019. 22 (2). Pp. 33-41

### Publicación 2

**Título:** Spray-Dried Formulations Rich in Malvidin from Tintorera Grape Wastes: Characterization, Stability, and Storage  
**Autores:** María Dolores López-Belchí, Eduardo Caamaño, Guillermo Pascual, Felipe Noriega, Paulo Fierro-Morales, **María Eugenia Romero-Román**, Pamela Jara, Mauricio Schoebitz, Ignacio Serra y Diego Moreno.  
**Revista:** Processes  
**Publicación:** 2021, 9(3), 518

### Capítulo 1

**Título:** Wellness ingredients and functional food  
**Autores:** **María Eugenia Romero-Román**, María Trinidad Toro, Felipe Noriega, María Dolores López.  
**Editorial:** ELSEVIER  
**Publicación:** 1 Julio, 2019  
**ISBN:** 9780128164532

### Capítulo 2

**Título:** Foods and Supplements. Part IV: Commercialized aspects and applications.  
**Autores:** Erika Paulsen, **María Eugenia Romero-Román**, Paula Lema, Cristina García-Viguera, María Dolores López-Belchí, Diego Moreno.  
**Editorial:** ELSEVIER  
**Publicación:** 1 Diciembre, 2020  
**ISBN:** 9780128205631



## PREFACIO

La presente tesis doctoral, titulada: “**Micro/nanoencapsulación de compuestos bioactivos de calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) y evaluación *in vitro* de su potencial anti neurodegenerativo**”, se ha elaborado de acuerdo a la normativa de la UPCT para la presentación de Tesis Doctorales en base a un conjunto de publicaciones. De acuerdo con esta premisa, esta Tesis Doctoral está compuesta por:

- Resumen/*Abstract*
- Introducción general (Capítulo I)
- Hipótesis y objetivos (Capítulo II).
- Recopilación de publicaciones científicas (Capítulo III-V).
- Conclusiones generales del trabajo realizado (Capítulo VI).
- Bibliografía (Capítulo VII)

No incluye una sección de “Materiales y Métodos”, ni “Resultados y Discusión” ya que dichos apartados se incluyen de forma específica en cada publicación descritos en los capítulos III-V.

Este trabajo de investigación doctoral ha sido realizado gracias al financiamiento de:

- Proyecto “Development of formulations of phytochemicals and *in vitro* biological activity evaluation of compounds extracted from berries” (1160899). Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT REGULAR, Chile)
- Beca para estudios de posgrado. Secretaria de Educación Superior Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT-Ecuador)
- Beca de Internacionalización UCO 1866, Universidad de Concepción

## Resumen

Calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) es un arbusto silvestre que se distribuye en la Patagonia chilena y argentina. Sus frutos son de coloración, azul/púrpura y un sabor particular, características otorgadas por los compuestos fenólicos que la planta produce para hacer frente a las condiciones en las que se desarrolla. Al igual que otros frutos rojos, también conocidos como “berries” (por su término en inglés), gracias a su composición rica en una amplia gama de compuestos bioactivos, puede brindar beneficios para la salud, teniendo, por consiguiente, un gran potencial para el desarrollo de productos alimenticios y fuente de nuevas opciones dietéticas para el tratamiento de enfermedades.

El presente trabajo de investigación describe la respuesta de las bayas de calafate frente al cambio climático, a través de la determinación de los perfiles de antocianos, a partir de frutos de calafate colectados en la región de Aysén, sur de Chile, así como la formulación, encapsulación y evaluación de dichos compuestos, su estabilidad después del almacenamiento y el estudio del potencial relacionado con su actividad enzimática (AChE) y su potencial para hacer frente a enfermedades neurodegenerativas. Finalmente, como aplicación práctica, se ha diseñado una bebida experimental a nivel de laboratorio.

La capacidad de esta baya para adaptarse a los cambios por factores ambientales y la correlación de estos factores con los parámetros físico-químicos es clave para dilucidar la reacción de los frutos de calafate al cambio climático. Así, el capítulo III aporta información útil para apoyar a los programas de manejo agronómico y mejoramiento genético. El análisis de las bayas de calafate cosechadas en un origen nativo nos permitió confirmar su plasticidad para adaptarse a condiciones particulares de radiación solar y temperatura en la zona sur de Chile. Considerando que no había trabajos previos respecto a la correlación de las condiciones abióticas con los perfiles de antocianos y las

características fisicoquímicas del calafate, en un entorno de origen silvestre, se evaluó la respuesta de los frutos de calafate frente a cambios climáticos (baja temperatura y la radiación UV) durante los años 2017, 2018 y 2019 así como su actividad antioxidante y el contenido de antocianos del fruto, en relación con la radiación solar UV ( $\text{Wm}^{-2}$ ) y la temperatura del aire ( $^{\circ}\text{C}$ ).

Una vez establecidas las diferencias debidas a las condiciones de cultivo, el paso siguiente fue la encapsulación (capítulo IV). Se propuso la aplicación de *Spray Drying* (una de las técnicas de encapsulación más utilizadas en la industria alimentaria) y la liofilización (*Freeze Drying*) como control, con el fin de proteger los compuestos fenólicos de calafate y asegurar la disponibilidad de los mismos. Posteriormente se evaluó la estabilidad de los encapsulados a diferentes temperaturas de almacenamiento, por un periodo de 60 días. Para concluir se realizaron ensayos enzimáticos (AChE) y celulares con PC12 (células utilizadas en estudios neurobiológicos y en la investigación de enfermedades neurodegenerativas), para determinar el potencial biológico de los encapsulados de calafate. Se observó que los microencapsulados de calafate fueron estables, con buena eficiencia de encapsulación, acción biológica antioxidante, anticolinérgica y neuroprotectora.

Finalmente, se procedió a la aplicación práctica de la elaboración de una bebida funcional (Capítulo V). En la misma, se evaluó la influencia de la combinación de calafate con cítricos como el limón, la naranja o ambos, con el fin de formular una bebida saludable. Una vez formuladas las bebidas se sometieron a tratamientos térmicos (pasteurización), similares a los establecidos por la industria alimentaria, para así asegurar la inocuidad de las mismas. Se determinó la estabilidad de los compuestos polifenólicos de calafate a 30 días de almacenamiento y con dos condiciones de temperatura (5 y  $25^{\circ}\text{C}$ ). Los cítricos otorgaron estabilidad a los compuestos bioactivos (fundamentalmente antocianos) de calafate. La capacidad antioxidante aumentó gracias a los compuestos que aportaron los cítricos a las bebidas funcionales formuladas en base a calafate.

## Abstract

Calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) is a wild berry distributed in Chilean and Argentine Patagonia. Its fruits have a blue/purple color, and a particular flavor. Health properties are given by the polyphenolic compounds (anthocyanins plus others), of the plant, produced as phytoalexins, in order to survive under environmental conditions. Due to this wide range of bioactive compounds, health benefits can be provided, and therefore has a great potential for the development of food products and new dietary options for treatment of certain diseases.

This research work describes the response of calafate berries to climatic changes, as well as the formulation, encapsulation and their stability after storage, as well as the study of the potential related to their enzymatic activity (AChE) or potential protection from neurodegenerative diseases. Finally, a drink prototype has been developed.

The ability of this berry to adapt to changes due to environmental factors and the correlation of these factors with physical-chemical parameters is the key to elucidate the reaction of calafate fruits to climate change. Thus, chapter two provides useful information to support agronomic management and genetic improvement programs. The analysis of the calafate berries harvested in a native origin allowed us to confirm their plasticity to adapt to particular conditions of solar radiation and temperature in the southern zone of Chile. Considering that there was no previous work regarding the correlation of abiotic conditions with anthocyanin profiles and the physicochemical characteristics of calafate in an environment of wild origin, the response of calafate fruits to climatic changes (low temperature and UV radiation) during the years 2017, 2018 and 2019 was evaluated, as well as the antioxidant activity and anthocyanin content of the calafate fruit in relation to UV solar radiation. ( $W\ m^{-2}$ ) and air temperature ( $^{\circ}C$ ).

Once the differences caused by environmental conditions were established, the next step was the encapsulation (Chapter 3). The application of *Spray Drying* (one of the most used encapsulation techniques in the food industry), and *Freeze Drying* as control, were proposed, in order to protect the phenolic compounds of calafate and ensure their availability. Subsequently, the stability of the microcapsules was evaluated at different storage temperatures for 60 days. To conclude, enzymatic (AChE) and neuro-cellular tests were carried out with PC12 (cells used in neurobiological studies and in researches of neurodegenerative diseases) to determine the influence of encapsulation on calafate's biological potential. It was observed that calafate microencapsulates were stable despite high temperatures, with good encapsulation efficiency, antioxidant, anticholinergic and neuroprotective biological action.

Finally, we proceeded to the practical application of producing a functional beverage. The combinatorial potential of calafate with citrus fruits such as lemon, orange and both was evaluated. Once the drinks were formulated, they were subjected to heat treatments (traditional industrial pasteurization), to ensure the safety of new formulations, as well as the quality of the final product. The stability of the polyphenolic compounds was determined at 30 days of storage at two temperature conditions (5 and 35 °C). Citrus fruits provided stability to the calafate bioactives. The antioxidant capacity increased due to the addition of citrus compounds. Regarding this it could be highlighting the potential agro-industrial of this berry.

## INDEX

Tables index.....	xx
Figures index.....	xxi
Chapter I .....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	2
Chapter II .....	24
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	25
Objetivos .....	25
Objetivos específicos .....	25
Chapter III .....	27
Native species facing climate changes: Response of calafate berries to low temperature and UV radiation .....	28
3.1 Abstract.....	28
3.2 Introduction .....	29
3.3 Materials and Methods.....	31
3.4 Results and Discussion.....	36
3.5 Conclusions .....	47
Chapter IV .....	49
Beyond bioactive compounds from calafate berries encapsulated by Spray drying: Neurological activities .....	50
4.1 Abstract.....	50
4.2 Introduction .....	51
4.3 Materials and methods.....	54
4.3.1 Material .....	54
4.3.2 Chemicals .....	54
4.3.3 Preparation of microcapsules by Spray drying and freeze-drying and study of storage stability .....	55
4.3.4 Characterization of phenolic compounds and antioxidant properties from encapsulated calafate .....	55
4.3.5 Neuroprotective properties of calafate microcapsules.....	57
4.3.6 PC-12 Cells .....	58

4.3.7	Soluble Oligomers of A $\beta$ (SO- A $\beta$ ) preparation .....	58
4.3.9	Scanning Electron Microscopy of microcapsules .....	59
4.3.10	Statistical analysis .....	59
4.4	Results.....	59
4.4.1	Polyphenol recovery from Calafate formulations.....	59
4.4.2	Antioxidant and enzymatic activity from calafate microcapsules .....	61
4.4.3	Calafate anthocyanin stability at different temperatures of storage .....	63
4.4.4	<i>In vitro</i> study of neuroprotective properties of calafate microcapsules on neurodegenerative models .....	65
4.5	Discussion .....	69
4.6	Conclusions .....	71
	Chapter V .....	73
	Bebida modelo a base de calafate y cítricos: estabilidad de antocianos, calidad y características biológicas.....	74
5.1	Introducción .....	75
5.2	Material y métodos.....	77
5.4	Resultados y Discusión.....	82
5.4.1	Base de la bebida funcional.....	82
5.5	Conclusiones .....	91
	Chapter VI .....	92
	CONCLUSIONES GENERALES .....	93
	Chapter VII.....	94
	References.....	94

## TABLES INDEX

<b>Table 1</b> Physicochemical parameters of Calafate berries of three consecutive years .....	39
<b>Table 2</b> CIEL *a*b* color parameters of calafate berries evaluated during three consecutive years.....	41
<b>Table 3.</b> Main anthocyanins, flavonols and other phenolic compounds detected by HPLC and found in Calafate berry of three consecutive years .....	42
<b>Table 4.</b> Antioxidant capacity by FRAP and DPPH* assays of calafate berry for three consecutive years.....	44
<b>Table 5.</b> Entrapment efficiency, recovery and Quantification of Phenolic Compounds of different dried treatments.....	61
<b>Table 6.</b> Phenolic compounds in calafate fruit extract ( <i>Berberis microphylla</i> G. Forst) identified and quantified by HPLC-DAD-(ESI)/MS <sup>n</sup> .....	62
<b>Table 7.</b> Evaluation of stability of anthocyanins encapsulated by Spray drying during 336 days of storage at 5°C. ....	65
<b>Tabla 8.</b> Principales antocianos detectados (mg 100 mL <sup>-1</sup> ) de calafate cuando se combinan con zumos de cítricos.....	82
<b>Tabla 9.</b> Flavanonas detectadas en cítricos .....	84
<b>Tabla 10</b> Antocianos y Flavanonas en formulados de calafate antes del tratamiento térmico.....	85
<b>Tabla 11</b> Parámetros de calidad de la bebida (SST, AT, pH y color).....	87
<b>Tabla 12.</b> Evaluación de degradación de antocianos de calafate presentes en bebidas formuladas. ....	88
<b>Tabla 13.</b> Evaluación y conteo de microorganismos psicrófilos, mesófilos y levaduras .....	90



## FIGURES INDEX

<b>Figura 1.</b> Fruto de calafate.....	9
<b>Figura 2.</b> Flavonoides, estructura y clasificación.....	12
<b>Figura 3.</b> Estructura básica de las antocianidinas .....	13
<b>Figura 4.</b> Encapsulación, material a encapsular, agentes encapsulantes y clasificación según tipo de proceso. ....	19
<b>Figura 5.</b> Proceso de extracción y encapsulación de compuestos polifenólicos por Spray Drying. ....	21
<b>Figura 6.</b> Preparación de bebida funcional. ....	22
<b>Figure 7.</b> Minimum Temperature in °C (a) and maximum UV solar radiation /day ( $W m^{-2}$ ) (b) during three consecutive years .....	38
<b>Figure 8.</b> Matrix of correlation between UV solar radiation and temperature with physicochemical parameters of calafate berries .....	43
<b>Figure 9.</b> Principal component analysis (PCA) of physical and chemical variables of calafate berry extracts .....	46
<b>Figure 10.</b> Antioxidant and enzymatic activity of encapsulated calafate at two storage temperatures .....	62
<b>Figure 11.</b> Anthocyanin losses (%) from Spray dried microcapsules of calafate. ....	64
<b>Figure 12.</b> SEM images of Spray-dried particles from calafate berries extracts .....	66
<b>Figure 13.</b> Acetylcholinesterase activity of encapsulated calafate by Spray Drying.....	67
<b>Figure 14.</b> Effect of encapsulated Calafate extract on PC12 cell viability .....	68
<b>Figura 15.</b> Identificación y comparación entre los antocianos detectados en el extracto puro de baya de calafate .....	83
<b>Figura 16.</b> Evaluación los ensayos DPPH <sup>*</sup> y ORAC de los formulados a partir de calafate .....	89

## ABREVIATIONS

m.a.s	meters above sea level
ACh	Acetylcholine
AChE	Acetylcholinesterase
HPLC-DAD-ESI/MS <sup>n</sup>	High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector-ElectroSpray Mass Spectrometry
CIEL <sup>*a*b</sup>	Color parameters
PCA	Principal Component Analysis
FW	Fresh weight
DW	Dry weight
UV	Ultraviolet
FRAP	Ferric ion reducing antioxidant power
DDPH <sup>•</sup>	2,2-difenil-1-picrylhydrazyl.
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity,
AC	Anthocyanins
TAC	Total Anthocyanins Content
TPC	Total Polyphenols Content
ADN	Desoxyribonucleic Acid
DD	Grade/day
AA	Ascorbic Acid
ANOVA	Analysis of variance
AUFC	Area under fluorescein curve
Cy	Cyanidin
Dp	Delphinidin
Pt	Petunidin
Pd	Peonidin
Mv	Malvidin
FAO	Food and Agriculture Organization
GA	Gallic Acid
ROS	Reactive oxygen species
P	Polar diameter
Eq	Equatorial diameter
W	Weight
TSS	Total soluble solids
A $\beta$	Amyloid- $\beta$
MD	Maltodextrin
TE	Trolox equivalent
TOFS	Temperature of Storage
SEM	Scanning Electron Microscopy

# Chapter I

---

## Introduction

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las plantas son una de las principales fuentes de nutrientes para el ser humano. Entre ellas, las frutas y hortalizas aportan vitaminas, minerales, proteínas y fibra, a nuestra alimentación. Cabe destacar que, además, las plantas producen una serie de compuestos con función protectora para sí mismas: los metabolitos secundarios. Destacan, de entre estos fitoquímicos, los carotenoides, esteroides, glucosinolatos, y polifenoles, entre otros, por su interés para el ser humano, debido a su posible potencial biológico y carácter nutricional. Estos compuestos (fitoalexinas) son generados, principalmente, como respuesta al estrés biótico y abiótico, en las plantas, pero la importancia para el ser humano radica en su capacidad para evitar el estrés oxidativo, asociado a más de cien enfermedades de gran importancia clínica y social, incluyendo diversos tipos de cáncer (Martínez *et al.*, 2015).

Un hecho a tener en cuenta, respecto a la población mundial, es que gran parte está formada por adultos (60%), los cuales adolecen de enfermedades crónicas, cardiovasculares y degenerativas producto de la edad, estrés e incluso mala alimentación. En este sentido, cabe destacar que la relación entre salud y nutrición ha centrado, en gran parte su atención, en los últimos años, en los anteriormente citados compuestos bioactivos. A pesar de la amplia promoción de consumo de frutas y vegetales, se estima que la ingesta per cápita a nivel mundial esté reducida entre el 20 y 50 por ciento menos del nivel diario mínimo recomendado (400 gramos), sobre todo en ancianos (Sociedad de Geriatria y Gerontología de Chile, 2016). A la baja ingesta de frutas y verduras se le atribuyen varias enfermedades, lo cual representa uno de los más importantes factores de riesgo de mortalidad. Así, la World Health Organization (2014) menciona que a nivel mundial, 3,4 millones de muertes corresponden al bajo consumo de fruta.

Dentro de la amplia gama de frutas se encuentran las bayas, también conocidos como frutos rojos, caracterizadas por sus aromas y vistosos colores provenientes de metabolitos secundarios conocidos como antocianos (de la familia de los flavonoides al igual que los flavonoles, flavanoles, flavonas e isoflavonas) que, aparte de brindarles a estas frutas la coloración roja, azul y/o púrpura, les confiere características especiales como antioxidantes y en algunos casos, efectos protectores frente a ciertas enfermedades (Augustin y Sanguansri, 2015). Así, los compuestos fenólicos provenientes de los frutos rojos pueden utilizarse para enriquecer otros alimentos (Suárez y Coy, 2016).

Entre los flavonoides, los antocianos son de los compuestos más potentes frente al estrés oxidativo, ya que poseen un gran potencial para neutralizar los radicales libres y un amplio espectro de actividad biológica (Pancheet *et al.*, 2016), gracias a la carga deslocalizada de la parte heterocíclica de la molécula (catión flavilio). Por ello, los productos ricos en antocianos (AC) son un tema en auge en las dietas mediterráneas, vegetarianas, terapéuticas e incluso para la reducción de peso, ya que pueden reducir los niveles de colesterol y glucosa, prevenir enfermedades cardiovasculares y degenerativas, así como evitar el envejecimiento precoz (COFENAT, 2017).

En cuanto a enfermedades neurodegenerativas, los flavonoides (y más concretamente los antocianos) son excelentes candidatos alternativos para la terapia de Alzheimer teniendo en cuenta sus propiedades anti-amiloidogénicas, antioxidantes y antiinflamatorias (Khan *et al.*, 2018), sobre todo para prevenir el inicio o retrasar la progresión de la neurodegeneración. No obstante, la inestabilidad que presentan estos compuestos frente a distintos factores como pH, luz o temperatura, hacen difícil su conservación. Así, para prevenir y su degradación y facilitar su disponibilidad y posterior asimilación eficiente, se utilizan procedimientos como la encapsulación, también adecuados para mantener los atributos deseables de calidad sensorial (Ghosh *et al.*, 2012).

El calafate, *Berberis microphylla* es un fruto rico en antocianos, cuya distribución geográfica está determinada entre la Patagonia argentina y chilena. Es un arbusto que produce bayas con características y composición bioquímica similar a otros frutos rojos pero con escasa o nula industrialización (Boeing *et al.*, 2014; Sarkar y Shetty, 2014), si bien sus frutos y raíces han sido utilizados por pueblos indígenas para la alimentación y preparación de medicinas ancestrales. Por tanto, aún no existen investigaciones suficientes para respaldar el uso de éstos frente a enfermedades crónicas, ciertos tipos de cáncer o enfermedades neurodegenerativas. Si bien, se ha descrito (Mokhber-Dezfuli *et al.*, 2014) que distintas partes de la planta de varias especies del género *Berberis* tienen propiedades medicinales, como: antimicrobianas, antieméticas, antipiréticas, antioxidantes, antiinflamatorias, antiarrítmicas, sedantes, anticolinérgicas, colecísticas y antimaláricas.

En cuanto a su composición, algunos autores (Ruiz *et al.*, 2013), han caracterizado el fruto de calafate como rico en antocianos glicosilados de delfinidina, petunidina, malvidina, peonidina y cianidina, siendo los más abundantes: delfinidina 3-O-glucósido, petunidina 3-O-glucósido, y malvidina 3-O-glucósido, con una alta capacidad antioxidante, similar a lo indicado para el maqui (*Aristotelia chilensis*), otro fruto parecido y más estudiado y empleado de la misma zona geográfica. Sin embargo, se ha visto que, incluso, al comparar con varias especies del género *Berberis* presentes en Chile, el calafate presenta mayor contenido de antocianos, que ninguno de ellos. Por su parte, Mariangel *et al.* (2013), analizaron muestras de diferentes localidades para determinar polifenoles totales, antocianos y capacidad antioxidante y concluyeron que aquellas que fueron tomadas del punto más meridional presentan mayor concentración de antocianos.

Otro aspecto importante para la salud, aparte de su considerable capacidad antioxidante, es la capacidad inhibitoria sobre la respuesta inflamatoria de la interacción entre adipocitos y macrófagos, por lo que es

considerado una herramienta terapéutica potencial contra las comorbilidades asociadas con el desarrollo de la obesidad (Reyes-Farias *et al.*, 2016; Reyes-Farias *et al.*, 2015).

También cabe destacar el potencial neuroprotector de los antocianos es su (Hwang *et al.*, 2017). La acetilcolinesterasa (AChE), una serina hidrolasa, es la principal responsable de la interrupción de la transmisión de la señal en el sistema colinérgico, debido a su notable potencial de hidrolización. Su sustrato, la acetilcolina (ACh), es un neurotransmisor del sistema colinérgico, con un efecto predominante sobre las neuronas motoras implicadas en la formación de la memoria. Por lo tanto, al disminuir la actividad de esta enzima mediante el empleo de inhibidores específicos, se pueden tratar varios trastornos (Khan *et al.*, 2018). La inhibición de esta enzima está relacionada con los tratamientos paliativos utilizados en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, debido a que cambios en su concentración se observan en estas enfermedades, aunque no son su causa. En cuanto a ensayos celulares para comprobar el efecto neuroprotector de ciertos compuestos bioactivos, se presenta la línea celular PC12, sensible a la proteína A $\beta$  y de fácil manipulación para el cultivo *in vitro*, sobre las cuales se puede trabajar sin sacrificar roedores (comúnmente usados en estudios neuronales) (Sáez-Orellana *et al.*, 2016). El método colorimétrico MTT con las células mencionadas permite identificar la reducción celular por toxicidad de los compuestos que se adicionen al medio de cultivo, así como la recuperación de la viabilidad celular (en caso de que los bioactivos, en efecto, faculten la neuroprotección).

La cantidad y tipo de polifenoles que se encuentran en las bayas depende del ambiente en el que la planta se desarrolla. Se ha demostrado que los flavonoides se acumulan con el estrés oxidativo, sin embargo, aún no se cuenta con una correlación espacio-temporal convincente con los productos de oxidación de flavonoides (Hernández *et al.*, 2009). Además del ambiente se debe considerar el estado fenológico de la planta (óptimo de maduración), ya

que este factor muestra una alta influencia en la concentración de compuestos fenólicos así como describieron Ruiz *et al.* (2013) para *B. microphylla*.

Dada la condición silvestre en la que el calafate se desarrolla, se desconoce si los ecotipos de este corresponden a la misma especie, ya que su expresión fenotípica es similar pero los contenidos de polifenoles varían (Mariángel *et al.*, 2013). Finalmente, no se descarta que si se analiza la correlación entre los factores que generan estrés abiótico y la concentración de polifenoles producidos a nivel de fruto se logre diferenciar entre distintos ecotipos y/o determinar qué características físico-químicas del fruto están directamente afectadas por la radiación y/o bajas temperaturas a las que está expuesto calafate.

No obstante, aunque los flavonoides se consideran un componente indispensable en una variedad de aplicaciones nutracéuticas, farmacéuticas, medicinales y cosméticas (Panche *et al.*, 2016), los beneficios que las bayas ofrecen, posterior a la ingesta, dependen de su bioaccesibilidad, biodisponibilidad y bioactividad, para ser depositados en el sitio “diana”. Además, algunos de estos compuestos son inestables, tal como se mencionó anteriormente, con los cambios de temperatura y pH, una vez que son aislados e incorporados en una matriz determinada, diferente a la natural, siendo necesario utilizar técnicas que permitan conservarlos, a la vez que faciliten su asimilación. En este sentido, la encapsulación es una alternativa muy empleada hoy día, con la finalidad de proteger el producto de la luz, el oxígeno y asegurar la liberación del producto, contenido en la cápsula, a velocidades controladas en condiciones específicas. Las dos técnicas más utilizadas en la industria alimentaria son el secado por aspersion (*Spray Drying*) y liofilización (*Freeze Drying*).

La promoción del calafate como fuente de compuestos bioactivos puede ser a través de bebidas naturales refrescantes y/o en combinación con otros



frutos (como los cítricos) para aprovechar los beneficios que estas frutas nos ofrecen. La formulación de bebidas funcionales con la adición de frutos cítricos como el Limón (*Citrus lemon L.*) y la Naranja (*Citrus sinensis L.*) pueden mejorar los parámetros de calidad, así como la estabilidad de los compuestos bioactivos. La actividad antioxidante de estos cítricos ha sido probada y se usan de forma generalizada en la industria alimentaria. En cuanto al procesado la pasteurización es una de las técnicas más utilizadas para mejorar la calidad y prolongar la vida útil del producto.

Con los antecedentes expuestos se propone la presente investigación para precisar la capacidad de los compuestos químicos del calafate, por su actividad captadora de radicales e inhibición de la colinesterasa, mediante la formulación y encapsulación de sus compuestos, de forma aislada o en mezclas, para ser utilizados como ingredientes funcionales probados mediante ensayos *in vitro* y la proyección de una bebida funcional en base a calafate.

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Químico Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción (Chile), en el Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables (LabFAS) del CEBAS-CSIC (España) y en la ETSIA (Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica) de la Universidad Politécnica de Cartagena (España), gracias al Proyecto Fondecyt 1160899 y al convenio de co-tutela internacional.

## 1.1 Antecedentes

Las bayas componen un grupo de frutos carnosos comestibles entre ellos frutillas, moras, frambuesas, arándanos, maqui, calafate, que han tenido un auge importante en los planes nutricionales y de salud de la población actual, dado que presentan, en su composición, una amplia gama de compuestos bioactivos, que les otorgan actividades biológicas, por lo cual se les ha llegado a considerar alimentos funcionales. Estas valiosas fuentes de fitoquímicos poseen un gran potencial para el desarrollo de productos alimenticios y nuevas opciones dietéticas para el tratamiento de enfermedades (Gironés-Villaplana *et al.* 2014), principalmente debido a que sus compuestos fenólicos, asociados con la protección frente a diferentes patologías, como distintos tipos de cáncer, acción antiinflamatoria, gastroprotectora, y antimicrobianas (Ruiz *et al.* 2014).

### 1.1.1 Calafate

#### *Distribución geográfica y descripción*

El género *Berberis* (Berberidaceae) incluye alrededor de 500 especies en todo el mundo, algunas de las cuales son ampliamente cultivadas en la zona central y del sudeste de Europa, América y Sur de Asia. Este género consiste en arbustos perennes espinosos de hoja caduca, caracterizados por poseer madera amarilla y flores del mismo color (Mokhber *et al.*, 2014). En Sudamérica se han descrito varias especies de este género (Camargo, 1966) y en Chile destacan *Berberis microphylla*, *Berberis empetrifolia* y *Berberis ilicifolia* (conocidos como calafate, calafatillo y michay respectivamente) y otras como *B. darwinii*, *B. serrato-dentata*, *B. montana*, *B. trigona* y *B. actinacanta* (Luebert y Pliscoff, 2006).

*B. microphylla* anteriormente descrita como *B. buxifolia* o *B. heterophylla* crece en suelos semiáridos de la región sur de Chile desde Tierra de Fuego

hasta la región de Maule y en la Patagonia Argentina (INIA, 2018). Está distribuido desde el nivel del mar hasta los 2500 m de altitud. Posee hojas aovadas brillantes, crece hasta los 150 cm, sus ramas son arqueadas y cubiertas de espinas, sus frutos son muy oscuros, casi negros (Figura 1). Dada su condición silvestre se presume que existen diversos ecotipos, ya que la respuesta de las plantas a niveles de estrés abiótico se expresa en adaptaciones que se presentan a nivel molecular, (expresión génica y síntesis proteica) o a nivel bioquímico (síntesis de nuevos metabolitos).



**Figura 1.** Fruto de calafate

#### *Estudios realizados en B. microphylla y otros Berberis*

Algunas especies del género *Berberis* tienen propiedades medicinales testeadas a partir de distintas partes de la planta (Mokhber-Dezfuli *et al.*, 2014). Estas propiedades incluyen: antimicrobianas, antieméticas, antipiréticas, antioxidantes, antiinflamatorias, antiarrítmicas, sedantes, anticolinérgicas, colecísticas, y antimaláricas. Así mismo, en diferentes órganos de la planta de *B. microphylla* se han encontrado alcaloides como la isoquinolina, con propiedades antimicrobianas, antivirales, insecticidas y actividades farmacológicas (Manosalva *et al.*, 2014),.

En el fruto de calafate se encontraron varios antocianos, derivados de glicosilados de delfinidina, petunidina, malvidina, peonidina y cianidina, siendo los más abundantes delfinidina 3-glucósido, petunidina 3-glucósido, y malvidina 3-glucósido (Ruiz *et al* 2013), con una alta capacidad antioxidante al igual que otro fruto característico de la zona, *Aristotelia chilensis* (maqui). Al comparar varias especies del género *Berberis* presentes en Chile, el calafate es el que presenta un mayor contenido en antocianos. Por su parte, Mariangel y colaboradores (2013), han demostrado que muestras de diferentes localidades presentan diferentes concentraciones de polifenoles totales, antocianos y capacidad antioxidante, por lo que concluyen que aquellas que fueron tomadas del punto más meridional presentan mayor cantidad de estos flavonoides coloreados.

Adicional a la considerable capacidad antioxidante de calafate, se ha demostrado que este fruto posee capacidad inhibitoria sobre la respuesta inflamatoria de la interacción entre adipocitos y macrófagos y, por ello, se puede considerar una herramienta terapéutica potencial contra las comorbilidades asociadas al desarrollo de la obesidad (Reyes-Farias *et al.*, 2016; Reyes-Farias *et al.*, 2015).

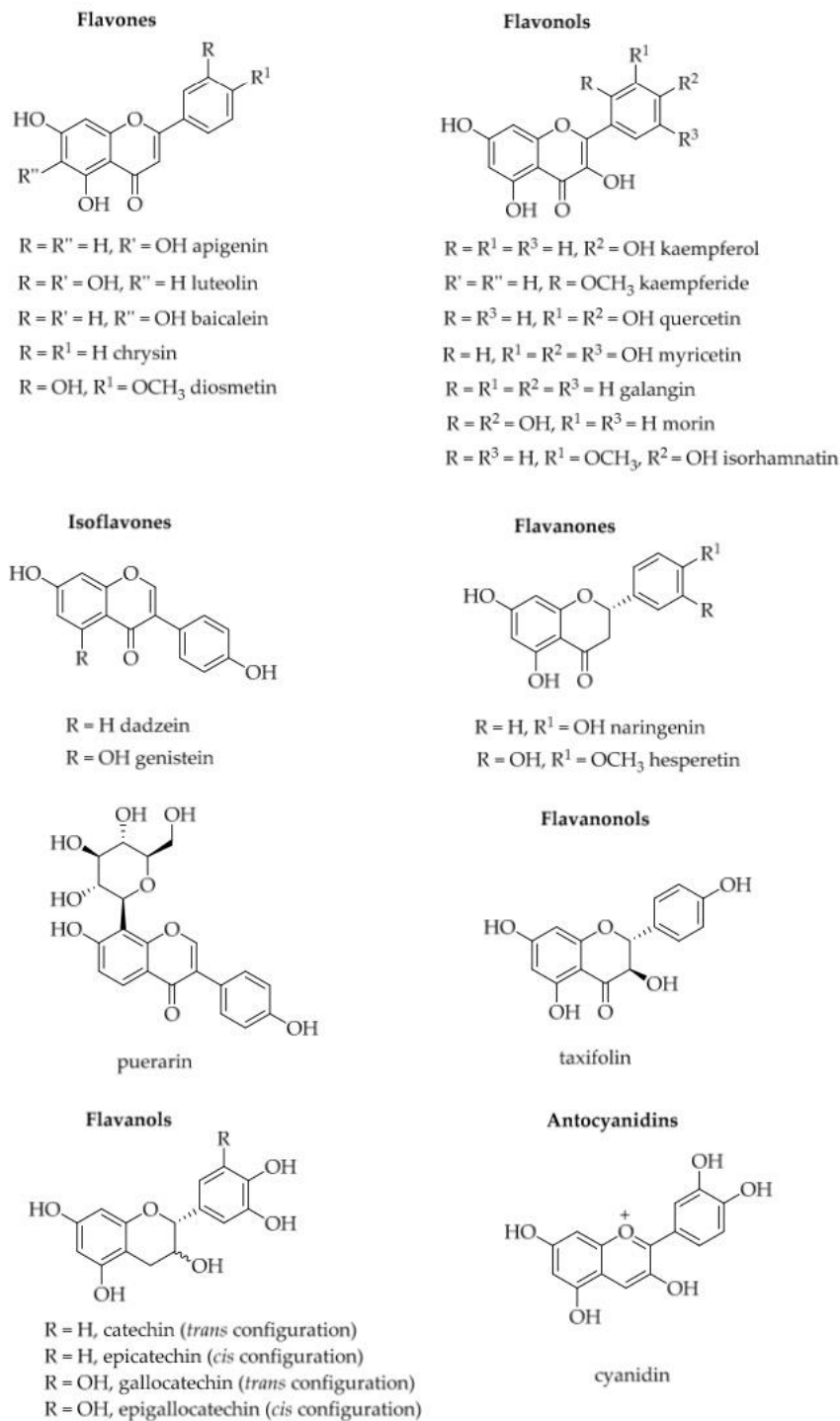
#### *Ecotipos y polifenoles*

La cantidad y tipo de polifenoles que se encuentran en las bayas depende del ambiente en el que la planta se desarrolla. Se ha demostrado que los flavonoides se acumulan con el estrés oxidativo, sin embargo, aún no se cuenta con una correlación espacio-temporal convincente con los productos de oxidación de flavonoides (Hernández *et al.*, 2009). Además del ambiente se debe considerar el estado fenológico de la planta (óptimo de maduración), ya que este factor influye en gran manera en la concentración de compuestos fenólicos, tal como describen Ruiz y colegas (2013), para el caso de *B. microphylla*.

Dada la condición silvestre en la que el calafate se desarrolla, se desconoce si los ecotipos de éste corresponden a la misma especie, ya que su expresión fenotípica es similar pero el contenido en polifenoles varía (Mariangel *et al.*, 2013). Así mismo, se ha reportado (Varas, 2012) que, aunque hay una apreciable diversidad genética que permite diferenciar con facilidad accesiones de diferentes procedencias, no hay sub-grupos estructurados por su origen geográfico genéticamente diferenciables. El programa de domesticación del calafate ejecutado por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA Kampenaike - Magallanes ha permitido caracterizar genéticamente 300 ecotipos en función del fruto (INIA, 2018). Finalmente, no se descarta que si se analizan los genes asociados a estrés abiótico (de manera particular estrés lumínico), se logren diferenciar, a nivel molecular, los distintos ecotipos.

#### 1.1.2 Flavonoides

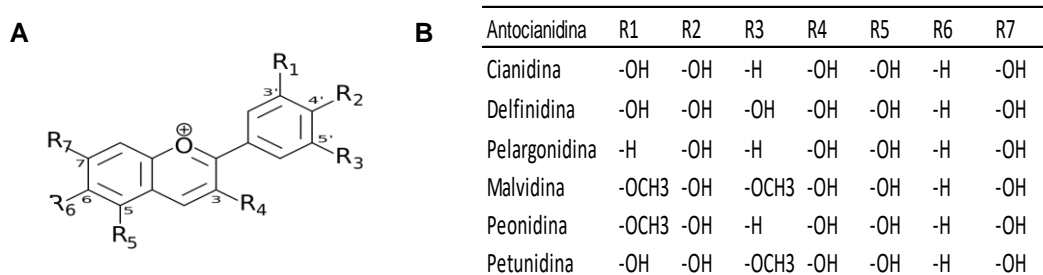
Los flavonoides corresponden a un grupo de compuestos químicos de bajo peso molecular ubicados en las vacuolas celulares y que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, de hecho, son los más numerosos y están distribuidos en plantas, animales y bacterias. Estos compuestos derivan de la ruta del shikimato y acetato-malonato, caracterizados por una estructura benzo- $\gamma$ -pirano (Amallesh *et al.*, 2011). Su estructura posee 15 carbonos, 2 anillos aromáticos conectados por 3 carbonos (Fig. 2). Los flavonoides en la actualidad se consideran un componente indispensable en una variedad de aplicaciones nutracéuticas, farmacéuticas, medicinales y cosméticas (Panche *et al.*, 2016). La diversidad de flavonoides contribuyen a los coloridos pigmentos de frutas, hierbas, vegetales y plantas medicinales (Dixon y Pasinetti, 2010), y comprende subgrupos como las flavonas, antocianos, flavonoles, flavanoles y flavanonas entre otras.



**Figura 2.** Flavonoides, estructura y clasificación (Modificada de Forzato *et al.*, 2020)

Los antocianos, son responsables del color rojo/azulado/púrpura de las flores y frutas (Fig. 3A), ayudando al buen funcionamiento de las plantas, ya que

actúan como señales alelopáticas, atrayentes o repelentes de insectos, al igual que como agentes protectores contra la luz UV y otros factores abióticos y bióticos. En cuanto al color, confieren una gran diversidad de colores, tocando prácticamente todos los espectros visibles, desde rojo hasta tonos púrpura y azul (Fernandes, 2014). Adicionalmente presentan propiedades relacionadas con la salud humana basado en su actividad antioxidante.



**Figura 3.** Estructura básica de las antocianidinas y listado de antocianidinas presentes en los frutos rojos

Existen alrededor de 300 antocianos, formas glicosiladas derivadas de las antocianidinas (agliconas), siendo las más comunes la cianidina, delfinidina, pelargonidina, peonidina, malvidina y petunidina, en frutos rojos (Fig. 3B). Su estabilidad está determinada por el grado de oxidación, temperatura, acidez y/o interacción con otros radicales y moléculas complejas. Los antocianos, como la malvidina 3-O-glucósido y la delfinidina 3-O-glucósido y la cianidina 3-O-glucósido son los compuestos predominantes en algunos frutos rojos comestibles (Braga *et al.*, 2018).

Otros compuestos de interés son las flavanonas presentes en los frutos cítricos. Hesperidina y eriocitrina son las principales flavanonas en el jugo de limón (Fu *et al.*, 2015) mientras que naringina, narirutina y hesperidina, son características de otros cítricos como la naranja (Kaderides *et al.*, 2020). Tanto la acidez como la concentración de los compuestos mencionados, depende de

la madurez de los frutos. La calidad nutricional de los cítricos depende de la cantidad y calidad de los macronutrientes y micronutrientes y de los compuestos bioactivos que contengan. Se ha demostrado la acción de compuestos presentes en cítricos como antioxidantes y antimicrobianos, para la modulación de enzimas desintoxicantes, estimulación del sistema inmunológico, reducción de la presión arterial, entre otros (Fallico *et al.*, 2017; Hwang *et al.*, 2017). Por tanto, la inclusión de los cítricos en alimentos funcionales es una prioridad para la industria alimentaria considerando a estos frutos como fuente de vitamina C y de compuestos bioactivos que aportan múltiples beneficios a la salud humana.

### 1.1.3 Actividad antioxidante

El estudio de los beneficios que estos compuestos derivados del metabolismo secundario tienen frente a la salud humana se ha reportado en numerosos estudios, presentando actividad antiinflamatoria (Read, 1995, Joseph *et al.*, 2014), frente al síndrome metabólico en adultos mayores o enfermedades crónicas como diabetes y obesidad (Tsuda, 2016) o problemas cardiovasculares (Wightman y Heuberger, 2015). La capacidad antioxidante de ciertos compuestos está directamente relacionada con la reducción o prevención de las enfermedades crónicas y degenerativas mencionadas (Del Rio *et al.*, 2013).

La actividad antioxidante está determinada por la facilidad que tienen los compuestos, ya descritos anteriormente para captar radicales libres o iones metálicos para evitar procesos oxidativos a nivel celular o de ADN y así aportar beneficios a la salud (Bondet y Berset, 1997). Es importante considerar que la actividad antioxidante está fuertemente correlacionada con el contenido total de compuestos fenólicos más que con el contenido de antocianos (Szajdek y Borowska 2008). Sin embargo, después de algunos estudios *in vivo*, actualmente se sabe que sólo ciertos compuestos antioxidantes ofrecen un verdadero beneficio para la salud ( Yang *et al.*, 2017).



La forma cuantitativa usada para la medición y expresión de la capacidad antioxidante de un compuesto depende del mecanismo de reacción; así, los métodos son: **a)** de transferencia de electrones - ET (Electrón Transfer) que comprende ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), FRAP (poder de reducción antioxidante del hierro) y CUPRAC (Capacidad de reducción antioxidante del cobre); y, **b)** Métodos de transferencia de átomos de Hidrógeno - HAT (Hydrogen Atom Transfer) entre los que se describe el ORAC (Capacidad de absorción del radical oxígeno), TRAP (Parámetro antioxidante de captura de radicales y LDL (Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad) (Gorog, 1995).

Los métodos tradicionales antes mencionados permiten conocer la capacidad antioxidante de los extractos *in vitro*, si con ROS (Reactive oxygen species), sustancias que no encontramos fisiológicamente en nuestro cuerpo. Por tanto, la combinación con ensayos de actividad antioxidante celular (CAA) permiten conocer la verdadera capacidad antioxidante (Huang, *et al.* 2014).

#### 1.1.4 Determinación de capacidades anti-neurodegenerativas

Los desórdenes degenerativos del sistema nervioso central abarcan una serie de dolencias que son incurables y debilitantes, y producen la degeneración progresiva y/o la muerte de las neuronas, que resultan en el deterioro de la función cognitiva (demencias), problemas con el movimiento (ataxias) intelecto, comportamiento y capacidad para realizar actividades de la vida diaria (Meilán y Gutiérrez, 2017). Entre las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes en la población mundial se mencionan Alzheimer (EA), Parkinson (EP), Huntington (EH) y Ataxia espinocerebelosa (AEC).

Según la Organización Mundial de la Salud, (2017), el Alzheimer representa un 60-70 % de las demencias en adultos mayores (alrededor de 50 millones de personas a nivel mundial). La etapa temprana de la EA puede

manifestarse a partir de los 45 años, sin embargo, a menudo pasa desapercibida ya que el inicio de la enfermedad es paulatino. Los síntomas más comunes incluyen: tendencia al olvido, pérdida de la noción del tiempo y desubicación espacial.

Por otro lado, los flavonoides han recibido considerable atención como candidatos alternativos para la terapia de Alzheimer teniendo en cuenta sus propiedades anti-amiloideogénicas, antioxidantes y antiinflamatorias (Khan *et al.*, 2018). La evidencia experimental respalda la hipótesis de que ciertos flavonoides pueden proteger contra la enfermedad de Alzheimer en parte al interferir con la generación y ensamblaje de péptidos amiloide- $\beta$  en agregados oligoméricos neurotóxicos y también al reducir los agregados tau.

Se han propuesto varios mecanismos para estudiar la capacidad de los flavonoides para prevenir el inicio o retrasar la progresión de la enfermedad. La interacción de los flavonoides con diferentes vías de señalización pone de manifiesto su potencial terapéutico para prevenir el inicio y la progresión de la enfermedad de Alzheimer y para promover el rendimiento cognitivo (Baptista *et al.*, 2014).

#### 1.1.4.1 Capacidad inhibitoria AChE y BuChE

La acetilcolinesterasa (AChE), una serina hidrolasa, es la principal responsable de la interrupción de la transmisión de la señal en el sistema colinérgico, debido a su notable potencial de hidrolización. Su sustrato, la acetilcolina (ACh), es un neurotransmisor del sistema colinérgico, con un efecto predominante sobre las neuronas motoras implicadas en la formación de la memoria. Por lo tanto, al disminuir la actividad de esta enzima mediante el empleo de inhibidores específicos, se pueden tratar varios trastornos (Khan *et al.*, 2018).

La inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) está relacionada con los tratamientos paliativos utilizados en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, debido a que cambios en su concentración se observan en estas enfermedades, aunque no son su causa.

#### 1.1.5 Ensayos celulares anti-amiloidogénicos

La  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ) es un péptido originado de la proteína precursora amiloide (APP), una glicoproteína transmembrana tipo I. Las fibras de  $A\beta$  son capaces de generar una toxicidad en el cerebro misma que está relacionada con trastornos neurodegenerativos como la EA. La toxicidad celular se evidencia por una disminución considerable del número de neuronas en áreas como la corteza o el hipocampo, mientras que la toxicidad sináptica implica una alteración generada por el péptido  $A\beta$  (Caballero, 2013). Estudios de toxicidad celular y sináptica en modelos *in vitro* e *in vivo*, permiten dilucidar el efecto que ciertas moléculas o compuestos bioactivos presentan para disminuir, retrasar o aliviar y detener los síntomas de la EA.

El uso de líneas celulares sensibles a  $A\beta$  es primordial para establecer ensayos que determinen las concentraciones óptimas de compuestos bioactivos con características anti amiloidogénicas, no obstante, diferentes autores no recomiendan el uso de cultivos primarios (obtenidos a partir de tejidos u órganos) sino de células subcultivadas como es el caso de las PC12. Esta línea celular (PC12), obtenida a partir de feocromotocoma (tumor tipo) de rata es ampliamente utilizadas por los péptidos  $\beta$  (1-39),  $\beta$  (1-40) y  $\beta$  (1-42) relacionadas con la toxicidad sináptica y la disminución de neuronas por muerte celular (Yu *et al.*, 2020). La valoración del efecto  $A\beta$  *versus* los compuestos bioactivos se realiza determinando la disminución de la viabilidad celular gracias a indicadores colorimétricos (por tinción), siendo el más utilizado el bromuro de 3-[4,5

dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). El ensayo de reducción MTT se determina por colorimetría. El MTT(amarillo) se integra a las mitocondrias de las células vivas por acción de la enzima succinato deshidrogenasa y el resultante es el formazán (azul oscuro).

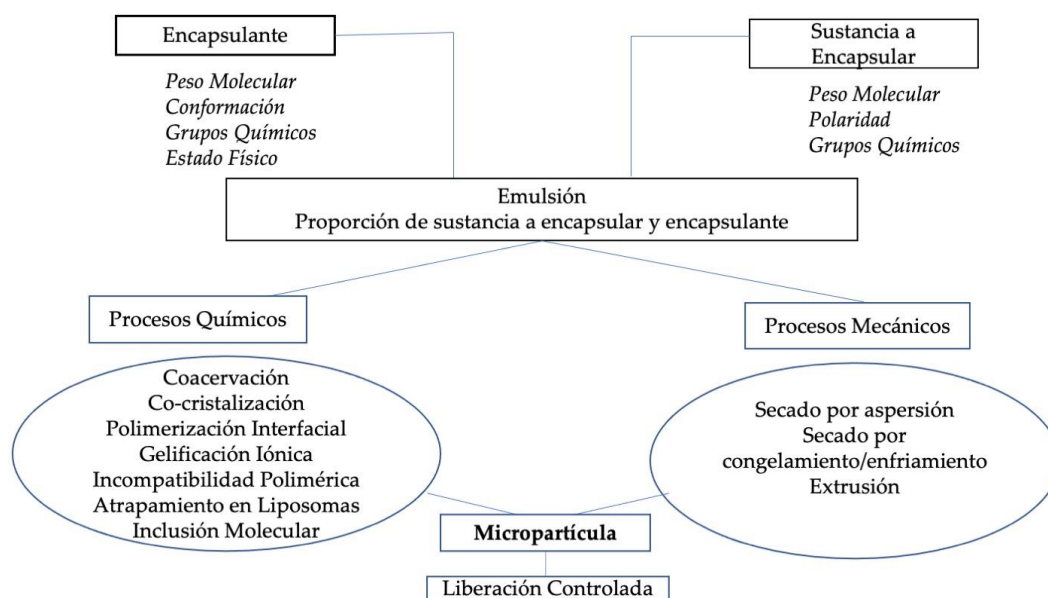
#### 1.1.6 Encapsulación

Una vez determinadas las propiedades biológicas de los compuestos polifenólicos presentes en las frutas, es importante considerar que, algunos de estos compuestos, son lábiles a factores ambientales. Además, a pesar de los beneficios que las bayas ofrecen, posterior a la ingesta, no todos sus compuestos bioactivos son asimilados y alcanzan su sitio “diana”. Esto puede ocurrir por la baja estabilidad de ciertos compuestos (como los antocianos) frente a cambios de pH y temperatura (Rodríguez *et al.*, 2016). Así, la encapsulación se realiza con la finalidad de proteger el producto encapsulado de la luz y el oxígeno y asegurar su liberación a velocidades controladas bajo condiciones específicas. La microencapsulación consiste en micropartículas conformadas por una membrana polimérica porosa (semipermeable), esférica, delgada y fuerte alrededor de un centro sólido/líquido. Las sustancias que se microencapsulan pueden ser vitaminas, minerales, colorantes, prebióticos, probióticos, nutracéuticos, antioxidantes, aceites, enzimas, bacterias, perfumes, fertilizantes, etc. (Parra, 2010).

Las técnicas de encapsulación se pueden dividir en dos grupos: químicos y mecánicos (Madene *et al.*, 2006), existiendo varios métodos (Figura 4). Los más utilizados en la industria alimentaria son el secado por aspersión y la liofilización. El secado por aspersión o “*Spray Drying*” ha sido el principal método utilizado para encapsular antocianos, sin embargo, las altas temperaturas con las que se trabaja resulta ser un factor determinante, ya que puede degradarlos rápidamente. Por lo tanto, se necesitan estudiar en profundidad para determinar

la estabilidad de las micropartículas de antocianos en matrices de alimentos y evaluar su biodisponibilidad (Robert and Fredes, 2015).

Para lograr con éxito la liberación deben tenerse en cuenta los siguientes aspectos: selección de la membrana, naturaleza química, morfología, temperatura de transición. Los métodos de liberación de las cápsulas se pueden llevar a cabo por disolución normal reacciones químicas y enzimáticas o por cambios en la presión osmótica. La eficiencia de la liberación controlada, principalmente depende de la composición y estructura de la pared, pero también de las condiciones de operación durante la producción y uso de estas partículas (temperatura, pH, presión, humedad) (Parra, 2010).

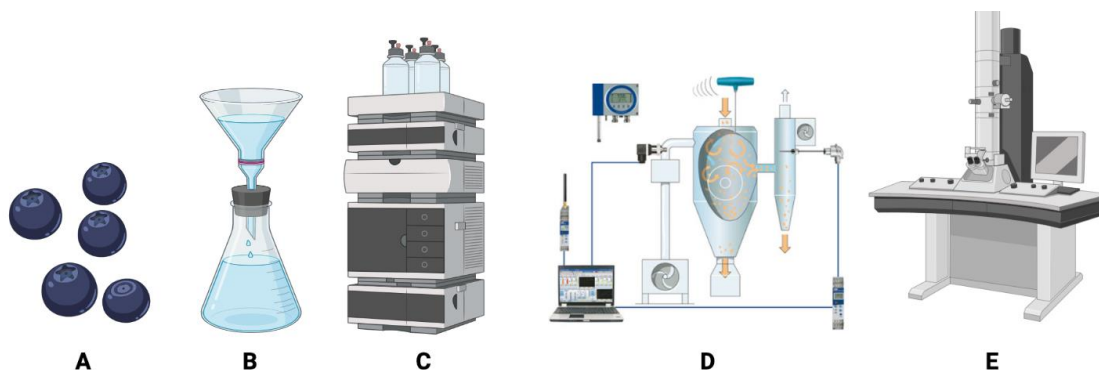


**Figura 4.** Encapsulación, material a encapsular, agentes encapsulantes y clasificación según tipo de proceso (Madene, *et al.*, 2006).

Otro tema importante es la interacción de los polifenoles con la matriz de los alimentos, debido a la presencia de componentes como proteínas, azúcares, carbohidratos y lípidos, ya que algunas interacciones entre los componentes podrían modificar las propiedades fisicoquímicas, afectando la calidad nutricional. Por tanto, las interacciones y aplicaciones *in vitro* y estudios *in vivo* son cruciales en la formulación de nuevos alimentos (Baenas *et al.*, 2018).

Los alimentos funcionales y los nuevos alimentos enriquecidos con compuestos bioactivos son una forma eficaz de proporcionar agentes beneficiosos, que reducen los riesgos de padecer enfermedades. Productos como yogures, cereales, productos lácteos, helados (Iriundo-DeHond *et al.*, 2018), bebidas y jugos de frutas y verduras se pueden colorear utilizando antocianos obtenidos de frutos rojos (Craig, 2016). Las investigaciones han demostrado que el estudio de la bioaccesibilidad y bioactividad de los compuestos fenólicos son decisivas para asegurar la eficacia de los nuevos productos alimenticios a base de frutos rojos. Las formas descritas para enriquecer los suplementos dietéticos lácteos incluyen en ellos moléculas bioactivas para mejorar la calidad de los alimentos, con el fin de prevenir enfermedades crónicas. De hecho, se están administrando alimentos, bebidas y suplementos dietéticos a personas mayores con cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Sarkar and Shetty, 2014).

Además de su efecto beneficioso para la salud, los antocianos de las bayas también tienen gran importancia a nivel organoléptico, ya que pueden emplearse como colorantes naturales (potenciando o añadiendo color), conservante (reduciendo o previniendo el crecimiento microbiano y perdurando la vida útil), antioxidante (inhibiendo el deterioro oxidativo) o estabilizadores, entre otros. Así, los extractos ricos en antocianos de arándanos y los propios arándanos rojos poseen una gran actividad antimicrobiana y podrían, potencialmente, explotarse como nuevos aditivos alimentarios naturales (Garzón, 2008).



**Figura 5.** Proceso de extracción y encapsulación de compuestos polifenólicos por Spray Drying. A. Frutos rojos. B. Extracción etanólica, C. Identificación de compuestos por HPLC D. Encapsulación E. Evaluación de morfología de encapsulados.

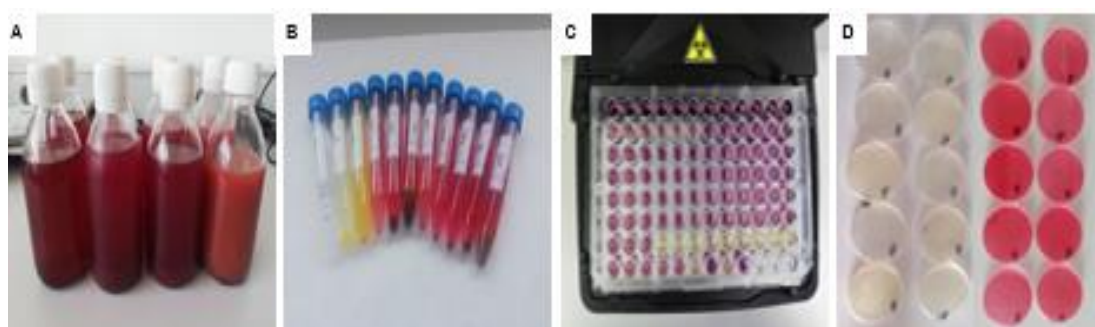
Para la identificación, cuantificación y caracterización de los compuestos presentes en frutos, microcápsulas (Figura 5) o en formulaciones de bebidas funcionales, se utilizan herramientas analíticas avanzadas (cromatografía líquida – HPLC) con alternativas de detección que incluyen detector de diodo (DAD) y espectrometría de masas (MS) (Nahar *et al.*, 2020; Simirgiotis *et al.*, 2013). Estos métodos son selectivos y sensibles y además de la caracterización de compuestos permiten identificar y cuantificar los cambios en el procesamiento y durante el tiempo de almacén (Yan *et al.*, 2020). La ventaja de esta técnica es que permite la detección simultánea de varios compuestos fenólicos en un solo análisis, reduciendo el tiempo y costos del análisis.

#### 1.1.7 Factores a tener en cuenta en las formulaciones y desarrollo de bebidas saludables, para la industria alimentaria

Los alimentos funcionales son una forma eficaz de administrar agentes beneficiosos que reducen el riesgo de enfermedades, desarrollan características nutricionales que promueven la salud o aumentan y añaden características funcionales a los alimentos. Para ello, debe considerarse la solubilidad y la

interacción de los bioactivos con la matriz cuando se desarrolla una formulación (Łukasz Sęczyk *et al.*, 2017) ya que, en algunos casos, en lugar de aportar beneficios, la interacción podría degradar uno o varios compuestos de interés. Es ideal que entre los frutos que se utilicen en la formulación exista un sinergismo que potencie el producto final. Por otro lado, los estudios encontrados en la literatura muestran que la matriz alimentaria ejerce un impacto sobre la bioaccesibilidad de compuestos funcionales y nutricionales. La combinación de frutos cítricos y frutos rojos es una opción muy prometedora para formular una bebida funcional ya que se añaden los antocianos, de los frutos rojos, a las flavanonas, de los cítricos (González-Molina *et al.*, 2010).

El procesado para la elaboración de bebidas es otro punto clave antes del escalado a nivel industrial (Fig. 6). Durante este paso, algunos de los compuestos también pueden sufrir cambios irreversibles en detrimento de la calidad (cambios de color) y la degradación de compuestos bioactivos. Al respecto, se ha demostrado que la temperatura es un factor clave ciertos compuestos como los antocianos (Calabi *et al.*, 2013). Además, las condiciones de almacenamiento de las bebidas pueden influir en su vida útil; por ello, el estudio del envase, la luz, el intercambio gaseoso o las atmósferas controladas pueden mejorar o empeorar la estabilidad de los compuestos bioactivos, con gran influencia en la calidad del producto final.



**Figura 6.** Preparación de bebida funcional. A. Formulación y pasteurización; B. Determinación de parámetros físico-químicos; C. Análisis de propiedades biológicas D. Análisis microbiológico



En cuanto a los parámetros de calidad la determinación del color es un factor importante. El método colorimétrico CIE  $L^* a^* b^*$  es uno de los más utilizados para el análisis, cuantificación y caracterización objetiva del color (Durmus, 2020). Finalmente, la inocuidad de los alimentos en general es primordial, sobre todo cuando a partir de un proceso se quiere generar un nuevo producto funcional. Aplicar un tratamiento térmico se puede reducir o destruir los microorganismos existentes e inactivar enzimas que puedan degenerar la calidad del producto.

## Chapter II

---

# Hypothesis and Objectives

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

La encapsulación de los compuestos bioactivos (principalmente antocianos) del calafate puede otorgar estabilidad y mayor disponibilidad, para ser incluidos en diferentes productos alimentarios.

### Objetivos

Analizar e identificar los compuestos bioactivos, presentes en el calafate, con el fin de estudiar las ventajas de su encapsulación para el desarrollo de ingredientes funcionales o bebidas saludables.

### Objetivos específicos

1. Determinar la influencia de la zona geográfica, en el perfil fitoquímico del calafate.
2. Evaluar el potencial antioxidante de extractos de calafate mediante técnicas espectrofotométricas y ensayos enzimáticos.
3. Formular microencapsulaciones de los compuestos bioactivos de calafate y evaluar su estabilidad.
4. Determinar la actividad biológica de los microencapsulados, mediante ensayos *in vitro* (cultivos celulares).
5. Desarrollar una bebida modelo a base de calafate.

### Hypothesis

## **Hypothesis**

The encapsulation of calafate bioactive compounds (mainly anthocyanins) can provide stability to these compounds in order to be included in different food products.

## **Objectives**

To analyze and identify the bioactive compounds present in calafate, in order to study the advantages of its encapsulation for the development of functional ingredients or healthy beverages.

### Specific objectives

1. To determine the influence of the geographical area on the phytochemical profile of calafate.
2. To evaluate the antioxidant potential of calafate berry extracts using spectrophotometric techniques and enzymatic assays.
3. To formulate microcapsules of calafate compounds and evaluate their stability.
4. To determine the biological activity of calafate microencapsules by *in vitro* tests (cell cultures).
5. To develop a model drink based on calafate.

## Chapter III

---

# Calafate facing climate changes

### III. Native species facing climate changes: Response of calafate berries to low temperature and UV radiation

María Eugenia Romero-Román <sup>1,3\*</sup>, Mauricio Schoebitz <sup>1</sup>, Richard M. Bastías <sup>1</sup>, Cristina García-Viguera <sup>2,4</sup>, Pablo S. Fernández <sup>3,4</sup>, and María Dolores López-Belchi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Concepción, Chile;

<sup>2</sup> Phytochemistry Lab. Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS (CSIC), 30100 Campus University Espinardo, Murcia, Spain.

<sup>3</sup> Food Engineering and Agricultural Equipment Department, Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, España

<sup>4</sup> Unidad Asociada de Calidad y Evaluación de Riesgos de Alimentos, CEBAS (CSIC) – UPCT, España.

Artículo publicado en la revista FOODS, 2021, volumen 10 numero 1, p 1-13

#### 3.1 Abstract

Calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) is a wild bush plant widely distributed in the south of Argentina and Chile. Their blue colored fruits present particular flavor and health benefits attributed to high polyphenols contents biosynthesized by the plant under stress. Studies about correlation of abiotic conditions with anthocyanin profiles and physicochemical features of calafate beneath wild origin environment is not described yet. Hence, this research aimed to evaluate the physicochemical changes, antioxidant activity and anthocyanin content of calafate fruit in relationship to UV solar radiation ( $W.m^{-2}$ ) and air temperature ( $^{\circ}C$ ) environment condition during three consecutive years (2017, 2018, 2019). Variations in fruit anthocyanins were determined by comparison between HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> and CIEL<sup>\*</sup>*a*<sup>\*</sup>*b*<sup>\*</sup> colors parameters. Correlations were analyzed by principal component analysis (PCA). Radiation was negatively correlated with fruit size and weight. Physicochemical aspects as pH, soluble

solids, color, total anthocyanins, flavonols and other phenolic compounds were positively correlated with temperature changes. The quantities of monomeric anthocyanins were dependent on both low temperature and global radiation (reaching 20.01 mg g<sup>-1</sup> FW in calafate fruit). These results constitute a valuable resource to understand the structural and physiological plasticity of calafate to face climate changes, for future domestication researches as well as for agri-food industrial application.

**Keywords:** Native Chilean berry; antioxidant activity; UV radiation, temperature influence; PCA; food security; climate change.

### 3.2 Introduction

Anthocyanins are natural compounds derived from secondary metabolism in plants and they are the second most common bioactive compound present in berry fruits, such as blueberries, raspberries and strawberries (Khoo *et al.*, 2017). Calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) is one of the native perennial bushes widely expanded in Southern climate locations of Chile. Similar to other berries, calafate fruit contains vitamins, minerals, fiber and a particular flavor (acid and sort of astringency) (Mariángel *et al.*, 2013). The importance of this fruit is due to the high polyphenolic compounds, probably related to the extreme environmental conditions where calafate grows and its biological properties (Manosalva *et al.*, 2016; Salehi *et al.*, 2019). The nutritional composition of calafate is described as 4.8 g 100 g<sup>-1</sup> fatty acids, 8.37 g 100 g<sup>-1</sup> fiber, 13 g 100 g<sup>-1</sup> proteins and 70 g 100 g<sup>-1</sup> of humidity (Araya, 2010), like, the high delphinidin, delphinidin-derivatives contents and some other anthocyanins (Ruiz *et al.*, 2010). Regarding to these compounds, calafate is considered “superfruit” (Mariángel *et al.*, 2013) and look toward an agro-industrial potential specially in functional food matter.

In recent studies the changes in shape, size and structure of leaves of *B. microphylla* have shown in terms of higher temperatures for genetic improvement purposes (Radice & Arena, 2015) . Similarly, the effect of fertilization and irradiance was measured in terms of changes in leaves pigments (Arena *et al.*, 2020) as well as the ethylene response in calafate fruits after harvest (Rodoni *et al.*, 2014). As described, previous work has only addressed the physical variations in calafate but the physicochemical in relation with climate changes still remain to be studied. Since chemical structure of anthocyanins in fruit can easily change by variations in particular environmental conditions, it is crucial to understand how these environmental changes influence on anthocyanins pattern in calafate, as well its correlation with these environmental conditions. In some berries such as *Vaccinium corymbosum*, researchers indicated that light conditions and temperature had an important role on the fruit phenolic compounds (Eichholz *et al.*, 2011). The comparison between different southern Chilean locations has confirmed differences in calafate's anthocyanins content (Mariángel *et al.*, 2013). Nevertheless, there still have several constraints about the correlation between years of production and the influence of abiotic stress in anthocyanin contents tackling the climate changes.

*B. microphylla* grows under wild conditions in Chile from Maule region (34°35'50" S) to Tierra de Fuego (54°36'48.55"S) but mainly in Patagonia zone. This shrub can spring up in a wide range of altitude from 0 to 2500 m.a.s (Camargo, 1966). In Aysén region, *B. microphylla* and other *Berberidaceae* are found from the coast to the Patagonian steppe, being calafate a characteristic shrub of anthropic grasslands (Silva, 2013). The climate in Chilean Patagonia is Andean boreal with 1000-1200 mm rainfall per year, mean air temperature of 4.4°C and global radiation 5000-6000 W.m<sup>-2</sup> (Hepp & Stolpe, 2014). Under these conditions calafate blooms from November to December, while veraison to ripening stages occurs between January to March. However, other authors mentioned that calafate phenological stages depend directly on the geographical distribution and altitude. Hence, blooming is earlier in the north of the Aysén



region 44°27'27.83"S, 73°8'14.78"O) and later in the south (48°28'07"S, 72°33'33"O), while, regarding the elevation, the best productive behaviour of calafate is in the coast where rainfall is higher (Salinas *et al.*, 2019).

The Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) predicts 1-3 °C rainfall and temperatures increases patterns as consequence of a decrease in snowfall (Magrin *et al.*, 2014), and changes on UV radiation by alterations of the amounts of ozone, aerosols, and clouds in the atmosphere (F. Bais *et al.*, 2015). This data suggest that climate change could deteriorate crops in general including berry fields by affecting its production and, this effect of high temperatures on anthocyanin content is relevant for these berries considering its potential for food industry. This information has not yet elucidated and might contribute to plan a better management in the domestication to maintain the anthocyanin berries content. Consequently, we hypothesize as consequence of extreme UV solar radiation exposure and lower temperatures, the synthesis of phenolic compounds in calafate berries can be highly stimulated. With all this background, the present research aimed to evaluate physicochemical characterization and antioxidant activity and phenolic content of calafate berries as related with the environmental conditions UV radiation and air temperature from three continuous years (2017, 2018, 2019). We include phenolic identification complimented by analytical methods high performance liquid chromatography (HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>) and *CIEL* \*a\*b\* color parameters determination. The correlation of color, phytochemicals and antioxidant activity were done by Principal Component Analysis (PCA) method.

### **3.3 Materials and Methods**

#### *3.3.1 Plant material*

During three continuous years (2017, 2018, 2019), ripen calafate berries were obtained between last week of February and first week of March taking into

account the recommended harvest time (Arribillaga G., 2001). Fruits (1 kg per year), were collected by hand detached from 10 random shrubs of a natural population of calafate shrubs near Balmaceda, Coyhaique, Aysén region (45°33'18" S, 71°50'38.399" O), 800 m above sea level. Calafate berries were kept on freeze until they were used for analysis.

### 3.3.2 *Chemical reagents*

The analytical grade reagents (formic acid, acetonitrile, methanol and water), as well as sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), potassium chloride, the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH<sup>\*</sup>), Trolox,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , HCl, TPTZ were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Commercial standards of delphinidin 3-glucoside (98.84 %), cyanidin 3-glucoside (99.21 %) from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 3.3.3 *Meteorological data information*

Environmental conditions (UV global radiation and temperature) were studied from Teniente Vidal Station, Coyhaique in Aysén region (45°33'18" S, 71°50'38.399" O), where calafate is found in abundance. The information corresponded of three continuous periods of time called: 2017 (from October 2016 to March 2017); 2018 (October 2017 to March 2018); and 2019 (from October 2018 to March 2019). The minimum temperature was taken between 8 pm (day before) and 8 am (day registered). Similarly, degree days threshold 10 °C and global/accumulated radiation were registered daily. The radiation data corresponds to the monitoring of global and accumulated radiation recorded in the weather station mentioned above according to their frequency during the day in the mentioned periods.

### 3.3.4 *Sample preparation*

Frozen fruit pulp (100 g calafate berries) was ground, and 50 mg of the resulting powder, was poured into 15 mL of 25:24:1 (methanol: water: formic acid) for each sample. The slurry was stirred for 5 min and centrifuged at 10000

rev.min<sup>-1</sup> for 10 min. The supernatant was separated in 15 mL tubes. Next the tubes were merged in ultrasound (1 hour) and kept at 4°C overnight (López *et al.*, 2018). Independent extracts were prepared for each year samples and the aliquots were storage at -20°C.

### 3.3.5 *Physical and chemical parameters*

The morphological and chemical estimations were carried out by the use of a bulk of randomized calafate fruits per year. Equatorial and polar diameters of 20 calafate berries and weight in 100 fruits of each year were measured in triplicates. The pH, soluble solids and acidity were obtained from the grounded fruits as indicated in the section of sample preparation. The measurement of the pH was done with a digital pH meter INOLAB series PH7110 (Merck, Darmstadt, Germany). The soluble solids determination using a SPER SCIENTIFIC series 300010 refractometer (Scottsdale, USA) and expressing the results in °Brix. Acidity was determined by titration with NaOH 0.1 M from 0.5 g of crushed sample diluted in 150 mL of distilled water (Romero Román *et al.*, 2019) The color parameters CIEL \*a\* b\* , as well as C\* (Color saturation) and °H (Hue angle, tan<sup>-1</sup> (b/a) were measured as previously (Cesa *et al.*, 2017), measured with a PCE-CSM 2 colorimeter (Hunter Lab®, Germany). It was calibrated with white disk plate before reading and 9 measurements per year were made (n=27).

### 3.3.6 *Identification and quantification of anthocyanins, flavonols and other phenolic compounds*

The calafate anthocyanins, flavonols and other phenolic compounds were identified according to their UV spectra, order of elution, and MS/MS fragmentations, as previously described for similar acquisition conditions. The HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> analyses were carried out on an Agilent HPLC 1100 series equipped with a photodiode array detector and a mass detector in series (Agilent, Waldbronn, Germany). The equipment consisted of a binary pump (model G1312A), an autosampler (model G1313A), a degasser (model G1322A) and a

photodiode array detector (model G1315B). The HPLC system was controlled by ChemStation software (Agilent, version 08.03). The mass detector was an ion trap spectrometer (model G2445A) equipped with an ESI interface and controlled by LCMSD software (Agilent, version 4.1). The ionization conditions were adjusted to 350°C and 4kV for capillary temperature and voltage, respectively. The nebulizer pressure and flow rate of N were 65.0 psi and 11 L min<sup>-1</sup>, respectively. The full-scan mass covered the range from m/z 100 up to m/z 1200. Collision-induced fragmentation experiments were performed in the ion trap using helium as the collision gas, with voltage ramping cycles from 0.3 up to 2 V. MS data were acquired in positive ionization mode for anthocyanins. MS<sup>n</sup> was carried out in automatic mode on more abundant fragment ion in MS<sup>(n-1)</sup> (Salar *et al.*, 2020).

The quantification of anthocyanins, flavonols and other phenolic compounds were held with the aliquots aforementioned in sample preparation section, filtered through a 0.22 µm PVDF membrane (Millex V13, Millipore, Bedford, MA, USA). The quantitative analysis was carried out with similar conditions as reported before (Agulló *et al.*, 2020) using an Agilent Technologies 1220 Infinity Liquid Chromatograph equipped with an autoinjector (G1313, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and a Diode Array Detector (1260, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The chromatographic system Phenomenex (Torrens, CA, USA) was adapted with a Luna 5 µm C18, 100 Å column (250 × 4.6 mm) and Security Guard Cartridges PFD C18 4 × 3.0 mm were used. The chromatographic separation was performed with 1% formic acid and methanol as mobile phases A and B, respectively, with a flow rate of 0.9 mL min<sup>-1</sup>. The linear gradient (time, %B) was as follows: (0, 15 %); (20, 30 %); (30, 40 %); (35, 60 %); (40, 90 %); (44, 90 %), and back to initial conditions for column stabilization (10 min) until 70 min. The analyses procedure was based on calibration curves using the following standards: cyanidin 3-O-glucoside at 520 nm for anthocyanins, quercetin 3-O-rutinoside at 360 nm for flavonols, 3-O-

caffeoylquinic acid at 320 nm for cinnamic and derivatives and expressed in mg g<sup>-1</sup>.

### 3.3.7 *Antioxidant capacity determination*

The antioxidant activity by free radical scavenging was performed by DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) while the antioxidant reducing capacity was carried out by FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power Assay). DPPH• assay carried out with 100 µL of the extract and 2.9 mL of the DPPH• solution, constant shakes and then incubated in darkness for 1 hour. The reading was taken at 515 nm and results expressed in µmol Trolox equivalents g<sup>-1</sup> of fresh weight sample (Bondet & Berset, 1997). In FRAP assay we used 30 µL of the extract (per sample), 300 µL of distilled water and the addition of 3000 µL of FRAP reagent (FeCl<sub>3</sub>-6 H<sub>2</sub>O 20 mM, TPTZ 10 mM and acetate buffer 0.3 mM) incubated at 37°C for 30 min (Benzie & Strain, 1996). All estimations were done at 595 nm absorbance in the spectrophotometer described above and expressed in µmol Trolox equivalents g<sup>-1</sup> of fresh weight sample.

### 3.3.8 *Statistical analysis*

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) at  $P < 0.05$  level of significance. Mean comparison was carried out by Tukey test at with significance level of 0.05. PCA was employed by mean centered and scaled data to determine the correlation between variables and the discrimination of anthocyanin contents of calafate and phytochemical characteristics in different conditions of global radiation and air temperature using R software (*RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>, s. f.)* by FactoMineR and ggplot2 (Wickham, 2011) package.

### 3.4 Results and Discussion

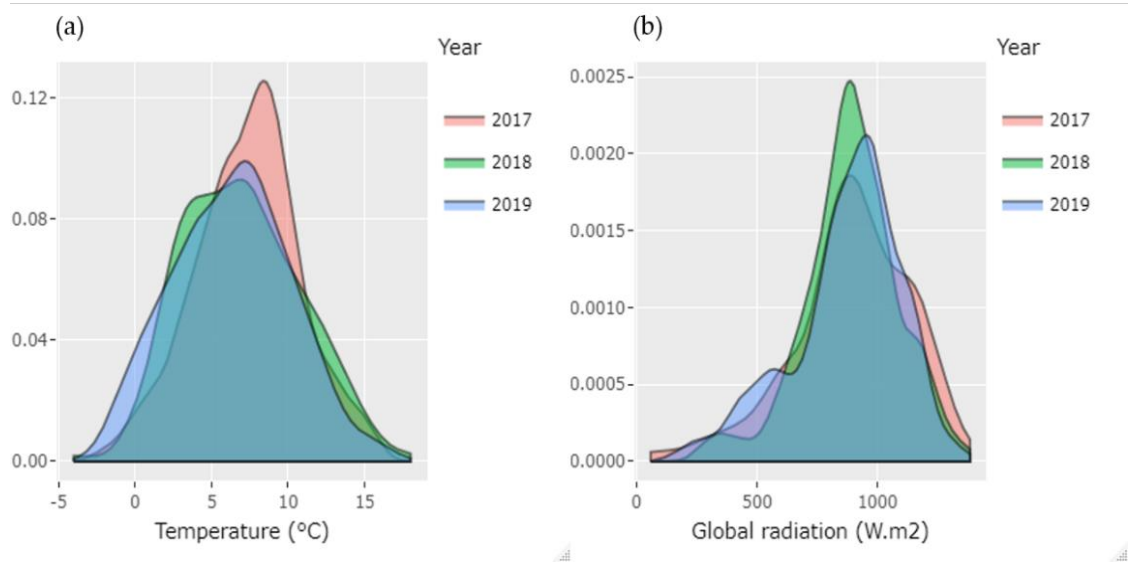
The results ahead we intend to provide information regarding the relationship of compounds present in calafate berries and the changes they may suffer due to the effect of climate change (solar radiation and temperature). Environmental constraints due to climate change can positively affect the production of bioactive compounds, but in some cases leading to detriment in quality parameters such as fruit weight. Plants produce specific metabolites as protective mechanisms during the acclimatization. These two processes improve the plant plasticity to cope the stress conditions and reduce the impact in the development as well as productivity. Knowing the interaction between environmental factors and physical-chemical parameters is a key approach to elucidate the reaction of calafate berry to climate change and can be a useful tool for domestication, support of agronomic management programs, and genetic improvement. Three years analyzing of calafate berries harvested in a native origin allows us to confirm the plasticity of this berry to adapt under particular solar radiation and temperature conditions at the southern zone of Chile.

#### 3.4.1 *Variation in environmental conditions*

Environmental factors stimulate the production of secondary metabolites in berries. To address this issue in calafate, we considered temperature and UV solar radiation since their relation with anthocyanins production. The data set of environmental parameters were obtained from the closest agrometeorological station as some authors recommend (Del-Castillo-Alonso *et al.*, 2016). The values considered for temperature were the minimum and maximum /day and degree days, whereas, regarding to solar UV radiation indexes the maximum radiation per day since October to March from three continuous periods of time (2016-2017, 2017-2018 and 2018-2019 called Year 2017, 2018 and 2019 respectively). The months mentioned, concur with the crucial stages of calafate berry production bud-break, veraison and harvest in the location studied. This

work was based on what was previously described for calafate in the area of Aysén (Salinas *et al.*, 2019), since in terms of phenology these periods are crucial for bioactive compounds production. Despite the fact that in other regions as Araucanía, the phenological stages of calafate are brought forward to July-December (Cardenas, 2012), while in the southernmost part of the country (Magellan region), it is delayed to October-March (Saavedra *et al.*, 2017). This variation is due to the geographical where the fruits were harvest.

Considering the temperature, the coldest time was during the 2019 (Fig. 7A) and the warmest was the 2018. The range of minimum temperature was -5 to 16°C and the mean peak was between 7 to 10 °C similar to registers for the last decade (Hepp & Stolpe, 2014), (whole register for maximum and minimum temperature and degree days are in Supplementary 1 and 2 correspondingly). The degree days is an important parameter, it is involved in the plant growth, development and production and it is also consider as relevant for the assessment of the impact of the climate change (Hykkerud *et al.*, 2018). This parameter was estimated using a threshold of 10°C (Gentilucci, 2017). Although, the year 2017 was neither the warmer nor the hottest, the degree days (DD) parameter was higher in this year (454.5 DD). Surprisingly the degree days decreased by period studied. Thus, 2018 recorded 442 DD and in year 2019 the accumulated degree days were 412.6 °C even though the year 2019 reported cold temperatures in day-to-day analysis reported above. In crops as grapes, it is described that cold periods during the veraison help the accumulation of secondary metabolites (Fernandes de Oliveira *et al.*, 2015). Although this work studied how low temperatures influenced the production of anthocyanins, it is important to note that high temperatures could significantly increase the problems generated by thermal and radiation stress in the production of berries as in calafate.



**Figure 7.** Minimum Temperature in °C (a) and maximum UV solar radiation /day ( $W m^{-2}$ ) (b) during three consecutive years (2017, 2018, 2019) of experimental period with calafate in Coyhaique.

For all years studied, the global solar radiation was notably intense in December, the highest value was  $1082 W m^{-2}$  (during 2017), while minimum values were observed in March during all the study time (Supplementary 1). Authors mentioned the optimum radiation recommended for berries as grape during bud break until harvest is  $700 W m^{-2}$  to have a good production with a considerable quantity of polyphenols (Nunes *et al.*, 2016). By density distribution shown (Fig. 7 B) we confirm that the 2017 was the one with the highest frequencies of UV radiation per day. In addition, the cumulative maximum radiation increased by year from  $5424.1$  to  $6001.1 W m^{-2}$ . Even if the differences by year are not significant in statistical terms, this tendency of increasing respond to the information brought by IPCC, estimating the UV radiation is rising gradually due to climate change (Magrin *et al.*, 2014). This increase in radiation represents almost 4 % accumulated in the 3 years of study. The analysis of temperature and radiation data, show the variation from previous years reported (*Portal de Servicios Climáticos - Dirección Meteorológica de Chile*, s. f.). It is described that the climate change would register an increase of the global temperature itself that has been more notorious in the zones closer to the poles (Pellicciotti *et al.*,



2014). Regarding radiation, the weakening of the ozone layer could determine a high radiation in the southern areas of Chile (Magrin *et al.*, 2014) and as a consequence this condition could affect the polyphenols production in calafate.

### 3.4.2 Physicochemical parameters

The morphological parameters bring a general view of the changes in calafate fruits of three consecutive years, in order to characterize it. Our results are described in Table 1. Calafate 2018 presents significantly lower values of weight, polar and equatorial diameter compared to the first and third year. As we noticed, this is a result of thermal amplitude observed that year, since, as low temperature for long periods as small are the berries produced for *plants* (Di Vittori *et al.*, 2018) . Ranges of pH 3.6 - 3.7 are in agreement about last year publication (Romero Román *et al.*, 2019) while, in acidity and soluble solids concern 2 % and 27.2 °Brix, data showed the highest values in the first year of this study. That year stand out because it presents lower temperature and higher radiation favouring stress in plants. It seems that the plant responds to the synthesis of sugars and the decrease of organic acids more because of these factors, since 2019 has a larger berry size, but the acidity is also lower as it was in 2018.

**Table 1** Physicochemical parameters of Calafate berries of three consecutive years (2017, 2018 and 2019)

Sample	Weight (g)	Equatorial diameter (mm)	Polar diameter (mm)	pH	Soluble solids (°Brix)	Acidity (%)
Calafate	0.60 ±	9.9 ± 0.04 <sup>ab</sup>	9.0 ± 0.06 <sup>a</sup>	3.61 ±	27.2 ± 0.10 <sup>b</sup>	2.0 ±
Calafate	0.50 ±	8.5 ± 0.38 <sup>a</sup>	7.8 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.66 ±	26.8 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.0 ±
Calafate	0.54 ±	10.3 ± 0.16 <sup>b</sup>	8.4 ± 0.50 <sup>c</sup>	3.7 ±	22.7 ± 0.37 <sup>a</sup>	0.9 ±

\*Different letters in the same column mean significant differences at (p≤0.05).

### 3.4.3 Analysis of CIEL \*a\*b\* values

Color can be affected by changes in pH, seasonal changes, environmental factors and it is also known that is an indicator of quality food as well as providing an estimation of the amount of antioxidant compounds contained in fruits, particularly in berries (Anuar *et al.*, 2017). To determine the influence of color on calafate anthocyanins, the CIEL \*a\*b\* space was used to compare color perception, hue angle, lightness and saturation. We found significant differences between the calafate fruits corresponding to 2017, 2018 and 2019 in all parameters, however,  $b^*$  describes a direct relationship with pH and the same relation is indirect with  $a^*$ . Color is an interesting parameter to correlate to anthocyanin content, however, it is not very easy to give an interpretation to the CIEL \*a\*b\* colorimetric analyses, mainly because data about calafate berries are not available in literature. In addition, results in this analysis are influenced by pH, temperature, oxygen content and also the observed Hue angle.

Colorimetric parameters of calafate berries of three years are reported in Table 2. The  $L^*$  value (29.47 – 33.78) represent the darkness of calafate samples. The  $a^*$  value, in the red region of the colorimetric space, ranged from 0.65 - 1.98, all of them positives, and the  $b^*$  value negatives (-0.08 to -2.21), in the yellow region of the colorimetric space, indicated the red-dark appearance of calafate relating with the high anthocyanin content. The values obtained in this study for calafate are comparable with blueberry (Cesa *et al.*, 2017) results considering that both berries are dark in their aspects, nonetheless the  $b^*$  parameter confirm calafate is even darker. The colorimetric parameters of  $a^*$  and  $b^*$  were probably the result of the influence of thermal stress by the thermal amplitude but not by the low temperatures according to our hypothesis. It is evident the dark purple color of calafate berries come from anthocyanins and we could confirm it along this study.

**Table 2** CIEL *a*<sup>\*</sup>*b*<sup>\*</sup> color parameters of calafate berries evaluated during three consecutive years: 2017, 2018 and 2019

Year / color parameter	<i>L</i> <sup>*</sup>	<i>a</i> <sup>*</sup>	<i>b</i> <sup>*</sup>	<i>c</i> <sup>*</sup>	H°	ΔE
2017	29.47 ± 7,5 <sup>a</sup>	0.61± 0,02 <sup>a</sup>	-0.08±0,21 <sup>a</sup>	1.59±0,14 <sup>a</sup>	7,71±0,11 <sup>a</sup>	2.35±0,05 <sup>a</sup>
2018	35.12± 6,20 <sup>b</sup>	1.05± 0,18 <sup>a</sup>	-0.88± 0,07 <sup>ab</sup>	2,48±0,43 <sup>ab</sup>	39,79±0,71 <sup>b</sup>	4.41±0,59 <sup>b</sup>
2019	33.78 ± 5,43 <sup>b</sup>	1.98± 0,08 <sup>b</sup>	-2.21±0,16 <sup>b</sup>	3.36±0,08 <sup>b</sup>	47,98±0,49 <sup>c</sup>	3.74±0,54 <sup>ab</sup>

Data are expressed as mean. Different subscript letters in the same column mean significant differences at P≤0.05.

#### 3.4.4 Comparison of calafate anthocyanin profile and other phenolic compounds

The separation and quantification of individual monomeric anthocyanins by HPLC-DAD brought us the main group of characteristic calafate's anthocyanins at 520 nm. The range was 14 - 20 mg g<sup>-1</sup> (Table 3). This results are comparable with those obtained for calafate fruits (15 mg g<sup>-1</sup>) in Argentinean Patagonia (Chamorro *et al.*, 2019). The location and environmental conditions are important because the quantification in other reference for the same Chilean berry, related to the anthocyanin content was lower (9.4 mg g<sup>-1</sup>) (López *et al.*, 2018). Eleven anthocyanidins were detected (Chromatogram is showed in Supplementary 3). We found similar calafate anthocyanins as the detected and reported before (Brito *et al.*, 2014). In this research we quantified 7 monomeric anthocyanin being predominant: Delphinidin 3-glucoside, Petunidin 3-rutinoside, Petunidin 3-glucoside, Malvidin 3-glucoside, while the minority were: Cyanidin 3-glucoside, Malvidin 3-rutinoside and Peonidin 3-glucoside.

No previous data regarding to relationship of particular anthocyanins of calafate with UV radiation and temperature in natural origin have been published before. As Fernandes de Oliveira reported the 3 glycoside conjugates anthocyanins are the majority due to the temperature and pH of the calafate berry extract as it happen in grapevine (Fernandes de Oliveira *et al.*, 2015). Furthermore, in this research the differences between the quantities of the

aforementioned calafate compounds, can be attributed to the studied environmental factor considering the correlation of temperature and anthocyanins described before. The 2018 had the higher frequency of hot days and was this period of time, which presented the higher quantification of anthocyanin. All the monomeric anthocyanins showed the same behaviour except for peonidin 3-glucoside which decreased in this period of time.

**Table 3.** Main anthocyanins, flavonols and other phenolic compounds detected by HPLC and found in Calafate berry of three consecutive years

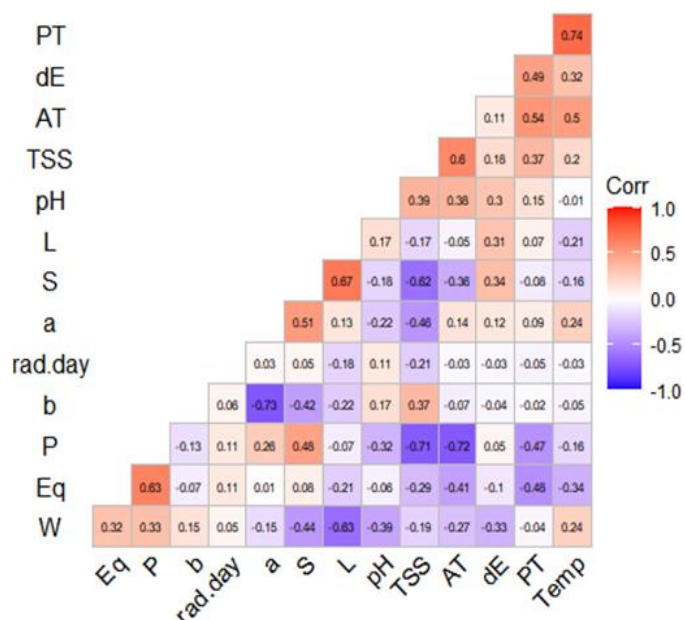
<b>Compounds</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>
Delphinidin 3-glucoside	10.68 b	11.60 a	9.78 ab
Cyanidin 3-glucoside	0.20 a	0.42 b	0.25 ab
Petunidin 3-glucoside	3.08 b	3.38 b	1.73 a
Petunidin 3-rutinoside	4.17 b	4.44 b	2.47 a
Peonidin 3-glucoside	0.03 ab	0.02 b	0.33 a
Malvidin 3-glucoside	0.35 c	0.03 a	0.14 b
Malvidin 3-rutinoside	0.10 b	0.12 c	0.07 a
<b>Sum of anthocyanins</b>	18.62 b	20.0 a	14.77 c
<b>Sum of flavonols and other phenolic compounds</b>	3.42 b	2.69 c	3.59 a
<b>Sum of phenolic compounds</b>	22.04b	22.69a	18.36c

<sup>1</sup> The values are expressed in mg g<sup>-1</sup>. Different superscript letters in the same row mean significant differences at (P≤0.05)

As higher was the anthocyanin content as lower was the *b*\* value denoting the negative correlation between these two parameters (Fig. 8.) and related to the *a*\* from green to red. Although, it is somewhat surprising, since the intense red of the calafate should have a high *b*\* component as well, as it becomes a red-purple-blue. Calafate even tackling the climate change is still a pigment producer by excellence.

The use of thermal or solar radiation stress could even be considered to stimulate anthocyanin production in calafate to cover the demand of the industry. In terms of flavonols, as described before (Ruiz *et al.*, 2010), myricetin, quercetin, isorhamnetin derivatives were detected. However, in this research we considered the sum of all flavonols and other phenolic compounds detected by

HPLC-DAD and contained in calafate samples per year. Thus, phenolic compound quantities (other than anthocyanins) (2.69 - 3.59 mg g<sup>-1</sup> sample FW) were similar to the results reported by López and colleagues (López *et al.*, 2018).



**Figure 8.** Matrix of correlation between UV solar radiation and temperature with physicochemical parameters of calafate berries. PT, polyphenols, dE, color differential ( $\Delta E$ ); AT, sum of individual anthocyanins; TSS, total soluble solids; pH, potential of Hydrogen.

The behaviour of flavonols can be attributed to UV radiation combined with the water deficit. Even if we did not consider that last parameter, some studies confirm it (Azuma *et al.*, 2012). Comparing the data of the sum of anthocyanins versus the sum of flavonols and other phenolic compounds, we found that as high was the anthocyanins as low were the flavonols and other phenolic compounds (20.0 mg g<sup>-1</sup> and 2.69 mg g<sup>-1</sup> respectively taking into account the year of 2018). This apparent lack of correlation between these compounds can be attributed to combination of radiation and temperature that promote the production of anthocyanins but high temperatures could diminish the flavonols quantities (Azuma *et al.*, 2012).

### 3.4.5 Antioxidant capacity in calafate berries

Calafate as other native berries as maqui are good sources of polyphenols (anthocyanins, flavonols and other phenolic compounds included) (Salehi *et al.*, 2019) and those compounds have been widely tested for their high antioxidant capacity and benefits to human health. Thus, the calafate berry extracts revealed the best antioxidant reaction for the 2017's. and showed in Table 4 (4.07 and 41.55  $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  FW for FRAP and DPPH respectively). The 2018 had the lowest antioxidant capacity regarding to FRAP method but differs to DPPH due to the difference of way of action in each method (reducing and scavenging radicals in order). This implies that there is a direct relationship between sum of anthocyanins and flavonols described in previous section and antioxidant capacity, observing how it was influenced by the high temperature and high radiation in the 2018, and therefore presenting a higher antioxidant capacity. As an experimental for calafate and Chilean strawberry, Lopez and colleagues reported slightly higher values for DPPH assay (51  $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  DW), although it was performed on dry matter.

**Table 4.** Antioxidant capacity by FRAP and DPPH\* assays of calafate berry for three consecutive years (2017, 2018 and 2019).

Year	FRAP	DPPH*
2017	4.07 $\pm$ 0.03 a	41.55 $\pm$ 0.96 b
2018	3.53 $\pm$ 0.07 a	36.47 $\pm$ 0.94 a
2019	4.12 $\pm$ 0.02 a	35.44 $\pm$ 0.11a

FRAP ( $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  of sample FW), DPPH\* ( $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  of sample FW). Different letters in the same column mean significant differences at ( $P \leq 0.05$ ).

To study the reasons of physical and chemical changes in calafate fruits we correlated the environmental parameters UV radiation and temperature. A correlation matrix (Fig. 8) to analyze the 2 climate factors and physic-chemical calafate parameters by Spearman test was used. Temperature showed

moderate correlation with metabolite contents similar to the reported while ago for grapes (Del-Castillo-Alonso *et al.*, 2016).

By the analysis, we also determined that anthocyanins and other phenolic compounds in calafate are directly related with parameters even if we consider three different years samples. Neither the color parameters with temperature or UV radiation nor the results were significantly inverse in anthocyanins when UV radiation is considered as an external factor (Fig. 8)

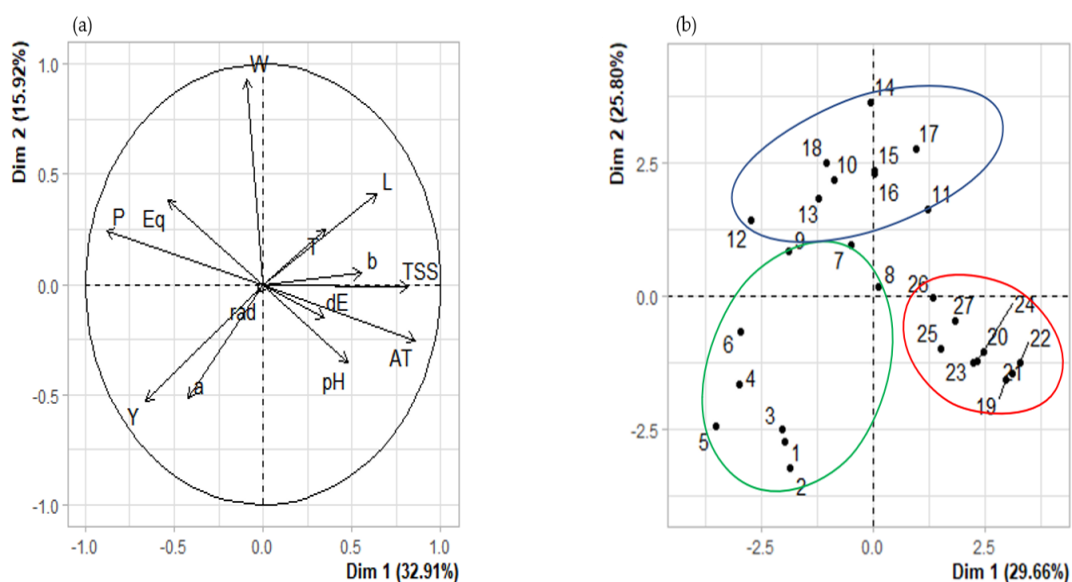
#### 3.4.6 *Correlations*

The analysis brought the higher correlation (0.74) between phenolic compounds and temperature, while negative correlations were established between soluble solids and polar diameter of calafate fruits (-0.72). It has been described that abiotic factors affect morphological aspects of berry production (Nunes *et al.*, 2016) as well as their nutritional and bioactive compound contents (Del-Castillo-Alonso *et al.*, 2016). This research confirms the results reported by Del Castillo regarding to phenolic compounds, nonetheless, in our research the morphological aspects of calafate did not show a strong relationship neither with temperature nor with UV global radiation. On the other hand, we also found that quantities of anthocyanins (were strongly disfavored when temperature stress was considered as the unique factor. Consequently, the combination of 2 abiotic factors (UV global radiation and temperature) less often affected physical parameters as fruit size and weight (Fig. 9).

Solar radiation exposure had a slight influence on parameters, such as size and weight. That influence is confirmed by the PCA analysis (Fig. 9a). In response to environmental limitations as UV radiation and low temperatures, the calafate display structural and physiological plasticity that allows it to adapt to different temperatures caused by the diurnal and seasonal rhythms associated with anthocyanin contents growing wild. Anthocyanins including delphinidin and

cyanidins were specifically down regulated by cold nor by UV radiation (Fernandes de Oliveira *et al.*, 2015).

Interestingly, these compounds are similar through ones reported in this research (Table 3). Non-colored polyphenols were not considered in this study. For the Figure 9b, it is mandatory to explain that in the PCA of individuals, the numbers from 1-9 correspond to 2017, 10-18 data from year 2018 and finally 19-27, 2019 underlining that even with the differences considered regarding to climate factors and morpho-chemical parameters they are grouped, as it happens with saffron samples grouped by location (Anuar *et al.*, 2017).



**Figure 9.** Principal component analysis (PCA) of physical and chemical variables of calafate berry extracts. P, polar diameter; Eq, equatorial diameter; W, weight; L, a, b CIEL \*a\*b\* components; D\_E, ΔE; TSS, total soluble solids; AT, Sum of individual anthocyanins; temperature; UV rad.day, maximum radiation per day



### 3.5 Conclusions

The described influence of solar radiation and temperature reveal the capacity of calafate to face climate changes, as a result, only a slight effect in the physical features. Nevertheless, physicochemical aspects, such as pH, soluble solids, color and anthocyanin contents were positively correlated with intra year temperature variations and less by intra year UV radiation variation. Being calafate considered as a potential for agronomic domestication and as health promoting food, this work contributes for better understanding how anthocyanins profiles, antioxidant capacity and other physicochemicals changes in the calafate fruits are related to UV global radiation and temperature factors. This knowledge could be useful tool for domestication and agronomic management programs of this native berry in Chile. Furthermore, these results contribute to understand the responses of calafate berries under changing climate conditions focusing on the food security (due to its condition of safe, nutritious and healthy berry to meet the nutritional needs) and also preservation of genetic material that represents a source of bioactive compounds. The next step is to start the domestication of calafate taking into consideration what is presented here and also to study the changes at a physiological and molecular level as an effect of climate change (stressors such as UV radiation and temperature) that occur in the calafate berries.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), S1: Temperature (maximum and minimum) registered day-to-day in Coyhaique, Aysén region during three consecutive periods of time A. 2016-2017 B. 2017-2018 and C. 2018-2019. S2: Degree days base 10 registered in Coyhaique, Aysén region during three consecutive periods of time Figure S3: HPLC chromatogram of calafate anthocyanins detected at 520 nm for the individual anthocyanin quantification.

**Author Contributions:** MER: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Resources, Visualization, Writing. MDL: Conceptualization, Methodology, Resources MS Writing review & editing and Conceptualization. RB Data curation and Writing review & editing. CGV Conceptualization, Writing, review & editing, Supervision. PF Review & Editing..

**Funding:** This work has been supported by FONDECYT grant 1160899 (CONICYT, Chile) and Secretary of Higher Education of Science, Technology and Innovation of Ecuador (SENESCYT, Ecuador).

**Acknowledgments:** Recognition and gratitude to the technicians of Chemical Analysis Laboratory, Department of Plant Production - University of Concepción, Chillán, María Cristina Romero for the graphical abstract design and Valeria Mansilla for the support in fruit harvest.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest

## Chapter IV

---

### Encapsulation of calafate

#### **IV. Beyond bioactive compounds from calafate berries encapsulated by Spray drying: Neurological activities**

**María Eugenia Romero-Román<sup>a</sup>, Mauricio Schoebitz<sup>b</sup>, Jorge Fuentealba<sup>c</sup>, Cristina García-Viguera<sup>d,e\*</sup>, María Dolores López<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción. Vicente Méndez #595, Chillán, 3780000; e-mail: mariaeugeromero@udec.cl

<sup>b</sup> Departamento de Suelos y Recursos Naturales, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Concepción, Chile, Universidad de Concepción, Víctor Lamas 1290, Concepción, 4030000; e-mail: mschoebitz@udec.cl

<sup>c</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Víctor Lamas 1290, Concepción, 4030000; e-mail: jorgefuentealba@udec.cl

<sup>d</sup> Food Engineering and Agricultural Equipment Department, Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, España. Tel. (+34) 968 325 905

<sup>e</sup> Unidad Asociada de Calidad y Evaluación de Riesgos de Alimentos, CEBAS (CSIC) – UPCT, España, e-mail: cgviguera@cebas.csic.es

Artículo enviado a Journal of Functional Foods, Abril 2021

##### **4.1 Abstract**

Calafate is a berry with high content of polyphenols, rich in anthocyanins mainly. Its compounds with particular properties to prevent and treat degenerative disorders, have not been studied yet. To profit the mentioned properties, calafate berry extracts were microencapsulated by Spray-drying and compared with freeze-drying as control. Stability and *in vitro* potential related with AChE activity and neuroprotection were measured in resulting microcapsules from temperature treatments and different content of encapsulant. Results indicated that Spray-dried microcapsules were stable despite high temperatures and encapsulation efficiency exhibited nearly 50%. The highest quantity of polyphenols and 3-O-glycosylated anthocyanins was obtained with 20% of maltodextrin at 120°C. Temperature did not affect the microcapsules biological action, demonstrated by the antioxidant activity. The

prevention of cytotoxicity of A $\beta$  peptide in PC12 cells (20%) reflected that encapsulated calafate can bring neuroprotection. To scale-up and produce new value-added calafate formulations with anti-neurodegenerative effects, Spray-drying is an appropriate technique.

**Keywords:** Anthocyanins, *Berberis microphylla*, encapsulation, functional ingredients, PC12 cells.

## 4.2 Introduction

Native Chilean berry, calafate (*Berberis microphylla* G. Forst), has been studied in the last decade due to its content of bioactive compounds. This fruit is an intense purple berry with a high anthocyanin content. It has been determined that calafate possesses 18 anthocyanins derived from glycosylated delphinidin, petunidin, malvidin, peonidin and cyanidin as well as some flavonols (quercetin, isorhamnetin and myricetin) (López *et al.*, 2018; Ruiz *et al.*, 2010). These aforementioned compounds have become a target to study, due to its beneficial properties for humans. Anthocyanins importance lies in the benefits to face chronic diseases and as a preventive treatment of degenerative disorders (Salehi *et al.*, 2019). In traditional medicine, calafate plant has been used for cold and fever (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2019) along with the roots as stimulants (Manosalva *et al.*, 2014). This antipyretic characteristic is due to some metabolites as alkaloids (Furriánca *et al.*, 2017). Similarly, other study described that phenolic compounds attribute to this wild plant special desirable qualities for nutraceutical and industrial purposes (López *et al.*, 2018). In addition, calafate and maqui, two Chilean berries, demonstrated regulated degradation of extracellular matrix by modulation of metalloproteinases and improved impaired glucose uptake induced by a pro-inflammatory treatment (Reyes-Farías

*et al.*, 2016). Nonetheless, the real potential of calafate phenolic compounds is still undetermined.

Meanwhile, in the market, the consumer interest in products based on exotic fruits and native berries as health promoters has increased. In these plant-origin products prepared, due to physical changes (light exposure, oxygen and pH), the quality, color, taste and the benefits of the bioactive compounds can be diminished (Iriundo-DeHond *et al.*, 2018). This hamper the use of these natural compounds as food pigments (Faustino *et al.*, 2019) and it can also limit the anthocyanins efficacy when they are used for biological purposes. In order to solve the above mentioned problems, techniques as encapsulation have been utilized. The most common used techniques in food industry are Spray and freeze drying. Furthermore, both techniques preserve the bioactive compounds for industrial purposes, bringing stability during storage as well as conferring resistant to pH changes along the intestinal tract (Saifullah *et al.*, 2019).

Spray-drying is a process which is widely used in large-scale production of encapsulated formulation, economical and adaptable, and produces an excellent quality of the product. In food industry, generally the matrix is an hygroscopic polymer that is safe for consumption and not reactive with the core whereas have their ability to seal and keep compounds inside of the capsule with pleasant taste and viable in economic terms (Gupta *et al.*, 2016). It can bring protection and stability to bioactive compounds, providing a physical barrier as well as masks off flavors. The process involves high temperatures in different spots of the equipment. In fact, as high is the inlet air temperature as dry is the final product. Another crucial point in this process is the relation between air: solution, considering humidity and solubility, and dispersibility of the final samples (Righi da Rosa *et al.*, 2019). All the steps mentioned above of this technique present some inconveniences in relation to losses of bioactive content, therefore, the process have to be optimized (Mahdavi *et al.*, 2016)

On the other hand, freeze drying is a process to separate the water of the samples by freezing and subsequent sublimation that is carried out in a vacuum and at a low temperature. It is a understated process to dry products without altering their qualitative or quantitative composition (Fredes *et al.*, 2018). The freeze dry process avoids the denaturation of compounds.

The advantage of these techniques is not only at an industrial level, but also offers stability to bioactives after ingestion, so they can increase or maintain their functionality. Nonetheless, freeze-drying is a slow process, and the production cost is elevated, therefore despite the drawbacks of working at high temperature Spray drying presents several advantages to take into account, as the applicability to scale up in the food industry as well as the faster process compared to freeze drying.

Studies with berries have demonstrated the effectiveness of both mentioned techniques to develop formulations to protect the bioactive compounds for natural colorants with improved stability, solubility, dispersibility, and bioavailability (Mahdavi *et al.*, 2014). In cancer studies, bilberry formulations were used to exhibit anticancer activity of anthocyanins and after the Spray drying, the chemo-preventive bioactivity of bilberry anthocyanins still remained (Thibado *et al.*, 2018). In addition, it has been shown that formulations using polyphenols from berries can help to cross the blood-brain barrier and have activity at the Central Nervous System (Yu *et al.*, 2020). Recently it has been proven that fruits rich in antioxidants could prevent and counteract neurodegenerative processes, providing functional benefits against cellular alteration observed on Alzheimer (Liu *et al.*, 2018). The inhibition of acetylcholinesterase enzymes (AChE) activity is an indicator of neurotransmitter dysfunction in diseases such as Parkinson and Alzheimer's disease confirmed by studies with microcapsules from *Hippophaë rhamnoides* determined correlations between its compounds and *in vitro* anticholinergic and the antioxidant activity (Tkacz *et al.*, 2020). This work aimed to study and develop a

novel encapsulated formulation based on calafate berries, using Spray-drying technique in order to preserve anthocyanins from degradation as well as freeze-drying. Consequently, to evaluate the influence of Spray drying conditions on the physicochemical, antioxidant properties and biological activity through enzymatic and cellular assays, anthocyanins from the formulations in order to design a potential functional product to be used in food industry for nutrition, health and wellness purposes were evaluated.

### 4.3 Materials and methods

#### 4.3.1 *Material*

Ripe berries were collected in Coyhaique, Aysén region, (45°33'18" S, 71°50'38.399" O) during two consecutive years. They were frozen and transported to the Laboratory of Chemical Analysis, Department of Plant Production, Faculty of Agronomy, University of Concepción and kept at -80°C until they were processed and analyzed.

#### 4.3.2 *Chemicals*

Maltodextrin DE-10 as carrier agents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Analytical grade reagents such as formic acid, acetonitrile, methanol, water, monobasic sodium phosphate and dibasic sodium phosphate were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Commercial standards of delphinidin 3-glucoside (95 %), cyanidin 3-glucoside (98 %) chlorogenic acid, rutin trihydrate, quercetin dihydrate as well as radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH\*), Trolox, fluorescein (free acid) and 2,2-azobis-(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) were acquired from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). For the enzymatic assays, *E. electricus* AChE, acetylthiocholine iodide (ATCh), 5,5'-dithio bis(2 nitrobenzoic) acid (DTNB) was supplied by Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).



#### 4.3.3 *Preparation of microcapsules by Spray drying and freeze-drying and study of storage stability*

The mashed calafate berries (100 g) were mixed with ethanol in 1:6 (w/v) and stirred for 24 h. After that, alcohol was removed using a vacuum pump. Next, calafate- alcohol blend was mixed with maltodextrin (MD) (10, 20 and 30 g) and stirred for 12h in distilled water. The resulting solutions were homogenized by constant agitation while they were fed into a mini Spray-dryer B-290 (Büchi, Flawil, Switzerland) at room temperature. The Spray-dryer was operated at an air inlet ranging from 100, 120, 140 ± 3 °C. Therefore, nine treatments were carried out considering the three doses of maltodextrin mentioned before and 3 different inlet temperatures. The rate of feeding and air flow were constant (1 mL min<sup>-1</sup> and 600 L h<sup>-1</sup> respectively). The resulting microcapsules were collected in amber glass bottles and storage at 5 y 35°C, while the control was stored at -80 °C, until analyzed.

On the other hand, calafate was freeze dried at OPERON model OPR-20160701-1A1EO (Gyeonggi-do, Korea) freeze dryer, under a pressure below 0.05 mBar, -70 ± 2°C for 48–72 h, and stored at – 80°C until analyzed (López *et al.* 2018).

Finally, powder recovery (ratio between the quantities of powder versus the initial mass solids), and entrapment efficiency (g of phenolic compounds from calafate extracts encapsulated 100 g<sup>-1</sup> phenolic compounds from calafate extracts added) were calculated.

#### 4.3.4 *Characterization of phenolic compounds and antioxidant properties from encapsulated calafate*

The chemical characterization of microencapsulated and freeze dried fruits was done by HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> system. The antioxidant capacity was determined by spectrophotometry 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (*DPPH*<sup>\*</sup>) and

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assays. In addition, size powder, yield, recovery and stability of capsules, were also measured.

To carry out the chemical analyses Agulló *et al.*, (2020) protocol was followed. Briefly, 50 mg. of each sample (encapsulated or freeze dried), were first poured into 1.5 mL of 25:24:1 (methanol: water: formic acid) stirred for 5 min and centrifuged at 10,000 x rev min<sup>-1</sup> for 10 min. Next, the tubes were merged in ultrasound (1 h) and kept at 4°C overnight. Then, the samples were filtered through a 0.22 µm PVDF membrane (Millex V13, Millipore, Bedford, MA, USA) and put in amber vials for chromatographic analyses. Chromatographic analyses were performed in an Agilent Technologies 1220 Infinity Liquid Chromatograph equipped with an autoinjector (G1313, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled with a Diode Array Detector (1260, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and a Luna 5 µm C18, 100 Å column (250 – 4.6 mm) and Security Guard Cartridges PFD C18 (4 – 3.0 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Mobile phases were 1% formic acid (A) and methanol (B), and a flow rate of 0.9 mL min<sup>-1</sup>. The analyses procedure was based on calibration curves using the following standards: cyanidin 3-O-glucoside at 520 nm for anthocyanins, quercetin 3-O-rutinoside at 360 nm for flavonols, and cinnamic acid derivatives as 3-O-caffeoylquinic acid at 320 nm. All were expressed in mg g<sup>-1</sup>.

The DPPH analysis was done according to Mena *et al.*, (2011), measuring the variation in absorbance at 515 nm after 30 min of reaction with the radical (for DPPH\*), using Thermo Scientific UV-Vis Orion AquaMate 8000 spectrophotometer (Madrid, Spain). Six replications were carried out per sample. The results were expressed in µmol Trolox equivalent (TE) g<sup>-1</sup> of sample dry weight (DW). ORAC assay was performed according to (Migues *et al.*, 2018) using black-walled 96-micro well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) and an Infinite®M200 micro plate reader (Tecan, Grödig, Austria). Each well received 150 µL of fluorescein solution and 25 µL of phosphate buffer, Trolox® solutions

or sample solution to measure the blank, the curve or the samples respectively. Samples were placed in the microplate reader, after 30 min of incubation (37 °C), AAPH solution (25 µL) was added to each well and fluorescence was recorded every 5 min for 120 min, using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm. ORAC values were calculated using the difference in areas under the fluorescein curve (AUFC) between the blank and a sample. The results were expressed as µmol of Trolox g<sup>-1</sup> of dry weight. Peroxyl radical was generated using 2, 2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride and was prepared fresh for each run. Fluorescence conditions were as follows: excitation at 485 nm and emission at 520 nm. Results were expressed as µmol of Trolox g<sup>-1</sup>.

#### 4.3.5 Neuroprotective properties of calafate microcapsules

The enzymatic assays of acetylcholinesterase (AChE) were performed using Ellman method (Ellman *et al.*, 1961). Different concentrations of acetylthiocholine (ATCh) were prepared with distilled water (1 mM, 0.5 mM, 0.2 mM and 0.1 mM). The solution of chromogenic reagent was carried out by dissolving 0.16 g of DTNB and 0.6 g of NaHCO<sub>3</sub> in 40 mL of 0.1 M phosphate buffer pH 7.6. The AChE enzyme, from *E. electricus*, was dissolved in distilled water (5 U mL<sup>-1</sup>). The control assay contained 50 µL of enzyme, 200 µL of DTNB, 2.6 mL of 100 mM phosphate buffer (pH 7.6) and 200 µL of acetylthiocholine (1 mM). For solvent control a mixture of ethanol/ formic acid/distilled water (24:25:1) was prepared and 100 µL was added to the vials. The inhibition reaction was done with 100 µL of calafate extracts and two dilutions. The spectrophotometric study was incubated at 37°C for 15 min and the absorbance was measured with a Thermo Scientific UV-Vis Orion AquaMate 8000 spectrophotometer (Madrid, Spain) at 412 nm. The phosphate buffer solution was used as blank. Six replications were carried out.

In addition, cell viability and cytotoxicity were determined by the use of the encapsulated calafate berry extract to test the cell toxicity of PC12 cells. The cell

viability assay (MTT) was carried out using encapsulated polyphenols from calafate berries in a chronic treatment by triplicate during 24h.

#### 4.3.6 *PC-12 Cells*

PC12 cells from ATCC (Manassas, VA, USA) were cultured in DMEM with 5% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2 mM l-glutamine. The cells were incubated under standard conditions (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) and when 80% confluence was achieved, the cells were treated with 0.25% trypsin for 10 min, washed and resuspended in HyQ DMEM/High-Glucose (Hyclone, Logan, UT, USA) with 5% fetal bovine serum (Hyclone), 2 mM l-glutamine (Gibco, Grand Island, NY) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco). The cells were then plated at a concentration of 50.000 cells/well for experiments and used 24 h after plating under experimental conditions similar for neurons.

#### 4.3.7 *Soluble Oligomers of A $\beta$ (SO- A $\beta$ ) preparation*

A $\beta$ 1-40 peptide (rPeptide, Bogart, GA, USA) was reconstituted in DMSO at a concentration of 2.3 mM. 2µL aliquots were dissolved in sterile distilled water, in order to reach 80 µM concentration. To generate the oligomeric forms, the solution was subjected to vertical stirring (500 rpm) using a magnetic agitator, during 2 h at room temperature, similar to previous works (Sáez-Orellana *et al.*, 2016; Sáez-Orellana *et al.*, 2018). The presence of SO-A $\beta$  was tested by western blot (not shown). The aforementioned peptide solution, at concentration of 0.5 µM, was used.

#### 4.3.8 *Cell viability assay*

In order to evaluate changes in cell viability by measuring the ability of mitochondria to reduce 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT salt) to formazan, the *in vitro* MTT assay kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was used. The cells, subjected to different experimental conditions, were incubated for 30 min in MTT (1 mg/mL); the insoluble formazan was solubilized in 100 µL of 2-propanol, and the absorbance was registered (560

nm and 620 nm) in a NOVOstar multiplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany).

#### 4.3.9 *Scanning Electron Microscopy of microcapsules*

The morphology of the particles was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). The microcapsules were attached to a double-sided adhesive tape mounted on SEM stub, coated with 3-5 mA gold/palladium under vacuum scanning electronic microscope (FEI - Inspect S50) working at 5 kV, with 1,000 $\times$  and 5,000 $\times$  of magnification and operated in high vacuum mode as described by López-Belchí *et al.* (2021). The particle mean size analysis was calculated by measuring 30 randomized particles in the microscope plate.

#### 4.3.10 *Statistical analysis*

In the results obtained, the experimental errors, randomness, normality and homogeneity of variances were analysed. Once the assumptions were verified, the analysis of variances, the test of differences in means (Tukey), significance level  $p < 0.05$  was performed. In the evaluation of the stability of the calafate anthocyanin extracts, the analysis of variances, test of differences of means (Tukey) and adjustment of regressions with significance of 5% were carried out. These analyses were done in the software R by Rstudio version 1.4.1106 (RStudio Team, 2015).

## 4.4 **Results**

#### 4.4.1 *Polyphenol recovery from Calafate formulations*

This study considers nine treatments with combination of percentage of maltodextrin (three doses, 15, 20 and 30%) and three inlet temperature of Spray drying (100, 120 and 140°C) to keep calafate polyphenols on maltodextrin (MD) and freeze drying as control. First of all, the entrapment efficiency, recovery

mean of particle sizes of all formulations and compared them, were calculated in terms of anthocyanins, and other phenolic compounds.

The entrapment efficiency ranged from 41.10 to 56.72 % and the recovery reached to 61.36% similar to the means reported by other authors (Vergara *et al.*, 2020) using Spray drying technique to encapsulate sweet potatoes anthocyanins using conditions of inlet temperature. Neither recovery of all treatments represented significant differences nor the size of the particles. On average the TACs in Spray drying ranged from 11.87 to 14.75 in mg g<sup>-1</sup> DW, with significant difference only with control (freeze dried) treatment (Table 5). The relation between TACs and TPCs is marked by the similarity in the quantification of all treatments since the significant differences were only between freeze dried treatments 5.8 mg g<sup>-1</sup> DW.

At the initial stage, eight anthocyanins and eight flavonols were identified, quantified by HPLC-DAD-(ESI)/MS<sup>n</sup> (Table 6). The values of quantification reflected the concentration of phenolic compounds in the calafate fruit (DW) at the starting point. The main anthocyanins of calafate berry extracts were delphinidin 3,5-dihexoside, and malvidin 3,5-dihexoside, in agreement with Ruiz *et al.* (2015) and Brauch *et al.*, (2017) The three principal flavonols: quercetin-3-rutinoside, quercetin-3-glucoside, isorhamnetin-3-O-hexoside-derivative were also reported before in *B. microphylla* (López *et al.*, 2018; Ruiz *et al.*, 2010) and in a wild raspberry (Jiménez-Aspee *et al.*, 2016).

**Table 5.** Entrapment efficiency, recovery and Quantification of Phenolic Compounds of different dried treatments.

Code	MD-temp	EE (%)	Recovery (%)	Size ( $\mu\text{m}$ )	TACs	TPCs
T1	15-100	43 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	57 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	7.5 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	13 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
T2	15-120	50 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	59 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	8.1 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>	12 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	15 $\pm$ 1 <sup>a</sup>
T3	15-140	49 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	57 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	7.1 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	12 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	15 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>
T4	20-100	41 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	58 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	6.7 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	13 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
T5	20-120	46 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	58 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 4.6 <sup>a</sup>	15 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	19 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
T6	20-140	42 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	60 $\pm$ 4.2 <sup>a</sup>	6.6 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>	13 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	16 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
T7	30-100	46 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	60 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	6.9 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	13 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
T8	30-120	57 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	58 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	6.5 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	13 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
T9	30-140	47 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	61 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	6.6 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>	12 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	15 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
F	control	83 $\pm$ 5.6 <sup>b</sup>	94 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>	-	20 $\pm$ 3.8 <sup>b</sup>	25 $\pm$ 2 <sup>b</sup>

\*The treatments consisted of combination of 3 doses of maltodextrin (MD) (15, 20, 30%) and three inlet temperatures (temp) of Spray dryer (100, 120 and 140°C). F: freeze drying treatment, TACs, Total anthocyanins expressed in  $\text{mg g}^{-1}$  of dried weight (DW). TPCs, Total Phenolic Compounds expressed in  $\text{mg g}^{-1}$  of dried weight. Different letters in the same column mean significant differences at ( $p \leq 0.05$ ).

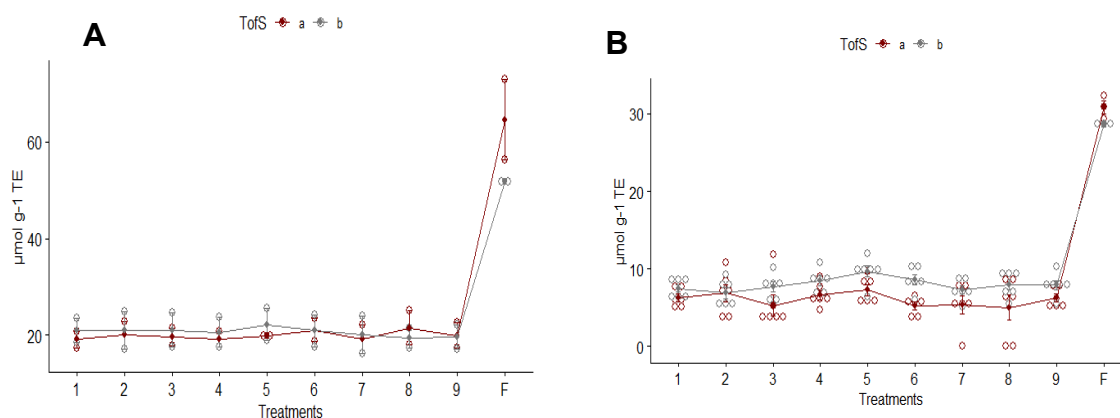
#### 4.4.2 Antioxidant and enzymatic activity from calafate microcapsules

The 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (*DPPH*) and Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assays were defined using all nine Spray drying treatments and freeze dried calafate as control. The *DPPH* results achieved were in a range between 15.5 and 16.8  $\mu\text{mol g}^{-1}$  TE for Spray drying treatments, and 51 to 57.9  $\mu\text{mol g}^{-1}$  TE in the control (Freeze Dried). The antioxidant activity was confirmed by ORAC assay and the means of treatments (from T1 until T9) was 14.55  $\mu\text{mol g}^{-1}$  TE (Figure 10 A, B). Slightly superior results were obtained with our formulations, when they were compared to Spray dried powders reported by Vergara *et al.* (2020).

**Table 6.** Phenolic compounds in calafate fruit extract (*Berberis microphylla* G. Forst) identified and quantified by HPLC-DAD-(ESI)/MS<sup>n</sup>

Retention time	$\lambda$ (nm)	M+ / M-	Ion	MS <sup>n</sup>	Main phenolic compounds	Concentration
11.58	278.52	627	+	303	Delphinidin 3,5 -dihexoside	9.06
16.8	280.52	448	+	287	Cyanidin 3-glucoside	0.97
20.6	278, 524	640	+	317	Petunidin 3,5 -dihexoside	0.82
27.8	276.52	462	+	301	Peonidin 3-glucoside	0.14
30.3	280.52	654	+	331	Malvidin 3,5 -dihexoside	3.26
31.7	278.52	464	+	303	Delphinidin 3-glucoside	3.26
34.5	280, 525	611	+	303	Delphinidin 3-rutinoside	2.87
39.3	274.53	492	+	331	Malvidin 3-glucoside	1.46
30.1	298/355	481/479	-	319/317	Myricetin 3-glucoside	0.16
34	296/356	627/625	-	481/319	Myricetin 3-rutinoside	0.23
36.8	298, 350	609/610	-	301	Quercetin 3-rutinoside	1.17
39.8	296, 352	463/464	-	301	Quercetin 3-glucoside	1.47
40.5	300, 324	515	-	353.19	Quercetin 3-galactoside	0.34
46.3	284, 352	447	-	301	Quercetin 3-O-rhamnoside	1.02
46.9	264, 350	477	-	315	Isorhamnetin 3-O-hexoside	0.74
48.1	266, 354	623	-	315	Isorhamnetin 3-O-hexoside-derivative	0.78
<b>TOTAL</b>						<b>27.74</b>

\*These measurements correspond to calafate extracts at started point. The values are expressed in mg g<sup>-1</sup>. Different superscript letters in the same row mean significant differences at (P<0.05)



**Figure 10.** Antioxidant and enzymatic activity of encapsulated calafate at two storage temperature (TofS, temperature of storage a=5°C, b=35°C) 1-9 Spray dried treatments, F freeze dried (control) A. DPPH<sup>•</sup> assay: Comparison between nine formulation by Spray drying and Freeze drying calafate as control. B. ORAC assay: Spray drying formulation and Freeze drying calafate as control.

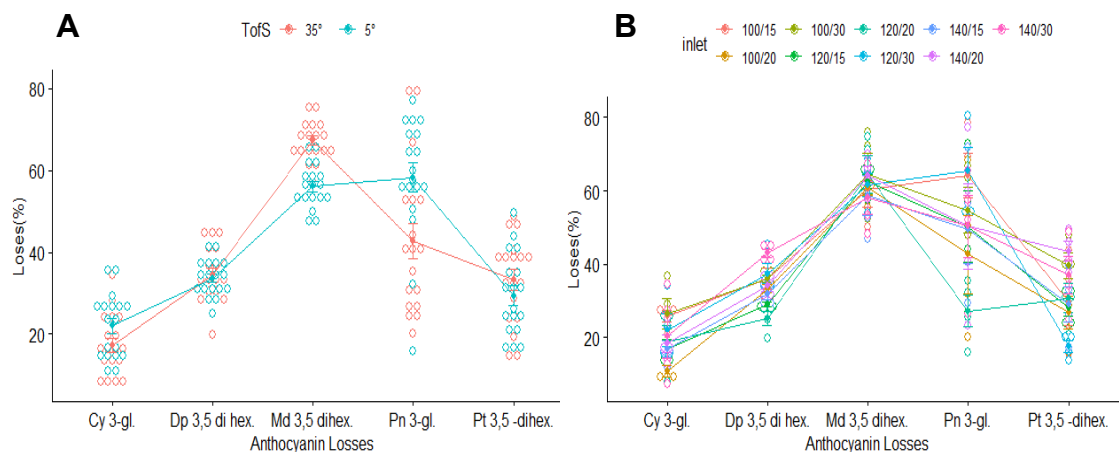


#### 4.4.3 *Calafate anthocyanin stability at different temperatures of storage*

Regarding to storage temperature of calafate microcapsules statistical differences between losses of anthocyanin content were found. Thus, the minor losses were revealed for cyanidin 3-glucoside at 35°C (Fig 11.B) with 17.4% while the highest were for peonidin 3-glucoside and malvidin 3,5-dihexoside, 58.2 and 67.3% respectively. For the two way ANOVA we considered the normality (Shapiro test), homogeneity of variance (Levene's test) and a Tukey test as a posthoc method was used. The  $p$  value adjustment for comparing with significance level  $\alpha = 0.05$ . High statistical differences between the interaction of anthocyanins and the temperature of storage ( $1.799 \times 10^{-6}$ ) were found.

Interaction with anthocyanins versus inlet temperature was displayed while treatments versus storage temperature showed no significant differences. The variations in the main anthocyanins present in microencapsulated calafate along the time shown significative differences among all treatments considering the anthocyanins individually (Table 7). The treatment T2 presented 11% of losses for cyanidin 3-glucoside while T6 losses responded to 65.3% compared to the initial quantity of Peonidin 3-glucoside. Some of the main anthocyanins were not detected after the 336 days, as petunidin 3,5-dihexoside, peonidin 3-glucoside, malvidin 3,5-dihexoside specially in the assay of storage temperature (35°C).

The comparison of main anthocyanins in contrast to inlet temperature are expressed in percentage (%) of loses (Figure 11B). The behavior of all anthocyanins seemed to be similar for all treatments. The range of loses was higher for the peonidin 3-glucoside and lower for the delphinidin 3,5-dihexoside. The loses reported in this research were consistent with results of Righi da Rosa *et al.* (2019) described for microencapsulation of anthocyanins from blueberries ( 60% ) similar of our results.



**Figure 11.** Anthocyanin losses (%) from Spray dried microcapsules of calafate in A) two temperatures of storage (5 and 35°C) and B) Comparison of anthocyanins considering nine treatments of drying.

SEM microphotos for the different treatments shown spherical forms and the majority with the surfaces depressed. The differences in sizes responded to temperature treatments (Fig. 12). To confirm and ensure that the maltodextrin used as a matrix to encapsulate the *B. microphylla* compounds worked effectively and efficiently, electron microscopy was used (Fredes *et al.*, 2018) (Fig. 12). Through this visualization it is also possible to estimate the particle sizes of the calafate coatings rich in anthocyanins. The size and agglomeration were related to the inlet temperature of the Spray dryer but generally we can assert that formulations of T1 and T4 probably had not capped the bioactives of calafate effectively. Bigger particles in comparison with other treatments caused to the low temperature (100°C) were found. Due to the agglomeration, some particles show slightly rough surface. The particle sizes with respect to the temperatures used were stable (average 7µm).

**Table 7.** Evaluation of stability of anthocyanins encapsulated by Spray drying during 336 days of storage at 5°C.

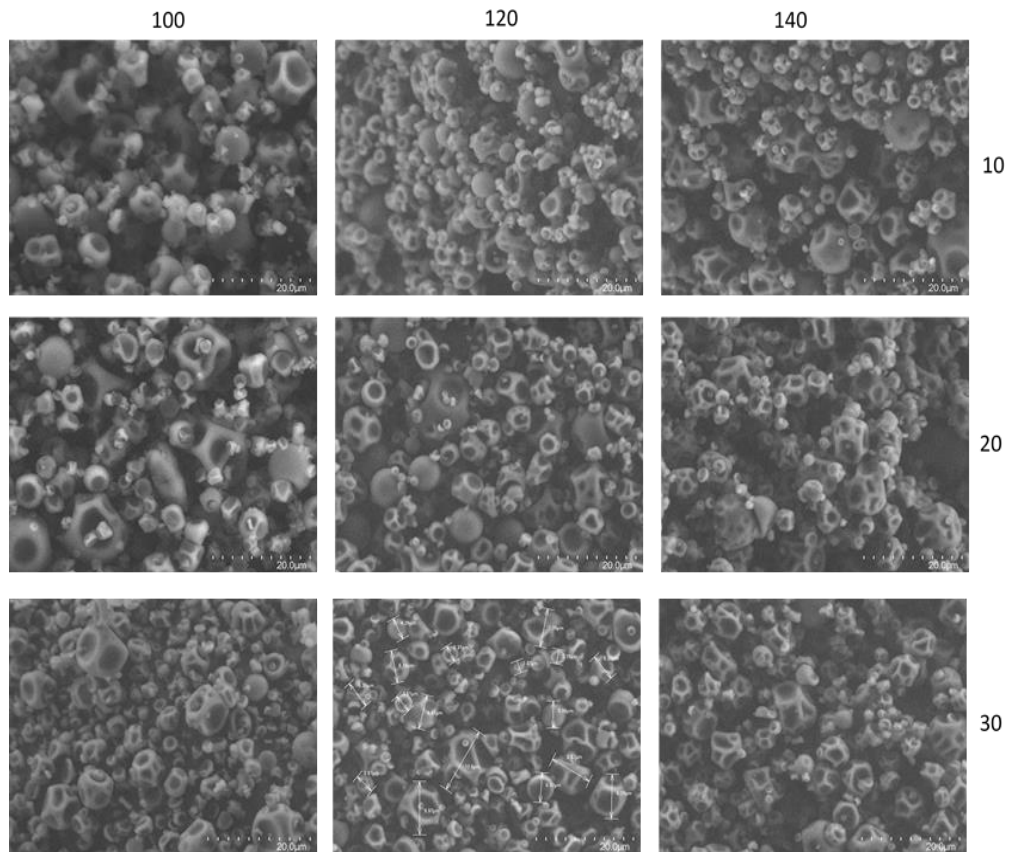
Anthocyanin	Time of Storage	(mg g <sup>-1</sup> )	
Peonidin 3-glucoside	0	0.269	a
Petunidin 3,5-dihexoside	0	0.877	abc
Malvidin 3,5-dihexoside	0	0.987	abc
Cyanidin 3-glucoside	0	1.322	abc
Delphinidin 3,5-dihexoside	0	9.467	e
Peonidin 3-glucoside	24	0.316	a
Petunidin 3,5-dihexoside	24	0.895	abc
Cyanidin 3-glucoside	24	1.279	abc
Malvidin 3,5-dihexoside	24	1.550	bc
Delphinidin 3,5-dihexoside	24	9.600	e
Peonidin 3-glucoside	48	0.332	ab
Petunidin 3,5-dihexoside	48	0.791	abc
Malvidin 3,5-dihexoside	48	0.802	abc
Cyanidin 3-glucoside	48	1.800	c
Delphinidin 3,5-dihexoside	48	8.366	de
Peonidin 3-glucoside	168	0.302	ab
Cyanidin 3-glucoside	168	1.016	abc
Malvidin 3,5-dihexoside	168	1.111	abc
Petunidin 3,5-dihexoside	168	1.123	abc
Delphinidin 3,5-dihexoside	168	7.911	d
Peonidin 3-glucoside	336	0.151	a
Malvidin 3,5-dihexoside	336	0.569	abc
Cyanidin 3-glucoside	336	0.731	abc
Petunidin 3,5-dihexoside	336	0.941	abc
Delphinidin 3,5-dihexoside	336	7.439	d

Different superscript letters in the same row mean significant differences at ( $P \leq 0.05$ )

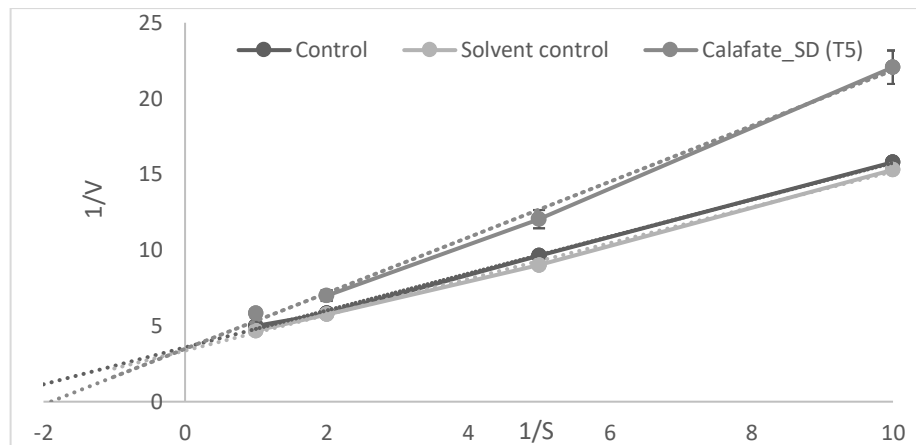
#### 4.4.4 *In vitro* study of neuroprotective properties of calafate microcapsules on neurodegenerative models

To study the neurodegenerative properties, the best resulting Spray dried treatment in relation to bioactive content was used (T5 with 19.02 mg g<sup>-1</sup> of polyphenols). This treatment presented the lowest difference with the control and consequently the major antioxidant capacity. The inhibition of Acetylcholinesterase (AChE) was determined by Ellman method (Ellman *et al.*, 1961) with the use of 3 concentrations of the enzyme (0.1, 0.2 and 0.5 mM) in relation with the aforementioned treatment of encapsulated calafate. The inhibition type of calafate powder for acetylcholinesterase was competitive, confirmed by the plot of Lineweaver-Burk with the kinetic inhibition (Fig 13). The

calafate formulation showed the best inhibition with 0.2 mM of concentration  $K_i=1.2872$  ergo it was more effective than the substrate. Studies reported that higher concentration of polyphenols in enzymatic assays can easily saturate the medium and could overlap the inhibitor action (Ramsay & Tipton, 2017).



**Figure 12.** SEM images of Spray-dried particles from calafate berries extracts. Three doses of maltodextrin and three inlet temperatures. Rows belong maltodextrin percentage (10, 20, 30) while columns correspond to inlet temperature of the Spray dryer (100, 120, 140).



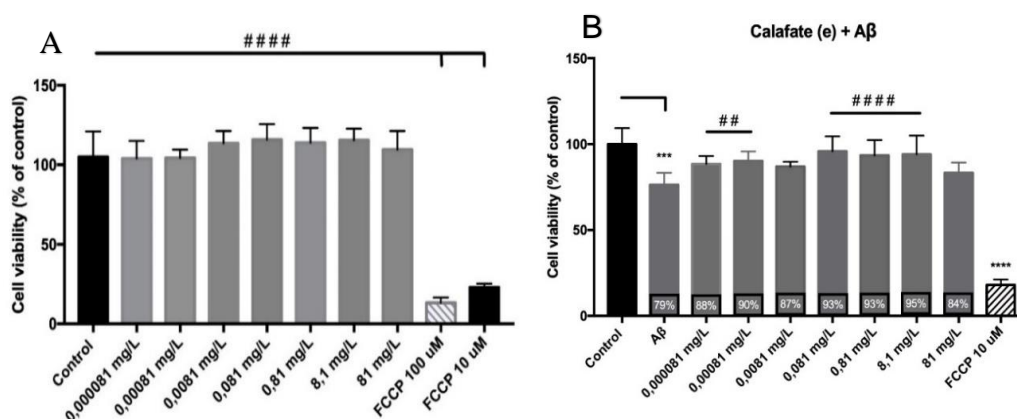
**Figure 13.** Acetylcholinesterase activity of encapsulated calafate by Spray Drying

Calafate bioactives joined to the enzyme, preventing it to bind to the substrate, therefore the activity of the enzyme was diminished suggesting the possibility that the Calafate could enhance the cholinergic tone and promoting and restoring the ACh functions. The AChE enzymatic inhibition of calafate encapsulated by Spray drying showed slight lower values with respect to those reported by Noriega *et al.* (2020) for Chilean strawberry and higher in comparison with microcapsules from Tintorera grapes (López-Belchí *et al.*, 2021). The probable reason of the results differing with others is the concentration and the composition of starting material.

In addition, PC12 cells pretreated with the amyloid beta peptide (0,5  $\mu$ M, 24 h), a key toxic stimulus to mimic the main cellular toxicity in Alzheimer Disease, shown to maintain their viability when microencapsulated calafate was co/incubated with the peptide.

After the evaluation of encapsulated polyphenols from calafate, and, as we have mentioned, the treatment (T5) was used to determine the effect of microencapsulated calafate on cell viability assays. The cell viability was not affected by the only presence of the extract using different extract concentrations

( $8,1 \times 10^{-5}$  -  $81 \text{ mg L}^{-1}$ ), suggesting their safety use in this cellular model. In these experimental approaches, FCCP ( $10\text{-}100 \text{ }\mu\text{M}$ ) a mitochondrial uncoupler, that generate a potent oxidative stress, was used as positive control of toxicity, reducing the cell viability about 90% (Fig 14a). Values are presented as percentages with respect to the control and with respect to  $\text{A}\beta$  (#) ( $n=3$ ). Calafate did not reduce cell viability of PC12 cells, suggesting that encapsulated calafate could be similar as reported for maqui berry extracts (Fuentelba *et al.*, 2012). In the same range of concentrations evaluated above, PC-12 cells exposed to  $\text{A}\beta$  peptide demonstrated reduced viability of approximately 20% with respect to control conditions, while co-incubation with encapsulated calafate induced viability recovery by preventing cytotoxicity of  $\text{A}\beta$  peptide in a concentration-dependent manner (Fig. 14-B). Lower concentrations of used calafate ( $0.000081$  and  $0.00081 \text{ mg L}^{-1}$ ) restored viability of the  $\text{A}\beta$  toxic effect by 10%. At higher concentrations of encapsulated calafate ( $0.081$  -  $8.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) the viability of the toxic effect of the peptide was restored to about 20%. A report using quercetin (one of the compounds reported in encapsulated calafate) on PC12 cell model showed the positive influence of this compound on increasing the survival rate of PC12 and reduced the toxicity of  $\text{A}\beta$  (Yu *et al.*, 2020) , as we have demonstrated by the use of encapsulated calafate.



**Figure 14.** Effect of encapsulated Calafate extract on PC12 cell viability. A Comparative graphs of cell viability with increasing concentrations of the extract. B Effect of encapsulated calafate on the reduction of cell viability induced by Amyloid  $\beta$ -peptide oligomers ( $0.5 \text{ }\mu\text{M}$ ).

## 4.5 Discussion

In terms of encapsulation, there was no evidence of calafate encapsulated to improve the protection and stability of its compounds until now. Similarly, the enzymatic activity (acetylcholinesterase) and the influence of calafate in PC12 cells to determine calafate microcapsules potential as an alternative for neurodegenerative diseases have not been yet studied. In the physical characterization of calafate formulations, this paper addresses the influence of temperature in the particle size, entrapment efficiency and recovery, nonetheless, we find slight differences between the Spray drying treatments compared to freeze drying (FD). The results were statistically different considering freeze drying concentrates the fruit contents by removing the water and the bioactives are less or non-affected by low temperature used in this process, while in the Spray drying the compounds were subjected to high temperatures compromising the calafate bioactives' concentration.

Nevertheless, no essential losses of bioactive compounds were observed, demonstrating that Spray-drying would be an adequate technique to carry out the drying process of calafate berries. All this is achieved by Spray-drying process, together with the advantages to manage on a continuous basis, low operating cost, high quality of capsules in good yield, also rapid solubility of the capsules, small size and high stability capsules (Schoebitz *et al.*, 2013). Some authors have suggested wider ranges of temperatures to reach same size particles and higher efficiency (Vergara *et al.*, 2020). In our case the higher was the temperature the lower was the sizes of calafate microencapsulated particles observed by electronic microscopy.

Regarding to the TACs and TPCs the Spray dried formulations did not show statistical differences. Our findings appear to be well substantiated if we consider that the range of inlet temperature was not as wide as in other studies.

Consequently, the use of 100-140°C despite of the anthocyanin's lability is justified. DPPH\* and ORAC assays showed an estimation of the calafate antioxidant capacity and explained that the active redox properties are complementary to the neuroprotection described in the neurotoxicity assays (Fig. 14) due to polyphenols attenuates the toxicity, modules lipids peroxidation (Kumar *et al.*, 2015) and protects against oxidative-stress-induced neurotoxicity (Rocha-Parra *et al.*, 2018). Nonetheless it would be necessary to contrast with *in vivo* tests to clarify the true role of these metabolites in our health.

Since the stability of formulations rich in polyphenols based on calafate, minor loses were found in the individual anthocyanins along the time (20-30%) in Spray dried treatments. Considering the stability of formulations rich in polyphenols based on calafate, minor loses were found in the individual anthocyanins along the time (20-30%) in Spray dried treatments. Studies about the anthocyanins stability confirm similar loses due to temperature of storage that justify the degradation as well as some changes in the anthocyanin structure and as a consequence (Fredes *et al.*, 2018). Therefore, despite the anthocyanin losses reported during storage at 5 °C, calafate formulations maintained adequate content of glycosylated delphinidin, cyanidin and malvidin.

The main metabolites studied and analyzed in calafate have already been characterized before (delphinidin 3,5-dihexoside, and malvidin 3,5-dihexoside quercetin 3-rutinoside, quercetin 3-glucoside, isorhamnetin 3-O-hexoside-derivative) (López *et al.*, 2018; Romero-Román *et al.*, 2021). These compounds found in other fruits have also been associated with beneficial effects on human health (Yang *et al.*, 2016) (Lesjak *et al.*, 2018) as well as have been used to assert their potential to cope with neurodegenerative disorders (Yu *et al.*, 2020).

Considering calafate as a competitive inhibitor to bind with AChE enzyme reversibly at the same site as the acetylcholine and demonstrated by Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ), the use of calafate formulation is crucial to understand



how useful this berry can be in terms of palliate neurodegenerative disorders. Plant natural products have shown to be a promising source of acetylcholinesterase inhibitors. In fact, two of the drugs approved for Alzheimer's disease are galantamine and rivastigmine, two alkaloids derived from plants (Murray *et al.*, 2018). In the case of synthetic drugs with enzymatic activity is mandatory a careful adjustment of the molecule activities in order to have to be a viable alternative of the use of drugs while in our case by this research we can recommend the formulation of calafate as a palliative treatment due to its nature and showed inhibition of AChE. The calafate encapsulated rich in anthocyanins will not show side effects and can be a dietary alternative to be included in the food industry. The microencapsulation of calafate also represents a strategy to act as a “carrier” of the bioactive compounds present in the extract, towards the central Nervous System, knowing that it is difficult to access due to the blood-brain barrier.

It has been demonstrated that polyphenols present in berries, are capable of improving cognitive properties and prevent or reduce the risks of neurodegenerative diseases (Liu *et al.*, 2018). Along this study, the potential of calafate berries as well as encapsulated calafate for preventive treatments of neurodegenerative disorders can be clarified by the use of PC12 cells is to study the neurotoxic activity as a model for neurodegenerative diseases.

#### **4.6 Conclusions**

Encapsulation by Spray drying was effective for calafate in terms of keeping the polyphenol contents, antioxidant capacity, the inhibition of AChE enzyme as well as the recovery of viability by preventing cytotoxicity of the AB peptide in PC12 cells related to neurodegenerative disorders. The Spray drying technique can be used for calafate berry extracts in order to scale-up and

produce new value-added food formulations with anti-neurodegenerative potential.

**Declaration of interest:** The authors declare no conflict of interest

**Author contribution:** MER: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing. JF. Resources, Review & Editing. MS Writing review & editing and Conceptualization. CGV Conceptualization, Writing, review & editing- MDL: Conceptualization, Methodology, Resources, Supervision.

**Funding:** The authors gratefully acknowledge the financial support of FONDECYT grant 1160899 (CONICYT, Chile) and Secretary of Higher Education of Science, Technology and Innovation of Ecuador (SENESCYT, Ecuador).

## Chapter V

---

# Calafate's functional beverage

## V. Bebida modelo enriquecida a base de calafate: estabilidad de antocianos, calidad y características biológicas.

Romero-Román ME<sup>1,3</sup>, García-Viguera C<sup>2\*</sup>, Periago PM<sup>3</sup>, Bastías R<sup>1</sup> and López-Belchí MD<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Concepción, Chile; e-mails [mariaeugeromero@udec.cl](mailto:mariaeugeromero@udec.cl), [ribastias@udec.cl](mailto:ribastias@udec.cl) [mlopezb@udec.cl](mailto:mlopezb@udec.cl)

<sup>2</sup> Phytochemistry & Healthy Foods Lab (LabFAS), Dept. Food Science & Technology, CEBAS-CSIC, Campus de Espinardo 25, 30100 Espinardo, Murcia (Spain) e-mail: [cgviguera@cebas.csic.es](mailto:cgviguera@cebas.csic.es)

<sup>3</sup> Food Engineering and Agricultural Equipment Department, Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, España. Tel. (+34) 968 325 905 e-mail: [paula.periago@upct.es](mailto:paula.periago@upct.es)

\* Correspondence: MD. L-B [mlopezb@udec.cl](mailto:mlopezb@udec.cl). Tel.: (+56)995177972, C. G-V [cgviguera@cebas.csic.es](mailto:cgviguera@cebas.csic.es)

### Resumen

En el presente estudio se evaluó el potencial de combinar calafate, un fruto rojo con alto contenido de polifenoles, con cítricos como el limón y/o la naranja, para formular una bebida saludable. La bebida se sometió a dos tratamientos de pasteurización. Se estudiaron las características físico-químicas, el contenido de compuestos polifenólicos, capacidad antioxidante (ORAC y DPPH'), calidad (pH, Brix, acidez titulable y color CIE  $L^*a^*b^*$ ) y la seguridad microbiológica de los formulados, a dos temperaturas de conservación (5 y 37°C), durante 60 días. Las mezclas con cítricos otorgaron estabilidad a los compuestos bioactivos del calafate respecto del control. Los tratamientos térmicos modificaron el contenido en polifenoles y la capacidad antioxidante de la bebida, al igual que el color, si bien se mantuvo un color atractivo durante todo el periodo de almacenamiento. Desde el punto de vista microbiológico, el tratamiento térmico corto con alta temperatura (3 minutos a 95°C) y almacenamiento en refrigeración (5°C) es el mejor para la prevención

de crecimiento microbiano, siendo útil para mantener la calidad y seguridad de la bebida funcional rica en polifenoles.

**Key words:** *Berberis microphylla*, compuestos fenólicos, frutos rojos, bebidas saludables

## 5.1 Introducción

Entre las tendencias actuales en el diseño de alimentos funcionales, el desarrollo de nuevas bebidas con productos con alto contenido en compuestos bioactivos, se presenta como opción para la obtención de alimentos enriquecidos. La aceptación de estos productos saludables depende de la calidad y las características organolépticas, que deben conservarse a lo largo de la vida útil del producto. La actividad biológica también juega un papel importante en términos de nuevos alimentos. Con respecto a los compuestos encontrados en los frutos rojos, algunos autores han indicado que los antocianos otorgan propiedades beneficiosas para la salud (Yang *et al.*, 2018), frente a enfermedades crónicas (Ćujić *et al.*, 2018), cáncer (Thibado *et al.*, 2018) o metabólicas (Agulló *et al.*, 2021). Es por ello que la industria alimentaria está trabajando en el procesado de frutas, con el fin de incluir sus compuestos bioactivos en diferentes matrices naturales, para formar parte de la dieta humana, a través de los nuevos alimentos saludables/funcionales.

El calafate es una baya púrpura, originaria de la Patagonia chilena y argentina. Esta fruta es considerada como un “superalimento”, por ser rica en compuestos bioactivos como los antocianos (Romero-Román *et al.*, 2021) y otros compuestos fenólicos como flavonoles, proantocianidinas y ácidos fenólicos (Ruiz *et al.*, 2015). Todos ellos se caracterizan por su alta capacidad antioxidante, cardioprotección, inhibición de la adipogénesis, y capacidad

antiinflamatoria (Calfío & Huidobro-Toro, 2019). No obstante, aún es escaso su uso e industrialización. En algunos lugares del sur de Chile se han desarrollado licores y cervezas tradicionales caseros para ofrecer al turista (Dominguez *et al.*, 2017), si bien hace falta el desarrollo de bebidas funcionales a base de calafate para promover su consumo como fuente natural de compuestos bioactivos.

La formulación de bebidas funcionales con la adición de frutos cítricos como el limón y la naranja pueden mejorar los parámetros de calidad, así como la estabilidad de los compuestos bioactivos. Tanto el limón (*Citrus lemon L.*), como la naranja (*Citrus sinensis L.*) han sido ampliamente estudiados y caracterizados, siendo una valiosa fuente de vitamina C y flavanonas, que pueden ser utilizadas en el desarrollo de nuevas bebidas (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2014a; González-Molina *et al.*, 2010). La actividad antioxidante del limón se ha estudiado en enfermedades crónicas y cardiovasculares (Hwang *et al.*, 2017), mientras que la naranja, ha sido más empleada en la industria alimentaria por su sabor y, en combinación con otras frutas, para la estabilización del color y elaboración de jugos funcionales (Kaderides *et al.*, 2020).

Un factor limitante a la hora de elaborar las bebidas saludables/funcionales, es el tratamiento térmico, empleado para reducir las contaminaciones con agentes patógenos (bacterias, mohos, levaduras, etc.), hasta niveles que no causen intoxicación alimentaria y que, a su vez, no alteren la estructura física o concentración de componentes químicos (Aun *et al.*, 2020). La pasteurización es una de las técnicas más utilizadas en la industria alimentaria, ya que permite mejorar la calidad y vida útil del producto. En los últimos años se han descrito mejoras en la técnica (uso de temperatura con procesos de exposición corta) para tener un impacto mínimo en las propiedades físicas, sabor y color así como en el contenido de compuestos bioactivos del producto final (Sólyom *et al.*, 2014).

Por lo tanto, debido a todas las características beneficiosas descritas para el calafate, y habiendo sido señalado como una oportunidad para la industria alimentaria y para el comercio internacional, promoviendo así el desarrollo rural y representando una salida económica sustentable para las regiones donde se recolecta (López *et al.*, 2018), la finalidad de este trabajo ha sido desarrollar una nueva bebida de calafate con limón y/u otros cítricos (como la naranja) que aportan compuestos bioactivos complementarios (flavanonas), con adición de un endulzante (sacarosa), para hacerla organolépticamente más aceptable. Por otro lado, se han evaluado los parámetros microbiológicos para garantizar la seguridad e inocuidad alimentaria, de la misma.

## 5.2 Material y métodos

### 5.2.1 Sustancias químicas y reactivos

La cianidina 3-O-glucósido, el dihidrocloruro de 2,2-azobis-(2-metilpropionamida) (AAPH), el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) y fluoresceína (ácido libre) se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El ácido fórmico, metanol, acetonitrilo, sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), carbonato de sodio anhidro, radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>\*</sup>), hidrógeno fosfato disódico anhidro, ácido L-ascórbico (AA), ácido cítrico, dihidrógeno fosfato de sodio y sacarosa (≥99.5%) de Merck (Darmstadt, Alemania). Todas las soluciones y los estándares se prepararon con agua Milli-Q.

### 5.2.2 Frutas

Se recolectaron bayas de calafate (*Berberis microphylla*) de la región de Aysén (sur de Chile), y se llevaron al Laboratorio de Química de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, Chillán. Posteriormente, las bayas

de calafate se liofilizaron (3 días a  $-70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , previo a su transporte al Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables (LabFAS) del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CEBAS-CSIC (Murcia, España), donde se mantuvieron congeladas, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su análisis y procesado. Las bebidas se elaboraron con los zumos de limón y naranja exprimidos de frutos naturales en su punto de madurez comercial (Murcia, España).

### 5.2.3 *Diseño experimental*

Previo al diseño de las bebidas, se realizaron estudios en sistema modelo, con el fin de determinar la estabilidad de los antocianos y la influencia de la adición de cítricos. Como control se empleó 5% de calafate disuelto en 5% de ácido cítrico, en zumo de naranja o en zumo de limón.

Una vez definida la influencia de la base, se planteó la elaboración de una posible bebida saludable, para lo cual se añadió sacarosa, con el fin de mejorar la palatabilidad. Posteriormente se establecieron diferentes formulados, en base a bebidas previamente diseñadas en el laboratorio (LabFAS, sometidas a Secreto Industrial), con mezclas de cítricos, con el fin de estudiar la posible influencia de la mezcla de cítricos y sacarosa: zumo de limón y 5% de calafate (Tratamiento 1), limón más 5% de calafate y sacarosa (Tratamiento 2) y limón, 5% de calafate, zumo de naranja y sacarosa (Tratamiento 3), y el mismo control que en el sistema modelo (5% calafate en 5% de ácido cítrico). Se analizaron los compuestos bioactivos presentes en estas formulaciones antes de someterlas a tratamientos térmicos de pasteurización.

El tratamiento térmico preestablecido era de  $85^{\circ}\text{C}$  durante 4 minutos, para la obtención de bebidas seguras. Tras someter los formulados a dicho tratamiento térmico, se evaluaron los parámetros de calidad y concentración de compuestos fenólicos.



Se seleccionó la mejor combinación en base a la cuantificación de compuestos fenólicos y parámetros de calidad y con el fin de optimizar la pasteurización, para evitar la degradación de los compuestos bioactivos de la bebida formulada, se ensayaron tres condiciones de pasteurización (85°C durante 4 minutos, 90°C durante 4 minutos y 95°C durante 3 minutos, denominados P1, P2 y P3 respectivamente). Los tratamientos térmicos en condiciones controladas se realizaron en un termorresistómetro Mastia (equipo de diseño industrial y patente UPCT) (Conesa *et al.*, 2009). El volumen máximo de tratamientos se basó en el volumen del recipiente del equipo de 400 mL. Una vez que el termorresistómetro inició el funcionamiento al tiempo y a la temperatura programada, se agitó la muestra durante el tratamiento para asegurar un calentamiento homogéneo.

Se recogieron alícuotas de 1 mL en tubos estériles para la prueba microbiológica en el minuto cero y en sucesivos intervalos de 1 minuto, con el fin de evaluar la cinética de degradación de los antocianos, mediante HPLC. Con todo ello se determinó la mejor combinación de temperatura y tiempo para el proceso de pasteurización. El líquido restante del tratamiento térmico se embotelló, para su posterior estudio de vida útil en frascos de vidrio transparente (vol. 250 mL), con tapones de polipropileno blanco de cierre hermético (Scharlau, ES), almacenándose a temperaturas de refrigeración y ambiente (5°C y 25°C) en oscuridad, y a 25°C a la luz con ciclos naturales día/noche, durante 30 días. Todas las bebidas se prepararon por triplicado (n = 3) y los tratamientos térmicos y todas las determinaciones analíticas se realizaron, también, por triplicado. Los análisis se realizaron a las 24h, 48h, 1, 2 y 4 semanas.

#### 5.2.4 *Estudio de parámetros físico-químicos y color*

Se realizaron estudios de calidad, empleando como índices, los parámetros físico-químicos (pH, acidez titulable- AT y sólidos solubles totales- SST) y color de la bebida en los tiempos descritos anteriormente. El pH, los sólidos solubles y la acidez se obtuvieron de los frutos liofilizados (control) y

posteriormente de cada formulado. Los valores de pH se midieron con un pHmetro (GLP 21, Crison Ltd, Barcelona, España). La AT se determinó valorando 2 g de cada solución (aumentando 30 g con agua Milli-Q) con NaOH 0,1 mol/L (pH 8,1). Los resultados se expresaron como gramos de ácido cítrico por 100 mL de muestra. El contenido de SST de las muestras se registró en un refractómetro (Abe WYA-S, Óptica Avien® Sistema; Bistec SL, Barcelona, España), a 20°C, expresando los valores en grados Brix (°Bx).

La medida del color se obtuvo con un espectrofotómetro Chrome Meter CR-5 (Cónica Minolta, Inc., Osaka, Jipán). Los parámetros de color determinados fueron luminosidad (CIE L\*), variación verde-rojo (CIE a\*), azul-amarillo (CIE b\*) y sus combinaciones matemática: ángulo hue (H) y croma (C), a partir de las fórmulas  $\tan^{-1}(b^*/a^*)$  y  $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ , respectivamente (Cesa *et al.*, 2017). La calibración se realizó con una placa blanca, estandarizada, previa la lectura, obteniéndose 5 mediciones por tratamiento (n = 15).

#### 5.2.5 *Análisis de compuestos fenólicos por HPLC-DAD*

El análisis (cualitativo y cuantitativo) de compuestos fenólicos, de los formulados, se realizó directamente a partir de 1 mL de cada tratamiento, filtrado por una membrana PVDF de 0,45 mm (Miles HV13, Millipore, Bedford, Mass., EE. UU), mediante HPLC-DAD. Para ello se inyectaron 20 µL de cada muestra, por triplicado, en una columna C18 Å de 5 µm (250 x 4,6 mm), con precolumna acoplada (Security Guard Cartridges PFD 4 x 3,0 mm), suministrados por Phenomenex (California, EE. UU.). El instrumental empleado consistió en un cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies 1220 Infinity, equipado con autoinyector (G1313, Agilent Technologies) y un detector de red de diodos (1260, Agilent Technologies, California, EE. UU.). La fase móvil estuvo compuesta por 5% de ácido fórmico en agua MilliQ (solvente A) y metanol (solvente B). Los resultados se registraron con un procesador Agilent ChemStation. Las longitudes de onda se registraron a 520 nm, para antocianos y 280 nm para flavanonas. La cuantificación de polifenoles se realizó aplicando

el método previamente reportado por el grupo de investigación (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2014). Para las curvas patrón se empleó cianidina 3-O-glucósido, para la cuantificación de los antocianos y hesperidina para las flavanonas. Las concentraciones se expresaron en mg por 100 mL de jugo.

#### 5.2.6 *Determinación Microbiológica*

Para las bebidas seleccionadas como más idóneas para su comercialización, en cuanto a concentración de compuestos bioactivos y características organolépticas, se realizó un estudio con el fin de optimizar su pasteurización. Para ello se procedió a un análisis microbiológico, antes de la pasteurización (control, P1\*, P2\* y P3\*) y tras los tratamientos térmicos (pasteurización, P1, P2 y P3). Se determinó la presencia de microorganismos psicrófilos y mesófilos, levaduras y mohos. Para los recuentos en placa de bacterias viables mesófilas y psicrófilos se utilizó Agar (PCA, Sharlab, Barcelona), incubadas 24h a 37°C y durante 1 semana a 7°C. Las levaduras y los mohos se sembraron en agar rosa de Bengala (Sharlab, Barcelona) y se incubaron a 25°C durante 1 semana (tras el tiempo de incubación se realizó el conteo de colonias).

#### 5.3 *Análisis estadístico*

Los resultados se presentaron como medias  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Se llevó a cabo un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) y pruebas de rango múltiple de Tukey. El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando R de la versión Rstudio 1.4.1106 (RStudio Team, 2015).

## 5.4 Resultados y Discusión

### 5.4.1 Base de la bebida funcional

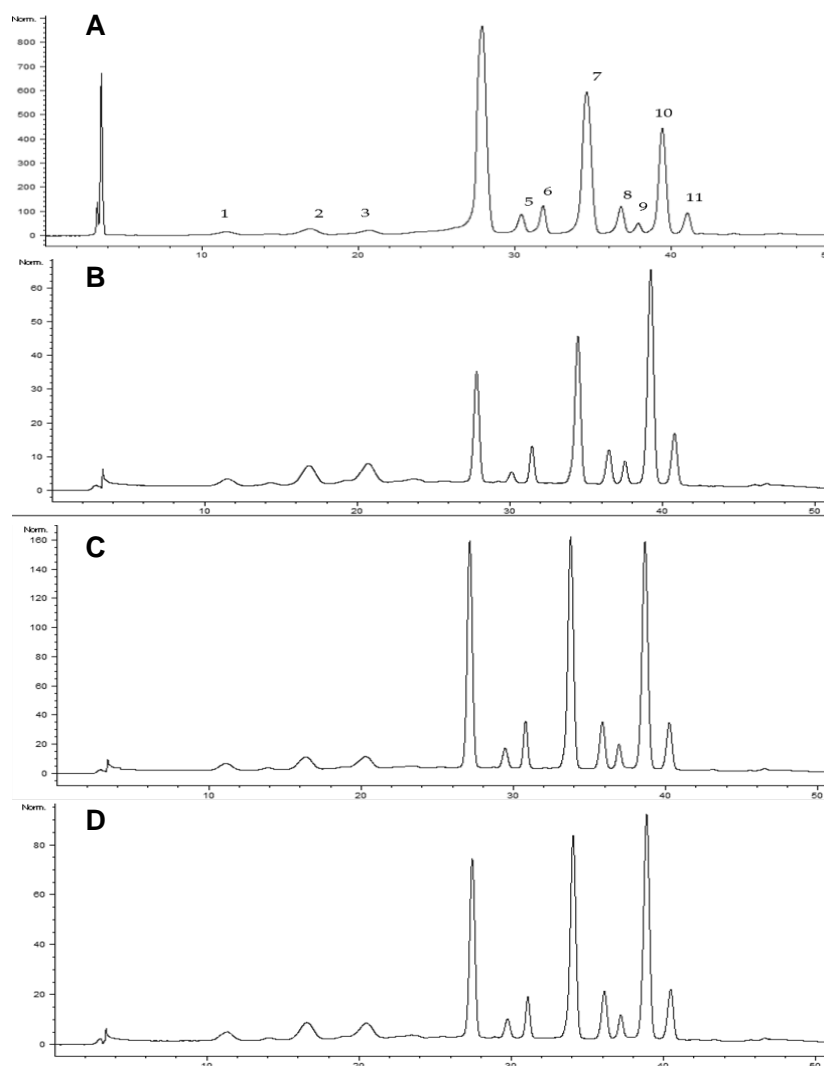
Como se indicó anteriormente, se llevó a cabo un estudio, en sistema modelo, preliminar para determinar la influencia de la combinación de cítricos con calafate, para lo cual el control se estableció disolviendo el calafate (5% p/v) en agua acidificada a igual pH que los zumos cítricos (pH 3) y la combinación de este fruto con zumos de naranja o limón, en las mismas concentraciones, con el fin de determinar el comportamiento de los antocianos, en presencia de las flavanonas y otros bioactivos de cítricos.

Se observó que el limón aumentaba la concentración de antocianos (Tabla 8), tanto individuales como totales, disminuyendo al adicionar la naranja, por lo que la combinación con limón es la más idónea, si bien organolépticamente no presenta aceptación, debido a su gran acidez.

**Tabla 8.** Principales antocianos detectados (mg 100 mL<sup>-1</sup>) de calafate cuando se combinan con zumos de cítricos.

N° peak	Antocianos	Agua acidificada	Limón	Naranja
4	<b>Dp 3-glc</b>	1.51 ± 0.31 Abc	5.78 ± 0.02 Bf	3.23 ± 0.63 Ab
5	<b>Dp 3-rut</b>	0.17 ± 0.03 Aa	0.53 ± 0 BCa	0.36 ± 0.07 Ba
6	<b>Cy 3-glc</b>	0.43 ± 0.08 ab	1.02 ± 0 c	0.62 ± 0.12 a
7	<b>Pt 3-glc</b>	2.2 ± 0.45 cd	6.48 ± 0 g	3.97 ± 0.79 b
8	<b>Pt 3-rut</b>	0.49 ± 0.09 ab	1.26 ± 0.01 d	0.88 ± 0.17 a
9	<b>Pn 3-glc</b>	0.28 ± 0.05 ab	0.58 ± 0 b	0.38 ± 0.07 a
10	<b>Mv 3-glc</b>	3.26 ± 0.68 d	6.6 ± 0 h	4.49 ± 0.9 b
11	<b>Mv 3-rut</b>	0.76 ± 0.16 ab	1.31 ± 0.01 e	0.98 ± 0.19 a
	TOTAL (mg 100 mL <sup>-1</sup> )	9.1	23.6	14.9

Dp 3-glc: delfinidina 3-glucósido; Dp 3 rut: delfinidina 3-rutinósido; Cy 3-glc: cianidina 3-glucósido; Pt 3-glc: petunidina 3-glucósido; Pt 3-rut: petunidina 3-rutinósido; Pn 3-glc: peonidina 3-glucósido; Mv 3-glc: malvidina 3-glucósido; Mv 3-rut: malvidina 3-rutinósido. Letras distintas en la misma columna expresa diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre columnas ( $p \leq 0.05$ ). El número de la columna a la izquierda de los antocianos corresponde al identificador de los cromatogramas que se muestra en la Figura 15A donde se observan los antocianos mayoritarios presentes en calafate identificados y cuantificados y la variación de cada uno de ellos cuando se combinó con agua acidificada (Fig.15B) limón (Fig. 15C) y naranja (Fig. 15D).



**Figura 15.** Identificación y comparación entre los antocianos detectados en el extracto puro de baya de calafate (A) combinadas con agua acidificada (B) limón (C) y naranja (D).

Los frutos seleccionados para el diseño de la nueva bebida fueron elegidos por su composición y bioactividad conocidas, reportadas en estudios anteriores (Romero-Román *et al.*, 2021) o con cítricos (Agulló *et al.*, 2021). En este sentido calafate es fuente de bioactivos y por ende de colorantes naturales debido a la presencia de antocianos (delfinidina, malvidina y petunidina mayoritariamente), con alta capacidad antioxidante, cardioprotectora (Calfío & Huidobro-Toro, 2019) y antidiabética (Bustamante *et al.*, 2018). Respecto a los

cítricos estos poseen vitamina C y varios compuestos bioactivos (narinrutina, narangina, eriocitrina, neohesperidina y hesperidina, principalmente), que podrían proporcionar beneficios adicionales para la salud frente a diversas enfermedades crónicas, metabólicas y neurológicas (Hwang *et al.*, 2017).

El limón potenció los antocianos detectados en las bebidas y la naranja mejoró sus características organolépticas, a la vez que aportó compuestos bioactivos (flavanonas) adicionales a los antocianos de calafate. La delphinidina 3-O-glucósido aumentó un 52,3 % cuando se combinó el calafate con naranja, mientras que con limón el aumento supuso un 73,8%. Una situación similar sucedió con otros antocianos, donde la combinación con limón representó en todos los casos el mayor aumento con respecto al agua acidificada. Por otro lado, se identificaron y compararon los perfiles cromatográficos entre el extracto puro de calafate *versus* las diluciones con agua acidificada, naranja y limón (Fig. 15). Se corroboró que la incorporación de otros frutos con características funcionales (en este caso naranja o limón) incrementaban las concentraciones de compuestos bioactivos, mejorando las características organolépticas y la actividad biológica del producto final (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2014b).

Respecto de las flavanonas (Tabla 9) se detectaron eriocitrina y hesperidina en el caso de mezcla con zumo de limón y naringenina y hesperidina en el caso de naranja.

**Tabla 9.** Flavanonas detectadas en cítricos

Tratamientos	Eriocitrin		Naringenin		Hesperidin	
C+limón	8.80	± 1.93 <sup>bc</sup>	0.00	± 0.00 <sup>a</sup>	4.65	± 2.11 <sup>a</sup>
C+limón+naranja	6.83	± 0.79 <sup>b</sup>	4.45	± 0.54 <sup>b</sup>	7.18	± 0.71 <sup>a</sup>
control limón	13.51	± 1.51 <sup>c</sup>	0.00	± 0.00 <sup>a</sup>	7.59	± 0.85 <sup>a</sup>
control naranja	0.74	± 0.00 <sup>a</sup>	4.42	± 0.36 <sup>b</sup>	5.87	± 0.48 <sup>a</sup>
Ctrl (-) C+ácido cítrico	-	-	-	-	-	-

Valores expresados en mg 100 mL<sup>-1</sup> Letras distintas en la misma columna expresa diferencias significativas (p≤0.05). C=calafate. Los tratamientos corresponden a las formulaciones antes del tratamiento de pasteurización

#### 5.4.2 Diseño de una nueva bebida

Dados estos resultados se procedió a la formulación de una bebida con base de cítricos y calafate, con el fin de obtener un producto rico en compuestos bioactivos procedentes de los diferentes frutos, centrando la atención en la posible interferencia de la adición de naranja y sacarosa a la bebida de calafate con limón (que era la que mejores resultados había presentado). Todo ello basado en trabajos previos (Salar *et al.*, 2020) donde se utilizó sacarosa para endulzar la bebida ya que había obtenido los mejores resultados a nivel organoléptico, sin alteración en cuanto a la composición de bioactivos. Además, la aceptación de las bebidas frescas es mayor cuando el producto tiene azúcar adicional a la que le aportan las frutas de forma natural. Con esta premisa, se procedió a comparar tres tratamientos: combinación de zumo de limón y 5% de calafate (Tratamiento 1), limón más 5% de calafate y sacarosa (Tratamiento 2) y limón, 5% de calafate, zumo de naranja y sacarosa (Tratamiento 3), con el control. Obteniendo los valores iniciales que se muestran en la tabla 10, donde se observa un incremento de flavanonas proporcional a las mezclas y una mejor conservación de antocianos, en el caso del limón sólo, empeoramiento al incluir sólo la sacarosa, pero una mejoría al adicionar también la naranja, indicando que esta mezcla es organolépticamente más aceptable que el limón sólo con el endulzante, sin el efecto negativo de la única inclusión de la sacarosa.

**Tabla 10** Antocianos y Flavanonas en formulados de calafate antes del tratamiento térmico

Trat.	Antocianos						Flavanonas			TOTAL
	Dp 3-glc	Dp 3-rut	Cy 3-glc	Pt 3-glc	Mv 3-glc	Pn 3-glc	Erioc.	Naring.	Hesp.	
T1	7.25	0.62	1.4	5.23	4.54	0.7	10.2	0	7.86	37.81
T2	3.86	0.48	1.5	3.34	1.67	0.4	4.6	0.0	5.7	21.56
T3	4.04	0.49	2.2	2.07	0.87	0.0	10.4	3.6	11.2	34.85

T1 = limón + calafate, T2 limón + calafate + azúcar, T3= limón + naranja + calafate + azúcar. Dp 3 glc: delfinidina 3-glucósido; Dp 3-rut: Delfinidina 3-rutinósido; Cy 3-glc: Cianidina 3-glucósido; Pt 3-glc: Petunidina 3-glucosido; Mv 3-glc: Malvidina 3-glucósido; Pn 3-glc: Peonidina 3-glucósido; Erioc:eriocitrina, Naring:naringenina, Hesp:Hesperidina

En cuanto a la estabilidad de compuestos bioactivos de bebidas funcionales otros investigadores recomiendan el uso de distintas fuentes endulzantes que aportaran mayor estabilidad y evitan la co-pigmentación (Türkyılmaz et al., 2019), sobre todo cuando se registran varios antocianos como sucede en el caso de las bebidas formuladas en base a calafate. No obstante, en este trabajo en particular, la co-pigmentación no fue tan evidente en la bebida enriquecida con calafate ya que la coloración rojiza de la nueva bebida de calafate y mezclas de cítricos mantuvo una apariencia natural y fresca a los 30 días de conservación.

En este sentido, se ha reportado que la concentración total de antocianos en las bebidas funcionales (degradación reducida), depende de la temperatura y el pH ácido aportado por los cítricos, factores que influyen en la estabilidad de las antocianos (Agulló et al., 2021) y, por lo tanto, en los parámetros de color. Por otro lado, se confirmó el mismo patrón de antocianos presentes en estudios previos de calafate (López et al., 2018; Romero-Román et al., 2021; Ruiz et al., 2013), comprobando que su alta concentración se mantiene durante la etapa de almacenamiento.

#### 5.4.2 *Parámetros de calidad e inocuidad*

Respecto a los parámetros de calidad, los sólidos solubles totales presentaron valores ligeramente más bajo de lo esperado, mientras que el pH fue similar para todos los tratamientos. El color presentó leves variaciones en las componentes  $a^*$  y  $b^*$  (Tabla 11).

El pH y la acidez total fueron similares en todas las bebidas, no obstante, entre los tratamientos las diferencias fueron significativas, si bien no perceptibles. De igual modo, el color de las bebidas se mantuvo durante todo el periodo de estudio (Tabla 11). No obstante, el color y los leves cambios observados en sus componentes (parámetros CIE  $L^*a^*b^*$ ), durante el almacenamiento, se debió a las posibles degradaciones que sufrieron los



compuestos bioactivos al estar expuestos 25°C durante 4 semanas, sin embargo, aunque el color de los alimentos es un factor clave en la evaluación de la calidad sensorial (Stich, 2016), los observados no fueron perceptibles al ojo humano.

**Tabla 11** Parámetros de calidad de la bebida (SST, AT, pH y color)

Trat.	°Brix	Acidez	pH	L*	a*	b*	C*	h
T1	1.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.6 ± 0 <sup>a</sup>	62 ± 0.1 <sup>a</sup>	50 ± 0.2 <sup>c</sup>	11 ± 0 <sup>b</sup>	51 ± 0.2 <sup>c</sup>	13 ± 0 <sup>a</sup>
T2	8.4 ± 0.1 <sup>c</sup>	1.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.6 ± 0 <sup>a</sup>	65 ± 0.1 <sup>b</sup>	44 ± 0 <sup>b</sup>	13 ± 0.2 <sup>c</sup>	45 ± 0.1 <sup>b</sup>	16 ± 0.3 <sup>b</sup>
T3	13 ± 0 <sup>b</sup>	2.2 ± 0.7 <sup>b</sup>	2.9 ± 0 <sup>b</sup>	75 ± 0.1 <sup>d</sup>	26 ± 0 <sup>a</sup>	19 ± 0.6 <sup>d</sup>	32 ± 0.3 <sup>a</sup>	36 ± 0.8 <sup>c</sup>
T4	0.4 ± 0 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	3 ± 0 <sup>b</sup>	68 ± 0.3 <sup>c</sup>	44 ± 0.3 <sup>b</sup>	9.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	45 ± 0.3 <sup>b</sup>	12 ± 0.3 <sup>a</sup>

Trat. = Tratamientos, T1 = limón + calafate, T2 limón + calafate + azúcar, T3= limón + naranja + calafate + azúcar, T4 = control (calafate en ácido cítrico). SST se expresaron como °Bx, AT como mg ácido cítrico/100 mL y L\*, a\*, b\*, C\*, h = Parámetros CIE L\*a\*b\*. Medidas con letra minúscula no son significativamente diferentes (p>0.05)

#### 5.4.1 Evaluación de estabilidad antocianos y capacidad antioxidante en bebidas

Con el fin de observar el comportamiento durante la pasteurización y posterior almacenamiento, de las diferentes bebidas formuladas (T1, T2, T3 y T4- control), se sometieron todas ellas un proceso de pasteurización, previamente establecido en el LabFAS, tal como se ha indicado anteriormente (Salar *et al* 2020), observando que las pérdidas de antocianos al cabo de cuatro semanas de almacenamiento fueron de tan sólo el 20% a 5 °C (Tabla 12), pero a 25 °C rondó el 40 %. Estos resultados coinciden con la relación negativa estadísticamente significativa (p<0.05) entre la temperatura de almacenamiento y la degradación de estos compuestos, reportada previamente debido al efecto deletéreo de los productos formados como resultado de la degradación (Salar *et al.*, 2020).

**Tabla 122.** Evaluación de degradación de antocianos de calafate presentes en bebidas formuladas (tres tratamientos) y pasteurizadas a 4 semanas y dos temperaturas de almacenamiento (5 y 25 °C).

Tiempo Alm	Temp. Alm	Trat. Past	Dp 3-glc	Dp 3-rut	Cy 3-glc	Pt 3-glc	Mv 3-glc	Pn 3-glc
1 semanas	a	T1	5.73	0.55	3.07	5.33	3.55	0.37
	a	T2	4.59	0.41	0.94	4.92	3.40	0.49
	a	T3	3.84	0.45	0.01	3.51	3.24	0.01
	b	T1	5.00	0.50	1.33	4.27	3.53	0.37
	b	T2	3.81	0.82	3.29	0.22	2.83	0.44
	b	T3	4.62	0.90	3.96	0.39	3.42	0.54
2 semanas	a	T1	4.40	0.59	2.95	2.88	0.13	0.01
	a	T2	3.84	0.85	3.25	2.88	0.39	0.01
	a	T3	3.60	0.44	1.88	2.33	0.16	0.01
	b	T1	3.21	1.09	2.67	1.97	0.26	0.01
	b	T2	3.28	0.57	2.18	1.92	1.25	0.01
	b	T3	3.51	0.44	1.69	0.63	0.01	0.01
4 semanas	a	T1	3.55	0.68	1.53	1.78	0.33	0.01
	a	T2	2.61	0.42	1.47	1.26	0.01	0.01
	a	T3	3.67	0.40	1.47	1.98	0.01	0.01
	b	T1	2.40	0.79	1.47	1.65	0.01	0.01
	b	T2	3.17	1.07	2.70	2.44	0.01	0.01
	b	T3	2.42	0.72	2.00	1.66	0.01	0.01

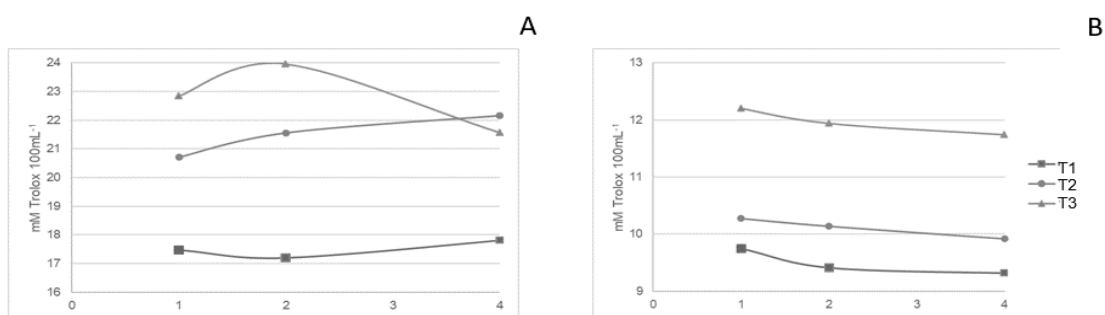
Tratamientos: T1 = limón + calafate, T2 limón + calafate + azúcar, T3= limón + naranja + calafate + azúcar. Dp 3 glc: delfinidina 3-glucósido; Dp 3-rut: Delfinidina 3-rutinósido; Cy 3-glc: Cianidina 3-glucósido; Pt 3-glc: Petunidina 3-glucósido; Mv 3-glc: Malvidina 3-glucósido; Pn 3-glc: Peonidina 3-glucósido. a- 5°C y b 25°C

En cuanto a los antocianos analizados de forma individual, en las bebidas formuladas en base a calafate (Tabla 12), a 25°C, la mayor degradación se reflejó en malvidina 3-glucósido y peonidin 3-glucósido ya tras cuatro semanas de conservación la detección fue mínima en todos los tratamientos. La temperatura de almacenamiento de 5 °C afectó ligeramente a la concentración de delfinidina 3-glucósido y petunidina 3-glucósido, presentando una reducción de 38% y 67% respectivamente, cuando la formulación se hizo solo con limón. Esta pérdida de antocianos fue menor cuando se incorporó naranja y sacarosa en la formulación, así, para la delfinidina 3-glucósido se reportó 5% de pérdida y 43% para la petunidina 3-glucósido. Se puede atribuir que los compuestos de

la naranja y el limón son eficientes para otorgar estabilidad (Kaderides *et al.*, 2020) a los antocianos procedentes del calafate.

En cuanto a la capacidad antioxidante de los formulados (Fig. 16) varió ligeramente, no obstante, las diferencias no fueron significativas ni entre tratamientos ni con el tiempo. Los contenidos polifenólicos del calafate otorgaron a los formulados una alta capacidad antioxidante, probada mediante los ensayos ORAC y DPPH<sup>\*</sup>, sin embargo, la incorporación de los cítricos mejoró esta característica gracias a los flavonoides de la naranja y el limón.

Nuestros resultados para preparar bebidas funcionales en combinación con limón incorporando otros frutos rojos son similares a los obtenidos por otros autores (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2014b; Salar *et al.*, 2020). Estudios previos aseguran que la capacidad antioxidante depende en gran medida de los compuestos polifenólicos que se suman a los formulados cuando se utilizan diferentes materiales de origen vegetal (Hernández-Herrero & Frutos, 2014).



**Figura 16.** Evaluación los ensayos DPPH<sup>\*</sup> y ORAC de los formulados a partir de calafate a 1, 2 y 4 semanas. T1 = limón + calafate, T2 limón + calafate + azúcar, T3= limón + naranja + calafate + azúcar.

#### 5.4.2 Influencia de pasteurización

En cuanto a la inocuidad de las bebidas ya seleccionadas como más aceptables (T3), el conteo de microorganismos psicrófilos, mesófilos, así como mohos y levaduras indicó que el tratamiento térmico corto (3 minutos) con alta temperatura 95°C (P3) era el más idóneo, así como el almacenamiento a 5°C, para la reducir y minimizar el crecimiento microbiano, mientras que el tratamiento de 4 minutos a 85°C (P1) era el peor ya que mostró presencia de psicrófilos, mesófilos, mohos y levaduras tras la conservación (Tabla 13).

**Tabla 133.** Evaluación y conteo de microorganismos psicrófilos, mesófilos y levaduras a temperaturas óptimas para cada uno de ellos durante el almacenamiento (1,2 y 4 semanas) de bebidas a partir de calafate

	PSICROFILOS (7°C)			MESÓFILOS (37°C)			MOHOS Y LEVADURAS (37°C)		
	1	2	4	1	2	4	1	2	4
P1*	<10	70 <sup>1</sup>	1.2 <sup>2</sup>	<10	<10	<10	<10	1.6 <sup>2</sup>	<1.8 <sup>3 -1</sup>
P1	<10	20	40	<10	<10	<10	<10	<10	30
P2*	<10	2.2 <sup>2</sup>	3.4 <sup>2</sup>	<10	40	90	1.6 <sup>2</sup>	1.8 <sup>2</sup>	2.1 <sup>2</sup>
P2	<10	<10	<10	<10	<10	20	<10	<10	20
P3*	<10	1.2 <sup>2</sup>	1.5 <sup>2</sup>	<10	<10	<10	<10	1.2 <sup>2</sup>	1.2 <sup>2</sup>
P3	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

P1: Tratamiento a 85°C /4 min; P2: Tratamiento a 90°C /4 min; P3: Tratamiento a 95°C/3min; P1\*, P2\* y ;P3\* (Formulados sin tratamiento térmico). Resultados expresados en (unidades formadoras de colonia mL<sup>-1</sup> (CFU mL<sup>-1</sup>))

La seguridad microbiológica y la calidad son fundamentales en una bebida funcional. Gracias a los tratamientos térmicos se puede reducir la carga de microorganismos y a la vez inhibir algunas enzimas de degradación (Gironés-Vilaplana *et al.*, 2014b). El mínimo permitido y recomendado por la FDA (Yan *et al.*, 2020) para mohos y levaduras es del 25% y a pesar de que, en el conteo del presente trabajo, las cifras reportadas en P1 y P2 no alcanzaron dicho porcentaje, se determinó que el P3 era el más seguro para las bebidas formuladas con calafate en base a limón, naranja y sacarosa. La presencia de

levaduras y mohos puede provocar cambios que afecten la calidad e inocuidad del producto, facilitando el crecimiento de bacterias y produciendo cambios de pH y solubilización de nutrientes (Stich, 2016), por eso es importante analizarlos en el desarrollo de las bebidas funcionales.

## **5.5 Conclusiones**

La formulación de una bebida con base a calafate con limón, adición de naranja y sacarosa, puede ser una buena alternativa a otras bebidas saludables, ya que presenta altas concentraciones de antocianos y flavanonas, siendo, estos compuestos bioactivos estables tras 30 días de almacenamiento a 25 ó 5°C.

La combinación con limón resulta efectiva para incrementar la concentración y aportar estabilidad a los de antocianos, de calafate, mientras que la incorporación de naranja enriquece en otros compuestos bioactivos a la par que otorga mejores características organolépticas. Por otro lado, la sacarosa no tiene influencia negativa en dichas propiedades, haciendo el producto más aceptable. Aspectos como el pH, acidez titulable, sólidos solubles totales y color se vieron solo ligeramente modificados, sin que fueran determinantes en la calidad final.

El mejor sistema de pasteurización de la bebida es a 95°C, durante 3 minutos. Estas evidencias, en cuanto a compuestos bioactivos, calidad de la bebida, estabilidad y seguridad, de una bebida basada en un fruto patagónico con alto contenido de antocianos sientan la base para un desarrollo industrial en un marco de sostenibilidad, inocuidad y seguridad alimentaria.

## Chapter VI

---

## Conclusions

## VI. CONCLUSIONES GENERALES

Esta investigación destaca el potencial de calafate en tres aspectos importantes: a) perfil polifenólico y plasticidad respecto a la radiación solar global y la temperatura, b) estabilidad de sus compuestos frente a la microencapsulación y actividad biológica con efectos antioxidantes, anticolinérgicos y de neuroprotección, y, c) aplicación en la industria alimentaria para el desarrollo de bebidas funcionales. Respecto a los aspectos mencionados con esta tesis se concluye:

a) Las condiciones de luz y temperatura no son determinantes para las características fisicoquímicas del calafate, pero causan modificaciones en la concentración de antocianos, si bien su concentración sigue siendo alta. Estas condiciones deben ser consideradas a la hora de cultivar este fruto.

b) La encapsulación por secado por atomización, es eficiente para la obtención de microcápsulas de calafate en términos de mantener el contenido de polifenoles, alta capacidad antioxidante, potencial biológico para trastornos neurodegenerativos. Por lo tanto, se puede utilizar para extractos de frutos de calafate con el fin de escalar y producir nuevas formulaciones de alimentos de valor agregado.

c) El desarrollo de una nueva bebida funcional enriquecida con calafate en base a limón y una combinación con otros cítricos, endulzado con sacarosa es una aplicación viable para tomar ventaja de las altas concentraciones de compuestos fenólicos de calafate. La combinación con limón resulta efectiva para incrementar la concentración de antocianos, así como para aportar estabilidad a los compuestos fenólicos de calafate. La adición de naranja aporta compuestos bioactivos y mejora las características organolépticas de la bebida y un tratamiento térmico suave permite garantizar la seguridad e inocuidad de la nueva posible bebida funcional.

## 6.1 Conclusions

This research highlights the potential of calafate in three important topics: a) The polyphenolic profile and plasticity facing global solar radiation and temperature, b) Stability of calafate compounds against microencapsulation and biological activity with antioxidant, anticholinergic and neuroprotective effects, and, c) Application in the food industry for the development of functional beverages based on calafate. Regarding the aspects mentioned with this thesis, it is concluded:

a) The light and temperature conditions are not decisive for the physicochemical characteristics of the calafate, but they cause modifications in the anthocyanin concentration, although its concentration remains high. These conditions must be considered when growing this fruit.

b) Encapsulation by Spray drying is efficient for obtaining calafate microcapsules in terms of maintaining polyphenol content, high antioxidant capacity, and biological potential for neurodegenerative disorders. Therefore, it can be used for calafate fruit extracts in order to scale and produce new value-added food formulations.

c) The development of a new functional beverage enriched with calafate based on lemon and a combination with other citrus fruits, sweetened with saccharose is a viable application to take advantage of the high concentrations of phenolic compounds in calafate. The combination with lemon is effective to increase the concentration of anthocyanins, as well as to provide stability to the phenolic compounds of calafate. The addition of orange provides bioactive compounds and improves the organoleptic characteristics of the drink and a mild heat treatment ensures the safety and innocuousness of the new possible functional drink.



## Chapter VII

---

## References

- Agulló, V., García-Viguera, C., & Domínguez-Perles, R. (2021). Beverages Based on Second Quality Citrus Fruits and Maqui Berry, a Source of Bioactive (Poly)phenols: Sorting Out Urine Metabolites upon a Longitudinal Study. *Nutrients*, 13(2), 312. <https://doi.org/10.3390/nu13020312>
- Agulló, V., Villaño, D., García-Viguera, C., & Domínguez-Perles, R. (2020). Anthocyanin Metabolites in Human Urine after the Intake of New Functional Beverages. *Molecules*, 25(2), 371. <https://doi.org/10.3390/molecules25020371>
- Akhavan Mahdavi, S., Jafari, S. M., Assadpoor, E., & Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 379-385. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011>
- Amalesh, S., Kumar, S., & Das, G. (2011). Roles of flavonoids in Plants. *ResearchGate*. [https://www.researchgate.net/publication/279499208\\_Roles\\_of\\_flavonoids\\_in\\_Plants](https://www.researchgate.net/publication/279499208_Roles_of_flavonoids_in_Plants)
- Anuar, N., Taha, R. M., Mahmad, N., Mohajer, S., Che Musa, S. A. N., & Zainal Abidin, Z. H. (2017). Correlation of colour, antioxidant capacity and phytochemical diversity of imported saffron by principal components analysis. *Pigment & Resin Technology*, 46(2), 107-114. <https://doi.org/10.1108/PRT-09-2015-0091>
- Araya, M. (2010). Estudio preliminar de la composición química y el valor nutricional de frutos regionales de interés económico y sociocultural de Magallanes. Trabajo de Titulación para la obtención de ingeniero en química y medio ambiente Universidad de Magallanes, Punta arenas, Chile. *Universidad de Magallanes, Chile*.
- Arena, M. E., Pastur, G. M., Lencinas, M. V., Soler, R., & Bustamante, G. (2020). Changes in the leaf nutrient and pigment contents of *Berberis microphylla* G. Forst. In relation to irradiance and fertilization. *Heliyon*, 6(1), e03264.
- Arribillaga G., P. (2001). *Domesticación del calafate (Berberis buxifolia L.) para fines agroindustriales*. (p. 144). INIA. <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/apartado/NR39696.pdf>
- Augustin, M. A., & Sanguansri, L. (2015). Challenges and solutions to incorporation of nutraceuticals in foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 463-477. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015507>

- Aun, M., Lakkala, K., Sanchez, R., Asmi, E., Nollas, F., Meinander, O., Sogacheva, L., Bock, V. D., Arola, A., Leeuw, G. de, Aaltonen, V., Bolsée, D., Cizkova, K., Mangold, A., Metelka, L., Jakobson, E., Svendby, T., Gillotay, D., & Opstal, B. V. (2020). Solar UV radiation measurements in Marambio, Antarctica, during years 2017–2019. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 20(10), 6037-6054. <https://doi.org/10.5194/acp-20-6037-2020>
- Azuma, A., Yakushiji, H., Koshita, Y., & Kobayashi, S. (2012). Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature and light conditions. *Planta*, 236(4), 1067-1080. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1650-x>
- Baptista, F. I., Henriques, A. G., Silva, A. M. S., Wiltfang, J., & da Cruz e Silva, O. A. B. (2014). Flavonoids as Therapeutic Compounds Targeting Key Proteins Involved in Alzheimer's Disease. *ACS Chemical Neuroscience*, 5(2), 83-92. <https://doi.org/10.1021/cn400213r>
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Boeing, J. S., Barizão, É. O., e Silva, B. C., Montanher, P. F., de Cinque Almeida, V., & Visentainer, J. V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: Application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8. <https://doi.org/10.1186/s13065-014-0048-1>
- Bondet, V., & Berset, C. (1997). *Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method*. 30(6), 6.
- Braga, A. R. C., Murador, D. C., de Souza Mesquita, L. M., & de Rosso, V. V. (2018). Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.031>
- Brauch, J. E., Reuter, L., Conrad, J., Vogel, H., Schweiggert, R. M., & Carle, R. (2017). Characterization of anthocyanins in novel Chilean maqui berry clones by HPLC–DAD–ESI/MSn and NMR-spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.003>
- Brito, A., Areche, C., Sepúlveda, B., Kennelly, E. J., & Simirgiotis, M. J. (2014). Anthocyanin Characterization, Total Phenolic Quantification and Antioxidant Features of Some Chilean Edible Berry Extracts. *Molecules*, 19(8), 10936-10955. <https://doi.org/10.3390/molecules190810936>

- Bustamante, L., Pastene, E., Duran-Sandoval, D., Vergara, C., Von Baer, D., & Mardones, C. (2018). Pharmacokinetics of low molecular weight phenolic compounds in gerbil plasma after the consumption of calafate berry (*Berberis microphylla*) extract. *Food chemistry*, 268, 347-354.
- Caballero, E. (2013). *Entrada de calcio inducida por los oligómeros del péptido amiloide en la Enfermedad de Alzheimer*.
- Calabi, A., Thenoux, G., Sandoval, G., & Valdés, G. (2013). Orujo de uva post proceso de vinificación, una alternativa para mejorar la durabilidad de los pavimentos asfálticos. *Revista Ingeniería de Obras Civiles*, 3, 18-29.
- Calfío, C., & Huidobro-Toro, J. P. (2019). Potent vasodilator and cellular antioxidant activity of endemic patagonian calafate berries (*Berberis microphylla*) with nutraceutical potential. *Molecules*, 24(15), 2700.
- Camargo, L. (1966). *Especies nuevas del género Berberis de Colombia, Ecuador y Venezuela*. IX(44), 313-350.
- Cardenas, A. (2012). *Identificación e incidencia de Puccinia meyeri-albertii P. Magn. En calafate (Berberis microphylla G. Forst.) y michay (Berberis darwinii Hook.) en el Llano Central de la región de La Araucanía* [Universidad de la Frontera]. <http://bibliotecadigital.ufro.cl/?a=view&item=162>
- Cesa, S., Carradori, S., Bellagamba, G., Locatelli, M., Casadei, M. A., Masci, A., & Paolicelli, P. (2017). Evaluation of processing effects on anthocyanin content and colour modifications of blueberry (*Vaccinium* spp.) extracts: Comparison between HPLC-DAD and CIELAB analyses. *Food chemistry*, 232, 114-123.
- Chamorro, M. F., Reiner, G., Theoduloz, C., Ladio, A., Schmeda-Hirschmann, G., Gómez-Alonso, S., & Jiménez-Aspee, F. (2019). Polyphenol Composition and (Bio)Activity of *Berberis* Species and Wild Strawberry from the Argentinean Patagonia. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(18). <https://doi.org/10.3390/molecules24183331>
- COFENAT, P. por A. (2017). *Alimentos ricos en antocianina*. <http://blog.aptn-cofenat.es/2017/05/alimentos-ricos-en-antocianina.html>
- Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P. S., Esnoz, A., & Palop, A. (2009). Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 506-513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04236.x>
- Ćujić, N., Savikin, K., Miloradovic, Z., Ivanov, M., Vajic, U.-J., Karanovic, D., Grujic-Milanovic, J., Jovovic, D., & Mihailovic-Stanojevic, N. (2018). Characterization of dried chokeberry fruit extract and its chronic effects on

- blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, *44*, 330-339.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*, *18*(14), 1818-1892.
- Del-Castillo-Alonso, M. Á., Castagna, A., Csepregi, K., Hideg, É., Jakab, G., Jansen, M. A., Jug, T., Llorens, L., Máta, A., & Martínez-Lüscher, J. (2016). Environmental factors correlated with the metabolite profile of *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir berry skins along a European latitudinal gradient. *Journal of agricultural and food chemistry*, *64*(46), 8722-8734.
- Di Vittori, L., Mazzoni, L., Battino, M., & Mezzetti, B. (2018). Pre-harvest factors influencing the quality of berries. *Scientia Horticulturae*, *233*, 310-322. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.058>
- Dixon, R. A., & Pasinetti, G. M. (2010). Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience. *Plant Physiology*, *154*(2), 453-457. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161430>
- Dominguez, E., Leod, C., Pino, T., sepúlveda, P., Aguila, K., & Ojeda, A. (2017). *Funciones y servicios del calafate en la región del Magallanes* (N.º 67; INIA Kampenaike). Ministerio de Agricultura, Instituto de Investigaciones Agropecuarias. <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/informativos/NR40591.pdf>
- Durmus, D. (2020). CIELAB color space boundaries under theoretical spectra and 99 test color samples. *Color Research & Application*, *45*(5), 796-802.
- Eichholz, I., Huyskens-Keil, S., Keller, A., Ulrich, D., Kroh, L. W., & Rohn, S. (2011). UV-B-induced changes of volatile metabolites and phenolic compounds in blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301920818>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, *7*(2), 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Fallico, B., Ballistreri, G., Arena, E., Brighina, S., & Rapisarda, P. (2017). Bioactive compounds in blood oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck): Level and intake. *Food chemistry*, *215*, 67-75.
- Faustino, M., Veiga, M., Sousa, P., Costa, E. M., Silva, S., & Pintado, M. (2019). Agro-Food Byproducts as a New Source of Natural Food Additives. *Molecules*, *24*(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061056>

- F. Bais, A., L. McKenzie, R., Bernhard, G., J. Aucamp, P., Ilyas, M., Madronich, S., & Tourpali, K. (2015). Ozone depletion and climate change: Impacts on UV radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *14*(1), 19-52. <https://doi.org/10.1039/C4PP90032D>
- Fernandes de Oliveira, A., Mercenaro, L., Del Caro, A., Pretti, L., & Nieddu, G. (2015). Distinctive Anthocyanin Accumulation Responses to Temperature and Natural UV Radiation of Two Field-Grown *Vitis vinifera* L. Cultivars. *Molecules*, *20*(2), 2061-2080. <https://doi.org/10.3390/molecules20022061>
- Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., & Mateus, N. (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, *7*, 54-66. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.05.010>
- Forzato, C., Vida, V., & Berti, F. (2020). Biosensors and Sensing Systems for Rapid Analysis of Phenolic Compounds from Plants: A Comprehensive Review. *Biosensors*, *10*(9), 105. <https://doi.org/10.3390/bios10090105>
- Fredes, C., Becerra, C., Parada, J., & Robert, P. (2018). The Microencapsulation of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) Juice by Spray-Drying and Freeze-Drying Produces Powders with Similar Anthocyanin Stability and Bioaccessibility. *Molecules*, *23*(5), 1227. <https://doi.org/10.3390/molecules23051227>
- Fu, J.-T., Chang, Y.-H., & Shiau, S.-Y. (2015). Rheological, antioxidative and sensory properties of dough and Mantou (steamed bread) enriched with lemon fiber. *LWT - Food Science and Technology*, *61*(1), 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.034>
- Fuentealba, J., Dibarrart, A., Saez-Orellana, F., Fuentes-Fuentes, M. C., Oyanedel, C. N., Guzmán, J., Perez, C., Becerra, J., & Aguayo, L. G. (2012). Synaptic Silencing and Plasma Membrane Dyshomeostasis Induced by Amyloid- $\beta$  Peptide are Prevented by *Aristotelia chilensis* Enriched Extract. *Journal of Alzheimer's Disease*, *31*(4), 879-889. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120229>
- Furriancá, M. C., Alvear, M., Zambrano, T., Fajardo, V., & Salazar, L. A. (2017). Phytochemical constituents of the root of *berberis microphylla*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *10*(6), 225-227. Scopus. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i6.17803>
- GARZÓN, G. A. (2008). Anthocyanins as natural colorants and bioactive compounds: A review. *Acta Biológica Colombiana*, *13*(3), 27-36.
- Gentilucci, M. (2017). *Grapevine prediction of end of flowering date*. 1231-1233.

- Ghosh, D., Choudhury, S. T., Ghosh, S., Mandal, A. K., Sarkar, S., Ghosh, A., Saha, K. D., & Das, N. (2012). Nanocapsulated curcumin: Oral chemopreventive formulation against diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rat. *Chemico-Biological Interactions*, *195*(3), 206-214. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.12.004>
- Gironés-Vilaplana, A., Mena, P., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2014a). Evaluation of sensorial, phytochemical and biological properties of new isotonic beverages enriched with lemon and berries during shelf life. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(6), 1090-1100. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6370>
- Gironés-Vilaplana, A., Mena, P., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2014b). Evaluation of sensorial, phytochemical and biological properties of new isotonic beverages enriched with lemon and berries during shelf life. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(6), 1090-1100. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6370>
- González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*(2), 327-345. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.07.027>
- Gupta, S., Khan, S., Muzafar, M., Kushwaha, M., Yadav, A. K., & Gupta, A. P. (2016). 6 - Encapsulation: Entrapping essential oil/flavors/aromas in food. En A. M. Grumezescu (Ed.), *Encapsulations* (pp. 229-268). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804307-3.00006-5>
- Hepp, K., & Stolpe, N. B. (2014). *Caracterización y propiedades de los suelos de la Patagonia Occidental (Aysén)*.
- Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., & Munné-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science*, *14*(3), 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.12.003>
- Hernández-Herrero, J. A., & Frutos, M. J. (2014). Colour and antioxidant capacity stability in grape, strawberry and plum peel model juices at different pHs and temperatures. *Food Chemistry*, *154*, 199-204. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.007>
- Huang, H., Sun, Y., Lou, S., Li, H., & Ye, X. (2014). *In vitro* digestion combined with cellular assay to determine the antioxidant activity in Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) fruits: A comparison with traditional methods. *Food Chemistry*, *146*, 363-370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.071>

- Hwang, S.-L., Shih, P.-H., & Yen, G.-C. (2017). 8 Neuroprotection by Dietary and Citrus Flavonoids. *Phytochemicals in Citrus: Applications in Functional Foods*.
- Hykkerud, A. L., Uleberg, E., Hansen, E., Vervoort, M., Mølmann, J., & Martinussen, I. (2018). *Seasonal and yearly variation of total polyphenols, total anthocyanins and ellagic acid in different clones of cloudberries (Rubus chamaemorus L.)*.
- INIA. (2018, marzo 26). "Para que el calafate sea una fuente de materia prima segura y de calidad se requiere de investigación, innovación y desarrollo". [Informativa]. Instituto de INvestigaciones Agropecuarias. <http://www.inia.cl/blog/2018/03/26/para-que-el-calafate-sea-una-fuente-de-materia-prima-segura-y-de-calidad-se-requiere-de-investigacion-innovacion-y-desarrollo/>
- Iriondo-DeHond, M., Miguel, E., & Del Castillo, M. D. (2018). Food Byproducts as Sustainable Ingredients for Innovative and Healthy Dairy Foods. *Nutrients*, 10(10), 1358. <https://doi.org/10.3390/nu10101358>
- Jiménez-Aspee, F., Thomas-Valdés, S., Schulz, A., Ladio, A., Theoduloz, C., & Schmeda-Hirschmann, G. (2016). Antioxidant activity and phenolic profiles of the wild currant *Ribes magellanicum* from Chilean and Argentinean Patagonia. *Food Science & Nutrition*, 4(4), 595-610. <https://doi.org/10.1002/fsn3.323>
- Joseph, S. V., Edirisinghe, I., & Burton-Freeman, B. M. (2014). Berries: Anti-inflammatory effects in humans. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(18), 3886-3903.
- Kaderides, K., Mourtzinou, I., & Goula, A. M. (2020). Stability of pomegranate peel polyphenols encapsulated in orange juice industry by-product and their incorporation in cookies. *Food Chemistry*, 310, 125849. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125849>
- Khan, H., Marya, Amin, S., Kamal, M. A., & Patel, S. (2018). Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101, 860-870. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.007>
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1). <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Kumar, J., Park, K.-C., Awasthi, A., & Prasad, B. (2015). Silymarin extends lifespan and reduces proteotoxicity in *C. elegans* Alzheimer's model. *CNS*



& *Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 14(2), 295-302.

- Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintać, D., Majkić, T., Bekvalac, K., Orčić, D., & Mimica-Dukić, N. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods*, 40, 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.047>
- Liu, S.-Y., Lu, S., Yu, X.-L., Yang, S.-G., Liu, W., Liu, X.-M., Wang, S.-W., Zhu, J., Ji, M., Liu, D.-Q., Zhang, Z.-P., & Liu, R.-T. (2018). Fruitless wolfberry-sprout extract rescued cognitive deficits and attenuated neuropathology in Alzheimer's disease transgenic mice. *Current Alzheimer Research*. <https://doi.org/10.2174/1567205015666180404160625>
- López, M. D., Baenas, N., Retamal-Salgado, J., Zapata, N., & Moreno, D. A. (2018). Underutilized Native Biobío Berries: Opportunities for Foods and Trade. *Natural Product Communications*, 13(12), 1934578X1801301226.
- López-Belchí, M. D., Caamaño, E. F., Pascual, G., Noriega, F., Fierro-Morales, P., Romero-Román, M. E., Jara, P., Schoebitz, M., Serra, I., & Moreno, D. A. (2021). Spray-Dried Formulations Rich in Malvidin from Tintorera Grape Wastes: Characterization, Stability, and Storage. *Processes*, 9(3), 518. <https://doi.org/10.3390/pr9030518>
- Luebert, F., & Pliscoff, P. (2006). *Sinopsis bioclimática y vegetacional de Chile*. Editorial Universitaria.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(1), 1-21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x>
- Magrin, G. O., Marengo, J. A., Boulanger, J.-P., Buckeridge, M. S., Castellanos, E., Poveda, G., Scarano, F. R., Barros, V., Field, C., & Dokken, D. (2014). Central and south america. En *Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Cambridge University Press, pp. 1499-1566).
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Assadpoor, E. (2014). Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: A review. *Drying technology*, 32(5), 509-518.
- Manosalva, L., Mutis, A., Diaz, J., Urzúa, A., Fajardo, V., & Quiroz, A. (2014). *Antibacterial activity of alkaloid fractions from berberis microphylla G. Forst and study of synergism with ampicillin and cephalothin*. *Molecules* 2016, 21,. 13(4), 7.

- Manosalva, Loreto, Mutis, A., Díaz, J., Urzúa, A., Fajardo, V., & Quiroz, A. (2014). Identificación de alcaloides isoquinolínicos en *Berberis microphylla* G. Forst mediante CLAE IES-MS/MS. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(4).
- Manosalva, Loreto, Mutis, A., Urzúa, A., Fajardo, V., & Quiroz, A. (2016). Antibacterial activity of alkaloid fractions from *Berberis microphylla* G. Forst and study of synergism with ampicillin and cephalothin. *Molecules*, 21(1), 76.
- Mariangel, E., Reyes-Diaz, M., Lobos, W., Bensch, E., Schalchli, H., & Ibarra, P. (2013). The antioxidant properties of calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four different locations in southern Chile. *Ciencia e investigación agraria*, 40(1), 161-170. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202013000100014>
- Martínez, S. S., Cano, A. R., & Moreno, C. M. F. (2015). El estilo de vida nos define: Dieta y cáncer. *Salud y cuidados en el envejecimiento Volumen III*, 25.
- Meilán, J. J. G., & Gutiérrez, J. M. C. (2017). *Enfermedad de Alzheimer y otras demencias neurodegenerativas: Aspectos psicosociales*. Elsevier Health Sciences Spain.
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D. A., Bartual, J., Saura, D., & Martí, N. (2011). Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1893-1906. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4411>
- Migues, I., Baenas, N., Gironés-Vilaplana, A., Cesio, M. V., Heinzen, H., & Moreno, D. A. (2018). Phenolic Profiling and Antioxidant Capacity of *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) Samples Collected in Different Uruguayan Locations. *Foods*, 7(5), 67. <https://doi.org/10.3390/foods7050067>
- Mokhber-Dezfuli, N., Saeidnia, S., Gohari, A. R., & Kurepaz-Mahmoodabadi, M. (2014). Phytochemistry and Pharmacology of *Berberis* Species. *Pharmacognosy Reviews*, 8(15), 8-15. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.125517>
- Murray, M., Dordevic, A. L., Ryan, L., & Bonham, M. P. (2018). The Impact of a Single Dose of a Polyphenol-Rich Seaweed Extract on Postprandial Glycaemic Control in Healthy Adults: A Randomised Cross-Over Trial. *Nutrients*, 10(3), 270.
- Nahar, L., Onder, A., & Sarker, S. D. (2020). A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids

- (2010–2019). *Phytochemical Analysis*, 31(4), 413-457. Scopus. <https://doi.org/10.1002/pca.2906>
- Noriega, F., Mardones, C., Fischer, S., García-Viguera, C., Moreno, D. A., & Dolores López, M. (2020). Seasonal changes in white strawberry: Effect on aroma, phenolic compounds and its biological activity. *Journal of Berry Research, Preprint*(Preprint), 1-16. <https://doi.org/10.3233/JBR-200585>
- Nunes, N., Leite, A., & Castro, C. (2016). Phenology, reproductive biology and growing degree days of the grapevine 'Isabel'(Vitis labrusca, Vitaceae) cultivated in northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 76(4), 975-982.
- Organización Mundial de la Salud. (2017, diciembre 1). *OMS | Demencia*. WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Parra, A. (2010). Food Microencapsulation: A Review. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5669-5684.
- Pellicciotti, F., Ragetti, S., Careno, M., & McPhee, J. (2014). Changes of glaciers in the Andes of Chile and priorities for future work. *Science of The Total Environment*, 493, 1197-1210. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.055>
- Portal de Servicios Climáticos—Dirección Meteorológica de Chile. (s. f.). Recuperado 14 de julio de 2020, de <https://climatologia.meteochile.gob.cl/application/mensuales/climatMensualDatosDiarios/450004/2019/3>
- Radice, S., & Arena, M. E. (2015). *Environmental effect on the leaf morphology and anatomy of Berberis microphylla G. Forst.*
- Ramsay, R. R., & Tipton, K. F. (2017). Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules*, 22(7), 1192. <https://doi.org/10.3390/molecules22071192>
- Read, M. A. (1995). Flavonoids: Naturally occurring anti-inflammatory agents. *The American Journal of Pathology*, 147(2), 235-237.
- Reyes-Farias, M., Vasquez, K., Fuentes, F., Ovalle-Marin, A., Parra-Ruiz, C., Zamora, O., Pino, M. T., Quitral, V., Jimenez, P., Garcia, L., & Garcia-Diaz, D. F. (2016). Extracts of Chilean native fruits inhibit oxidative stress, inflammation and insulin-resistance linked to the pathogenic interaction

- between adipocytes and macrophages. *Journal of Functional Foods*, 27, 69-83. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.052>
- Reyes-Farias, Marjorie, Vasquez, K., Ovalle-Marin, A., Fuentes, F., Parra, C., Quitral, V., Jimenez, P., & Garcia-Diaz, D. F. (2015). Chilean Native Fruit Extracts Inhibit Inflammation Linked to the Pathogenic Interaction Between Adipocytes and Macrophages. *Journal of Medicinal Food*, 18(5), 601-608. PMC. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0031>
- Righi da Rosa, J., Nunes, G. L., Motta, M. H., Fortes, J. P., Cezimbra Weis, G. C., Rychecki Hecktheuer, L. H., Muller, E. I., Ragagnin de Menezes, C., & Severo da Rosa, C. (2019). Microencapsulation of anthocyanin compounds extracted from blueberry (*Vaccinium* spp.) by spray drying: Characterization, stability and simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 89, 742-748. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.042>
- Robert, P., & Fredes, C. (2015). The Encapsulation of Anthocyanins from Berry-Type Fruits. Trends in Foods. *Molecules*, 20(4), 5875-5888. <https://doi.org/10.3390/molecules20045875>
- Rocha-Parra, D., Chirife, J., Zamora, C., & de Pascual-Teresa, S. (2018). Chemical Characterization of an Encapsulated Red Wine Powder and Its Effects on Neuronal Cells. *Molecules*, 23(4), 842. <https://doi.org/10.3390/molecules23040842>
- Rodoni, L. M., Feuring, V., Zaro, M. J., Sozzi, G. O., Vicente, A. R., & Arena, M. E. (2014). Ethylene responses and quality of antioxidant-rich stored barberry fruit (*Berberis microphylla*). *Scientia Horticulturae*, 179, 233-238.
- Rodríguez, R., Rojas, G., & Rodríguez, S. (2016). Encapsulation of probiotics for Food Applications. *Biosalud*, 15(2), 106-115. <https://doi.org/10.17151/biosa.2016.15.2.10>
- Romero Román, M., Noriega Vásquez, F., Farías Villagra, M., Belchi, L., Jara Zapata, P., & Vera Flores, B. (2019). *Nuevas fuentes de antioxidantes naturales: Caracterización de compuestos bioactivos en cinco frutos nativos de Chile*.
- Romero-Román, M. E., Schoebitz, M., Bastías, R. M., Fernández, P. S., García-Viguera, C., & López-Belchi, M. D. (2021). Native Species Facing Climate Changes: Response of Calafate Berries to Low Temperature and UV Radiation. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/foods10010196>
- RStudio Team. (2015). RStudio: Integrated development for R. *RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com>*, 42, 14.

- RStudio Team (2020). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>. (s. f.).
- Ruiz, A., Bustamante, L., Vergara, C., von Baer, D., Hermosín-Gutiérrez, I., Obando, L., & Mardones, C. (2015). Hydroxycinnamic acids and flavonols in native edible berries of South Patagonia. *Food Chemistry*, *167*, 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.052>
- Ruiz, A., Hermosín-Gutiérrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., Dorau, C., Winterhalter, P., & von Baer, D. (2010). Polyphenols and Antioxidant Activity of Calafate (*Berberis microphylla*) Fruits and Other Native Berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(10), 6081-6089. <https://doi.org/10.1021/jf100173x>
- Ruiz, A., Hermosín-Gutiérrez, I., Vergara, C., von Baer, D., Zapata, M., Hitschfeld, A., Obando, L., & Mardones, C. (2013). Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Research International*, *51*(2), 706-713. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.043>
- Saavedra, J., Pino, M. T., Zamora, O., Ojeda, A., Leod, C. M., & Aguila, K. (2017). *Análisis de diversidad genética del calafate en Magallanes*. 69, 4.
- Sáez-Orellana, F., Godoy, P. A., Bastidas, C. Y., Silva-Grecchi, T., Guzmán, L., Aguayo, L. G., & Fuentealba, J. (2016). ATP leakage induces P2XR activation and contributes to acute synaptic excitotoxicity induced by soluble oligomers of  $\beta$ -amyloid peptide in hippocampal neurons. *Neuropharmacology*, *100*, 116-123. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.04.005>
- Sáez-Orellana, Francisco, Fuentes-Fuentes, M. C., Godoy, P. A., Silva-Grecchi, T., Panes, J. D., Guzmán, L., Yévenes, G. E., Gavilán, J., Egan, T. M., Aguayo, L. G., & Fuentealba, J. (2018). P2X receptor overexpression induced by soluble oligomers of amyloid beta peptide potentiates synaptic failure and neuronal dyshomeostasis in cellular models of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, *128*, 366-378. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.027>
- Saifullah, M., Shishir, M. R. I., Ferdowsi, R., Tanver Rahman, M. R., & Van Vuong, Q. (2019). Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. *Trends in Food Science and Technology*, *86*, 230-251. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.030>
- Salar, F. J., Agulló, V., García-Viguera, C., & Domínguez-Perles, R. (2020). Stevia vs. Sucrose: Influence on the Phytochemical Content of a Citrus—Maqui Beverage—A Shelf Life Study. *Foods*, *9*(2), 219.

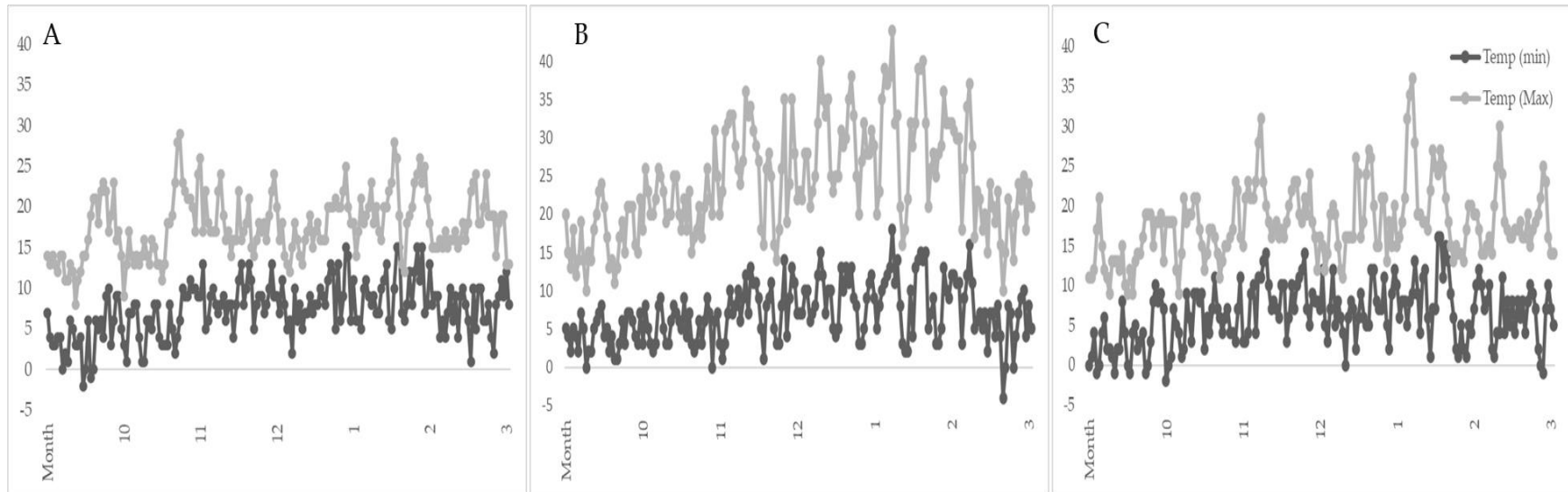
- Salehi, B., Selamoglu, Z., Sener, B., Kilic, M., Kumar Jugran, A., de Tommasi, N., Sinisgalli, C., Milella, L., Rajkovic, J., & Morais-Braga, F. B. (2019). Berberis Plants—Drifting from Farm to Food Applications, Phytotherapy, and Phytopharmacology. *Foods*, 8(10), 522.
- Salinas, S., Gómez, N., Riquelme Espergue, F., Acuña Aroca, B., & Díaz, V. (2019). *Manual de productos forestales no madereros (PFNM). Proyecto manejo sustentable de la tierra comuna de Coyhaique*.
- Sarkar, D., & Shetty, K. (2014). Metabolic stimulation of plant phenolics for food preservation and health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 395-413. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092418>
- Schmeda-Hirschmann, G., Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., & Ladio, A. (2019). Patagonian berries as native food and medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 241, 111979. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111979>
- Schoebitz, M., López, M. D., & Roldán, A. (2013). Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review. *Agronomy for sustainable development*, 33(4), 751-765.
- Silva, F. (2013). *Flora agropecuaria de Aysén. Servicio de Agricultura y Ganadería*. Museo Nacional de Historia Natural.
- Simirgiotis, M. J., Bórquez, J., & Schmeda-Hirschmann, G. (2013). Antioxidant capacity, polyphenolic content and tandem HPLC–DAD–ESI/MS profiling of phenolic compounds from the South American berries *Luma apiculata* and *L. chequén*. *Food Chemistry*, 139(1), 289-299. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.089>
- Sociedad de Geriatria y Gerontología de Chile, E. por. (2016, marzo 22). *Consejos para una buena nutrición en el adulto mayor – Sociedad de Geriatria y Gerontología de Chile*. <http://www.socgeriatria.cl/site/?p=367>
- Sólyom, K., Solá, R., Cocero, M. J., & Mato, R. B. (2014). Thermal degradation of grape marc polyphenols. *Food Chemistry*, 159(Supplement C), 361-366. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.021>
- Stich, E. (2016). 1 - Food Color and Coloring Food: Quality, Differentiation and Regulatory Requirements in the European Union and the United States. En R. Carle & R. M. Schweiggert (Eds.), *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages* (pp. 3-27). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100371-8.00001-4>
- Suárez-Medina, K., & Coy-Barrera, E. (2016). Diversidad de los Compuestos Orgánicos Bioactivos de Origen Natural: Una Singularidad Manifestada

- por la Plasticidad en el Metabolismo Secundario. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 11(2), 154-169. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2031>
- Szajdek, A., & Borowska, E. J. (2008). Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(4), 147-156. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0097-5>
- Thibado, S. P., Thornthwaite, J. T., Ballard, T. K., & Goodman, B. T. (2018). Anticancer effects of Bilberry anthocyanins compared with NutraNanoSphere encapsulated Bilberry anthocyanins. *Molecular and Clinical Oncology*, 8(2), 330-335. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1520>
- Tkacz, K., Wojdyło, A., Turkiewicz, I. P., Ferreres, F., Moreno, D. A., & Nowicka, P. (2020). UPLC-PDA-Q/TOF-MS profiling of phenolic and carotenoid compounds and their influence on anticholinergic potential for AChE and BuChE inhibition and on-line antioxidant activity of selected *Hippophaë rhamnoides* L. cultivars. *Food Chemistry*, 309, 125766. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125766>
- Tsuda, T. (2016). Recent progress in anti-obesity and anti-diabetes effect of berries. *Antioxidants*, 5(2), 13.
- Türkyılmaz, M., Hamzaoğlu, F., & Özkan, M. (2019). Effects of sucrose and copigment sources on the major anthocyanins isolated from sour cherries. *Food Chemistry*, 281, 242-250. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.089>
- Varas Springmüller, B. (2012). *Caracterización de la diversidad genética en poblaciones chilenas de calafate (Berberis microphylla G. Forst)* [Thesis, Universidad Andrés Bello]. <http://repositorio.unab.cl/xmlui/handle/ria/3862>
- Vergara, C., Pino, M. T., Zamora, O., Parada, J., Pérez, R., Uribe, M., & Kalazich, J. (2020). Microencapsulation of Anthocyanin Extracted from Purple Flesh Cultivated Potatoes by Spray Drying and Its Effects on *In vitro* Gastrointestinal Digestion. *Molecules*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030722>
- Wickham, H. (2011). Ggplot2. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 3(2), 180-185.
- Wightman, J. D., & Heuberger, R. A. (2015). Effect of grape and other berries on cardiovascular health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(8), 1584-1597.
- World Health Organization. (2014). *Global status report on noncommunicable diseases 2014*. <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>

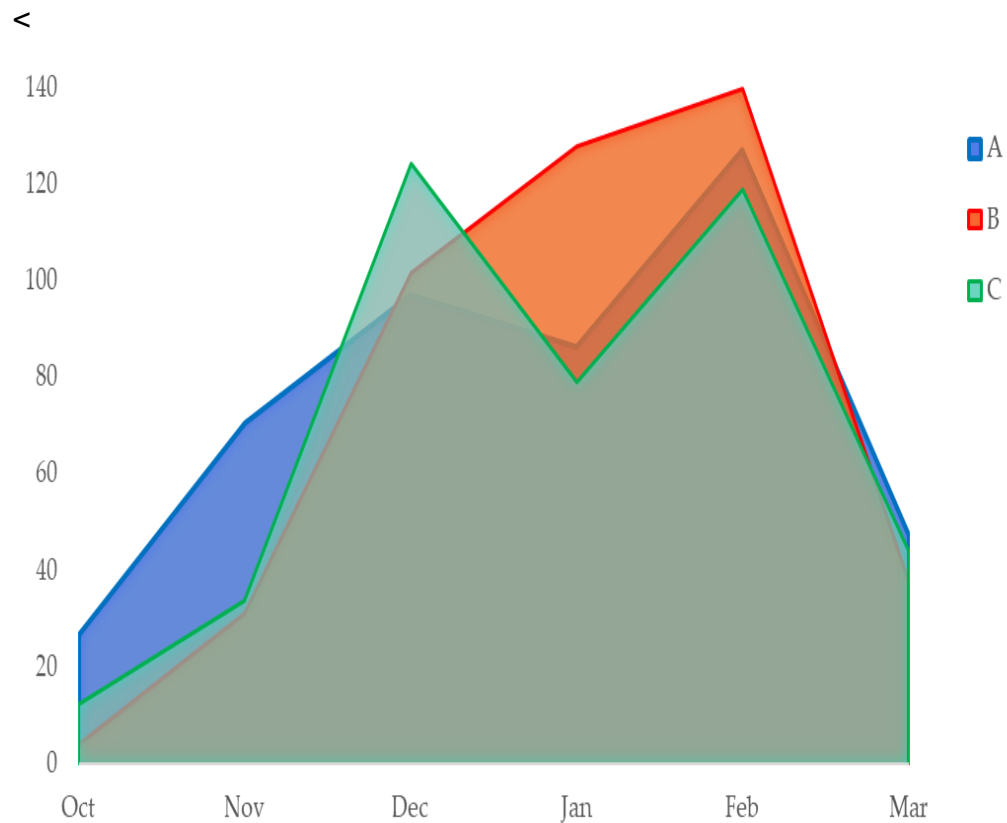
- Yan, X., Yan, J., Pan, S., & Yuan, F. (2020). Changes of the Aroma Composition and Other Quality Traits of Blueberry 'Garden Blue'during the Cold Storage and Subsequent Shelf Life. *Foods*, 9(9), 1223.
- Yang, H., Tian, T., Wu, D., Guo, D., & Lu, J. (2018). Prevention and treatment effects of edible berries for three deadly diseases: Cardiovascular disease, cancer and diabetes. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-10.
- Yang, L., Ling, W., Du, Z., Chen, Y., Li, D., Deng, S., Liu, Z., & Yang, L. (2017). Effects of Anthocyanins on Cardiometabolic Health: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 8(5), 684-693. <https://doi.org/10.3945/an.116.014852>
- Yang, X., Luo, E., Liu, X., Han, B., Yu, X., & Peng, X. (2016). Delphinidin-3-glucoside suppresses breast carcinogenesis by inactivating the Akt/HOTAIR signaling pathway. *BMC Cancer*, 16, 423. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2465-0>
- Yu, X., Li, Y., & Mu, X. (2020). Effect of Quercetin on PC12 Alzheimer's Disease Cell Model Induced by A $\beta$ 25-35 and Its Mechanism Based on Sirtuin1/Nrf2/HO-1 Pathway. *BioMed Research International*, 2020, e8210578. <https://doi.org/10.1155/2020/8210578>



## VII. Suplementarios

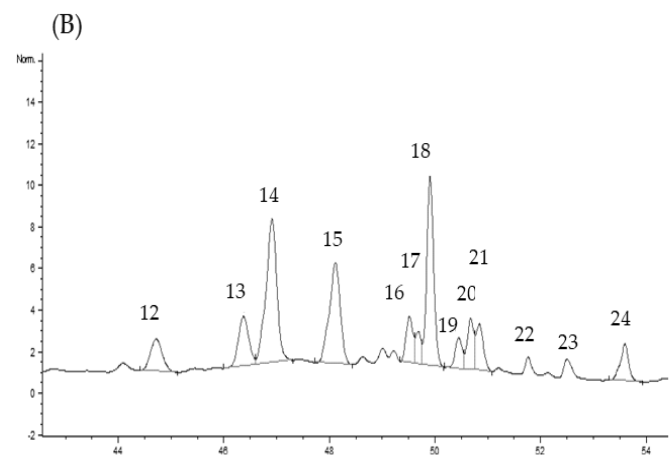
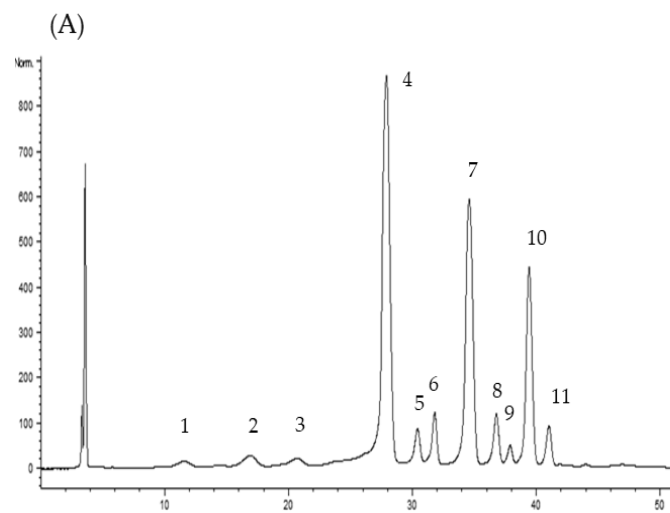


**Supplementary 1.** Temperature (maximum and minimum) registered day to day in Coyhaique, Aysen region during three consecutive periods of time A. 2016-2017 B. 2017-2018 and C. 2018-2019.



Month/Year	A	B	C
Oct	26,7	4	12,4
Nov	70,4	31,1	33,9
Dec	96,9	101,6	124,3
Jan	86,3	127,8	78,9
Feb	127	139,7	118,9
Mar	47,3	37,8	44,2
$\Sigma$	<b>454,6</b>	<b>442</b>	<b>412,6</b>

**Supplementary 2.** Degree days base 10 registered in Coyhaique, Aysen región during three consecutive periods of time **A** 2016-2017 **B.** 2017-2018 and **C** 2018-2019



(C)

Peak	Main phenolic compounds	Retention time	M+ or M-	Ion	MSn	$\lambda$ (nm)
1	Delphinidin 3,5 -dihexoside	11,58	627	+	303	278,524
2	Petunidin 3,5 -dihexoside	16,8	640	+	317	278,524
3	Malvidin 3,5 -dihexoside	20,6	654	+	331	280,522
4	Delphinidin 3-glucoside	27,8	464	+	303	278,524
5	delphinidin 3-rutinoside	30,3	611	+	303	280,525
6	Cyanidin 3-glucoside	31,7	448	+	287	280,516
7	Petunidin 3-glucoside	34,5	478	+	317	276,522
8	Petunidin 3-rutinoside	36,7	624	+	317	278,514
9	Peonidin 3-glucoside	37,8	462	+	301	278,514
10	Malvidin 3-glucoside	39,3	492	+	331	274,526
11	Malvidin 3-rutinoside	40,9	639	+	331	278,521
12	myricetin-3-rutinoside-7-glucoside	27,3	789/787	-	625,317	289/356
13	myricetin-3-glucoside	30,1	481/479	-	319/317	298/355
14	myricetin-3-rutinoside	34	627/625	-	481/319	296/356
15	Quercetin-3-rutinoside	36,8	609/610	-	301	298,350
16	Quercetin-3-glucoside	39,8	463/464	-	301	296,352
17	quercetin-3-galactoside	40,5	515	-	353,191	300,324
18	Quercetin-hexoside-derivative	44,7	506	-	463,301	300,352
19	Quercetin-3-O-rhamnoside	46,3	447	-	301	284,352
20	Isorhamnetin-3-O-hexoside	46,9	477	-	315	264,350
21	Isorhamnetin-3-O-hexoside-derivative	48,1	623	-	315	266,354
22	Isorhamnetin-3-O-hexoside	49,5	477	-	315	268,350
23	Isorhamnetin-3-O-hexoside-derivative	60,4	519/520	-	477,315	294,352
24	Isorhamnetin-3-O-hexoside-derivative	63,5	519/520	-	477,315	264,352

**Supplementary 3.** Calafate anthocyanins identified by chromatography. A. HPLC chromatogram detected at 520 nm for the individual anthocyanin quantification. (B). . HPLC chromatogram detected at 360 nm (C). Identification of main polyphenolic compounds by HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>.