



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

DESARROLLO DE UN PROTOTIPO EXPERIMENTAL PARA OBTENER INGREDIENTES SALUDABLES ESTANDARIZADOS DE MAQUI, A BAJO COSTO, SIN SOLVENTES NI DEGRADACIÓN, PARA LA INDUSTRIA GLOBAL DE ALIMENTOS SALUDABLES

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA MENCIÓN QUÍMICA

DANTON IGOR FREIRE FLORES

PROFESOR GUÍA:
ÁLVARO OLIVERA NAPPA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
JUAN ASENJO DE LEUZE

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

SANTIAGO DE CHILE
2020

RESUMEN

Producto de los altos índices de obesidad y mala nutrición en el mundo, y las consecuencias que estas provocan a la salud, es que se están implementando diversos programas para concientizar sobre la importancia de llevar una buena alimentación. En el último tiempo se ha desarrollado una amplia oferta de alimentos saludables por los distintos beneficios que estos ofrecen, dentro de los cuales existen los alimentos funcionales, a los cuales se les ha incrementado o incorporado un componente cuyo consumo representa un beneficio para la salud, y los nutraceuticos, los cuales no se tratan de alimentos propiamente tales, sino de componentes particulares de estos.

El maqui es un fruto que crece de forma silvestre en la región sur de Chile, y que ha sido reconocido por su alto contenido en antocianinas y flavonoides, en comparación a otros frutos de similares características como lo son el arándano, la frambuesa, el açai, etc. Las antocianinas poseen una alta capacidad antioxidante, y su beneficio para la salud se ha demostrado a partir de múltiples estudios en diversas enfermedades.

Maqui New Life S.A. es una empresa chilena, dedicada al rubro de los ingredientes funcionales. Su principal producto es el Delphinol ®, un nutraceutico elaborado en base a las antocianinas y flavonoides extraídos del fruto del maqui. Actualmente el proceso de producción posee un gran número de ineficiencias: Perdidas del 30% en el producto final, costos de producción muy altos y el uso de solventes orgánicos son algunos ejemplos.

En el presente trabajo se buscó desarrollar un nuevo proceso productivo, a escala de prototipo, con el fin de paliar todas estas ineficiencias. Se plantea utilizar un tratamiento enzimático en primera instancia, seguido de fermentaciones para eliminar azúcares, filtraciones secuenciales para separar y obtener estas moléculas de interés y un secado mediante liofilización.

Como resultado se obtuvo el diseño de un nuevo proceso productivo, que mantiene las características del producto original, y un set de ecuaciones que determinan tanto el tamaño de los equipos como el costo de inversión y de operación de la planta, en función de los requerimientos de producción fijados.

DEDICATORIA

Al pueblo chileno, que no se rinde.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, gracias por estar siempre al lado mío, brindándome su amor y apoyo incondicional, lo son todo para mí.

Al equipo Maqui New Life: Profe Álvaro, gracias por la oportunidad brindada de hacerme participe de este proyecto, en el que aprendí muchas cosas nuevas y me desarrolle en lo que me gusta hacer, gracias también por ser un apoyo constante a lo largo de este proceso y a la buena onda que emana, lo considero un ejemplo como profesor. A la Maripa, una extraordinaria profesional y persona, gracias de igual forma por hacerme participe de este proyecto, ha sido un verdadero agrado trabajar contigo, siempre preocupada de que nos faltara nada y apoyándonos cuando lo necesitamos, ojalá volver a encontrarnos en un futuro. Al Alonso, compañero de hace ya largo tiempo jaja, un excelente compañero de equipo, nos coordinamos y entendemos muy bien, también un placer trabajar contigo, estoy seguro que a futuro serás un gran profesional y te seguirá yendo muy bien.

A los K del Cebib: Nyna, Maca, Men, Vicky, Lucho, Anite, Karencite, JP, Sebas, Alonso, etc. Y a los que ya no están, pero igual siempre se les recuerda: Leo, Marce, Gabo, Naty, Jabi, etc. Gracias por hacer del CeBiB un tan grato ambiente para venir a trabajar todos los días. Mención especial al mejor equipo de todos, EEEEE. GOLI, representación ilustre del Jogo Bonito y del "Si no salgo por las noches no hago goles" jajaja, no hay nada más lindo que jugar a la pelota con tus amigos y este es un claro ejemplo.

Al romántico viajero. Por ser una inspiración y un estilo de vida para mí.

Al pueblo chileno. Por confirmarme que un mundo mejor es posible, que unidos podemos lograr lo que nos propongamos y que el ser siempre será más importante que el tener.

Tabla de Contenido

| | |
|---|-----|
| RESUMEN | i |
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| INDICE DE TABLAS | vi |
| INDICE DE ILUSTRACIONES | vii |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 Contexto..... | 1 |
| 1.2 El maqui (<i>Aristotelia chilensis</i>) como fuente de ingredientes funcionales..... | 4 |
| 1.3 El mercado de ingredientes funcionales a nivel mundial..... | 8 |
| 1.4 Maqui New Life S.A. (MNL S.A.) | 10 |
| 1.5 Nuevo proceso de producción. | 14 |
| 2. Objetivos | 18 |
| 2.1 General | 18 |
| 2.2 Específicos..... | 18 |
| 3. Metodología | 19 |
| 3.1 Obtención de la fruta..... | 19 |
| 3.2 Pruebas de estabilización y conservación de antocianinas..... | 19 |
| 3.3 Tratamiento enzimático para liberación de antocianinas. | 22 |
| 3.4 Fermentación con levaduras, para eliminar azúcares que afectan la solubilidad del producto final..... | 23 |
| 3.5 Filtraciones Secuenciales..... | 25 |
| 3.6 Proceso Completo..... | 27 |
| 3.7 Modificaciones al proceso lineal..... | 29 |
| 3.8 Reciclos..... | 30 |
| 3.9 Diseño de la configuración del proceso en función de la composición final del extracto de maqui requerida, dimensionamiento de equipos y análisis económico de planta de producción. | 31 |
| 4. Resultados y Discusiones | 32 |
| 4.1 Pruebas de estabilización y conservación de antocianinas..... | 32 |
| 4.2 Tratamiento enzimático para liberación de antocianinas..... | 34 |

| | | |
|-----|--|----|
| 4.3 | Fermentación con levaduras, para eliminar azúcares que afectan la solubilidad del producto final..... | 37 |
| 4.4 | Filtraciones Secuenciales..... | 46 |
| 4.5 | Proceso completo..... | 57 |
| 4.6 | Modificaciones al proceso lineal..... | 59 |
| 4.7 | Reciclos..... | 62 |
| 4.8 | Diseño de la configuración del proceso en función de la composición final del extracto de maqui requerida..... | 66 |
| 4.9 | Dimensionamiento de equipos y análisis económico de planta de producción. 68 | |
| 5. | Conclusiones y Recomendaciones | 74 |
| 5.1 | Tratamiento enzimático para liberación de antocianinas. | 74 |
| 5.2 | Fermentaciones | 74 |
| 5.3 | Filtraciones Secuenciales..... | 75 |
| 5.4 | Proceso completo, modificaciones al proceso lineal y reciclós..... | 76 |
| 5.5 | Diseño del proceso, dimensionamiento de equipos y balance económico de planta de producción. | 77 |
| 6. | Anexos | 78 |
| 6.1 | Curva de crecimiento de levadura EC1118 | 78 |
| 6.2 | Balance de masa del proceso | 79 |
| 6.3 | Listado de equipos y costos..... | 80 |
| 6.4 | Flujo de caja del proyecto | 81 |
| 7. | Bibliografía..... | 82 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Mercado Global: Crecimiento, tendencias y pronostico (En millones de USD) (Mordor-Intelligence, 2016). | 8 |
| Tabla 2. Proyección del mercado global de ingredientes funcionales (en millones de USD) (Mordor-Intelligence, 2016)..... | 8 |
| Tabla 3. Comparación entre los índices de MNL y las principales industrias en el sector de los ingredientes funcionales. Los valores no informados se estima que estén dentro del mismo rango que el resto de las empresas. | 13 |
| Tabla 4. Cuadro comparativo entre las distintas soluciones ofrecidas por MNL S.A. y dos empresas del rubro. | 17 |
| Tabla 5. Gradiente de fases móviles para medición de antocianinas en HPLC. | 21 |
| Tabla 6. Diseño experimental de las primeras fermentaciones. | 23 |
| Tabla 7. Diseño experimental de las segundas fermentaciones. | 24 |
| Tabla 8. Diseño experimental para la tercera tanda de fermentaciones. ... | 24 |
| Tabla 9. Membranas disponibles para el sistema de filtración secuencial y su correspondiente presión máxima de operación. | 25 |
| Tabla 10. Parámetros de fermentación para proceso completo. | 28 |
| Tabla 11. Simbología | 46 |
| Tabla 12. Grado de rechazo por membrana para antocianinas totales. | 47 |
| Tabla 13. Tamaña en Dalton de las antocianinas presentes en el maqui. .. | 49 |
| Tabla 14. Grado de rechazo por membrana para cada antocianina. | 50 |
| Tabla 15. Comparación del perfil de antocianinas del maqui, del extracto obtenido en el CeBiB y del extracto obtenido por MNL. | 51 |
| Tabla 16. Grado de rechazo por membrana para la Glucosa y Fructosa. ... | 51 |
| Tabla 17. Resumen de los resultados obtenidos en el proceso completo. .. | 57 |
| Tabla 18. Resultados de liofilización..... | 58 |
| Tabla 19. Resultados obtenidos con las modificaciones realizadas al proceso completo. | 59 |
| Tabla 20. Resultados de liofilizaciones en el proceso modificado..... | 61 |
| Tabla 21. Resultados obtenidos de las filtraciones secuenciales del jugo inicial. | 62 |
| Tabla 22. Resultados obtenidos de las filtraciones secuenciales del jugo producido a partir de los concentrados rechazados en cada etapa del proceso anterior..... | 63 |
| Tabla 23. Liofilizaciones de las cuatro fracciones correspondientes a nanofiltración y OR para las filtraciones realizadas con el jugo inicial..... | 64 |

| | |
|--|----|
| Tabla 24. Liofilizaciones de las cuatro fracciones correspondientes a nanofiltración y OR para las filtraciones realizadas con el jugo de reciclo. .. | 64 |
| Tabla 25. Especificaciones sobre de mano de obra de producción. | 72 |
| Tabla 26. Especificaciones sobre mano de obra de administración. | 72 |

INDICE DE ILUSTRACIONES

| | |
|---|----|
| Figura 1. Porcentaje de Obesidad en adultos en distintos países y por sexo (OECD, 2017). | 1 |
| Figura 2. Prevalencia de Obesidad en adultos según edad y sexo 2010 (%) (Atalah, 2012). | 2 |
| Figura 3. Zona en donde crece la planta del maqui en Chile (INTA, 2010), además de la tabla nutricional de esta baya..... | 4 |
| Figura 4. Comparación de la capacidad antioxidante del maqui con otros frutos similares (EEUU, 2010). | 5 |
| Figura 5. Estructura química del ion flavilio, formando en este caso una sal con el anión cloruro. | 6 |
| Figura 6. Estructura química de las principales antocianidinas (Burton-Freeman, 2016). | 6 |
| Figura 7. Delfinidinas y Cianidinas presentes en el maqui. | 7 |
| Figura 8. Diagrama de Flujo del actual proceso utilizado por MNL S.A. para la producción del extracto de Maqui (Delphinol). | 12 |
| Figura 9. Composición en peso del Delphinol® producido por MNL utilizando el proceso de extracción con etanol y posterior secado con calor. | 13 |
| Figura 10. Diagrama de flujo del tentativo nuevo proceso para la producción de extracto de maqui. | 15 |
| Figura 11. Set experimental para la medición de actividad de β -glucosidasa en el maqui. A la derecha placas magnéticas para agitación de jugo de maqui y tratamiento con shock de calor. A la izquierda sistema de filtración de jugo de maqui para posterior análisis por HPLC. | 20 |
| Figura 12. (Izquierda) Mezcla de jugo de maqui con mix enzimático (Derecha) Filtración de jugo de maqui para posterior medición de antocianinas disueltas. | 23 |
| Figura 13. (A) Equipo de filtración de frente, (B) Equipo de filtración por atrás, (C) Bomba y equipo de enfriamiento, (D) Membrana de Osmosis Reversa. | 26 |
| Figura 14. Set experimental para los experimentos de filtraciones secuenciales. | 26 |
| Figura 15. Diagrama del proceso completo..... | 27 |

| | |
|--|----|
| Figura 16. Proceso de filtración propuesto para la obtención de un producto con un contenido de antocianinas del 35% en peso..... | 67 |
| Figura 17. Diagrama de bloques y balance de masa del proceso. | 69 |

| | |
|---|----|
| Gráfico 1. Concentración de antocianinas totales vs tiempo para cada condición de temperatura estudiada..... | 32 |
| Gráfico 2. OD a 520 [nm] de las muestras de maqui tratadas con EDTA, ácido ascórbico, con mezcla EDTA y Ácido Ascórbico más el control..... | 33 |
| Gráfico 3. Comparación en la concentración de antocianinas para las muestras tratadas con EDTA y ácido ascórbico en los tiempos inicial y final (24 horas). | 33 |
| Gráfico 4. Variación en la concentración de antocianinas para mix CP y solución de maqui en agua. | 34 |
| Gráfico 5. Variación en la concentración de antocianinas para mix CP y solución de maqui en buffer citrato. | 35 |
| Gráfico 6. Variación en la concentración de antocianinas para mix RS y solución de maqui en agua. | 35 |
| Gráfico 7. Variación en la concentración de antocianinas para mix RS y solución de maqui en buffer citrato. | 36 |
| Gráfico 8. Concentración de antocianinas para fermentaciones con cepas C6 y EC1118, inoculadas al 0,2% en las fermentaciones y crecidas en medio YPD y jugo de maqui a 28°C y 250rpm. | 37 |
| Gráfico 9. Antocianinas totales vs tiempo para fermentación con EC, C6 al 0,4% y control. | 38 |
| Gráfico 10. Antocianinas totales vs tiempo para las 3 condiciones señaladas. | 39 |
| Gráfico 11. Azúcares totales (Glucosa y Fructosa) vs tiempo para fermentaciones a 20°C, en ausencia de oxígeno y en las condiciones señaladas: Control, con 0.4% de inóculo de levadura C6 y EC1118..... | 40 |
| Gráfico 12. Azúcares totales (Glucosa y Fructosa) vs tiempo para fermentaciones a 20°C, en presencia de oxígeno y en las condiciones señaladas: Control, con 0.4% de inóculo de levadura C6 y EC1118..... | 40 |
| Gráfico 13. Azúcares totales (Glucosa y Fructosa) vs tiempo para fermentaciones a 28°C, en presencia de oxígeno y en las condiciones señaladas: Control, con 0.4% de inóculo de levadura C6 y EC1118..... | 41 |
| Gráfico 14. Azúcares totales (glucosa y fructosa) vs tiempo para fermentación con 10% de inóculo de levadura EC1118. El gráfico superior corresponde al control, el intermedio al tratamiento con calor y al inferior al tratamiento con EDTA 20 [mM] y ácido ascórbico 0,5%. | 43 |

| | |
|--|----|
| Gráfico 15. Medición de OD a 520 nm para medir antocianinas totales en muestras de fermentación con 10% de inóculo de levadura EC1118. El gráfico superior corresponde al control, el intermedio al tratamiento con calor y al inferior al tratamiento con EDTA 20 [mM] y ácido ascórbico 0,5%. | 44 |
| Gráfico 16. Fracción de antocianinas con respecto al total inicial presente en cada etapa de las filtraciones secuenciales..... | 48 |
| Gráfico 17. Velocidad de filtrado para las etapas de microfiltración, 5 kDa, ultrafiltración y nanofiltración..... | 52 |
| Gráfico 18. Concentración de antocianinas en el concentrado (izquierda) y en el volumen generado cada 10 segundos de permeado (derecha) a medida que transcurre la microfiltración. | 53 |
| Gráfico 19. Concentración de antocianinas en el concentrado (izquierda) y en el volumen generado cada 10 segundos de permeado (derecha) a medida que transcurre la filtración con 5 kDa. | 53 |
| Gráfico 20. Concentración de antocianinas en el concentrado (izquierda) y en el volumen generado cada 10 segundos de permeado (derecha) a medida que transcurre la ultrafiltración. | 54 |
| Gráfico 21. Concentración de antocianinas en el concentrado (izquierda) y en el volumen generado cada 10 segundos de permeado (derecha) a medida que transcurre la nanofiltración. | 54 |
| Gráfico 22. Concentración de Glucosa (Azul) y Fructosa (Naranja) en los distintos tiempos tomados cada 10 segundos en el concentrado (izquierda) y permeado (derecha) para la etapa de microfiltración..... | 55 |
| Gráfico 23. Concentración de Glucosa (Azul) y Fructosa (Naranja) en los distintos tiempos tomados cada 10 segundos en el concentrado (izquierda) y permeado (derecha) para la membrana de 5 kDa. | 55 |
| Gráfico 24. Concentración de Glucosa (Azul) y Fructosa (Naranja) en los distintos tiempos tomados cada 10 segundos en el concentrado (izquierda) y permeado (derecha) para la etapa de ultrafiltración..... | 56 |
| Gráfico 25. Concentración de Glucosa (Azul) y Fructosa (Naranja) en los distintos tiempos tomados cada 10 segundos en el concentrado (izquierda) y permeado (derecha) para la etapa de nanofiltración. | 56 |
| Gráfico 26. Distribución de costos de equipo para proceso con etapa de secado por liofilización. | 70 |
| Gráfico 27. Distribución de costos de equipo para proceso con etapa de secado por liofilización. | 71 |
| Gráfico 28. Curva de crecimiento de levadura EC1118 en medio YPD con fructosa a 28°C y 200 rpm. | 78 |

1. Introducción

1.1 Contexto

En la OCDE, que reúne a los países más ricos del mundo, el 20% de la población adulta tiene sobrepeso o son obesos producto de una mal nutrición.

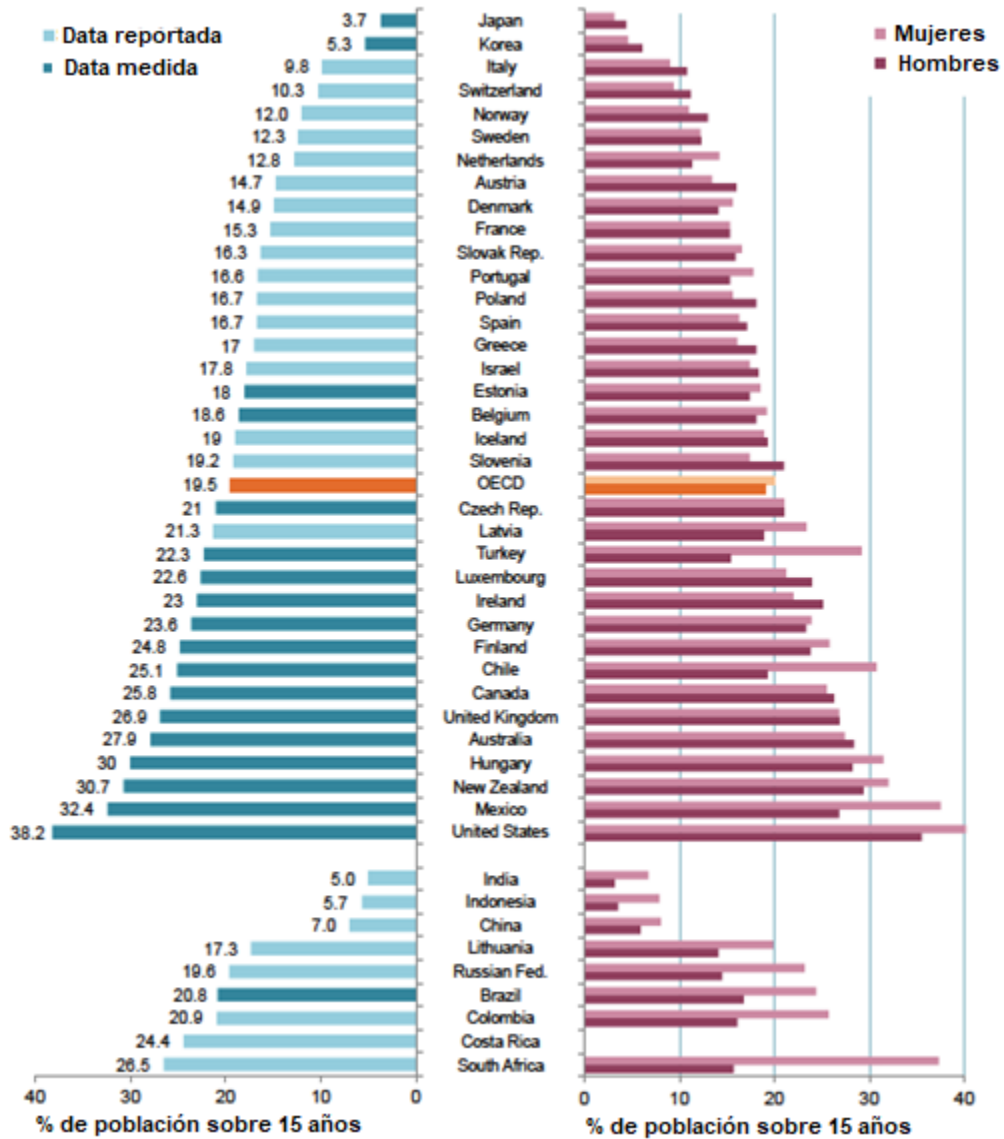


Figura 1. Porcentaje de Obesidad en adultos en distintos países y por sexo (OECD, 2017).

Si bien la obesidad no se considera una enfermedad por sí misma, existen varias patologías crónicas que se derivan de ella, tales como resistencia a la insulina, diabetes, colesterol elevado e hipertensión, las que son consideradas factores de riesgo o detonantes de enfermedades cardiovasculares, que representan la principal causa de muerte a nivel mundial (OMS, 2016). Los principales factores de riesgo comportamentales para las enfermedades cardiovasculares corresponden al consumo nocivo de alcohol, la inactividad física, el sobrepeso, la obesidad y el consumo elevado de sal, todos, parte del hábito de una mal nutrición (Socarras M., 2010).

En particular, en nuestro país existe un problema creciente de obesidad, sedentarismo y mal nutrición en la población. Factores como la falta de meriendas saludables, ayunos de largas horas, alto consumo de comidas rápidas y el sedentarismo, son los que principalmente han permitido este fenómeno (Mizon C., 2004). Según la Encuesta Nacional de Salud del 2010 existe un 25% de obesidad en la población adulta chilena (Atalah, 2012).

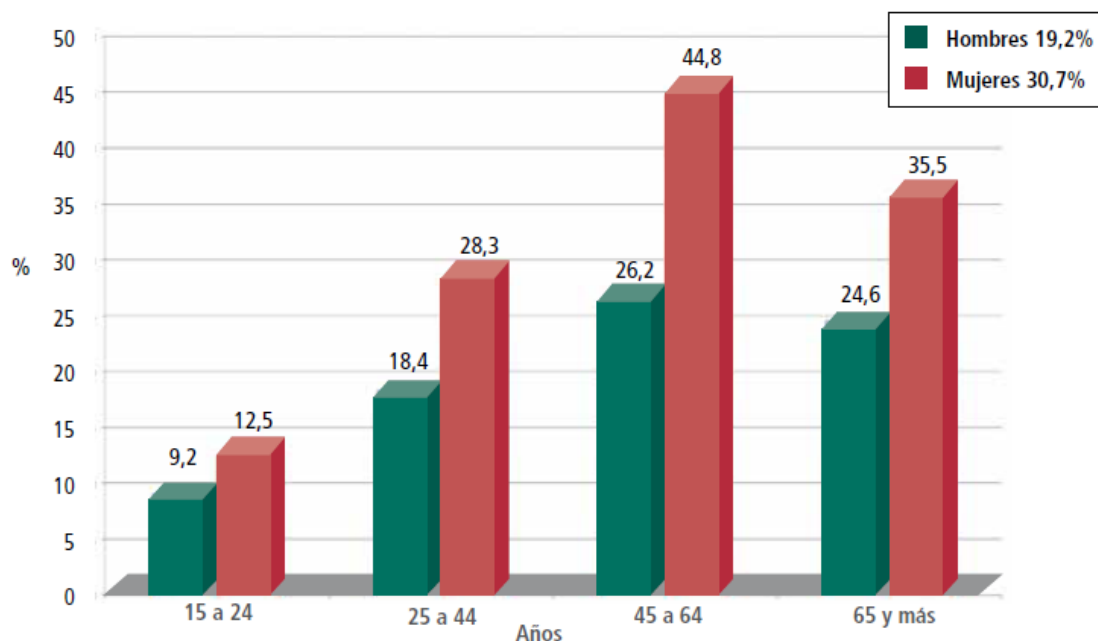


Figura 2. Prevalencia de Obesidad en adultos según edad y sexo 2010 (%) (Atalah, 2012).

La principal consecuencia de una mal nutrición es la aparición de desórdenes metabólicos, generando distintos tipos de enfermedades, principalmente cardiovasculares y diabetes tipo 2 (Aida, 2015). La OMS define la mal nutrición como la mayor amenaza individual a la salud pública mundial (FAO, 2017).

Para ayudar a paliar estos altos índices de obesidad en el mundo, y en particular en Chile, es que se han planteado e implementado diversas políticas sociales, enfocadas principalmente en programas de concientización sobre la importancia de comer sano y hacer una actividad física constante, como también de señalar los alimentos que pueden generar daños a la salud debido a su consumo prolongado, a través de etiquetas con sellos negros o mediante el aumento al impuesto específico de algunos de estos, como a las bebidas alcohólicas, por ejemplo.

En el ámbito de comer de forma saludable es que se ha desarrollado una creciente oferta de alimentos saludables. Estos alimentos saludables son elaborados por los diversos beneficios que proveen:

- (1) Por su alto aporte nutricional,
- (2) Por ayudar a mantener el bienestar y la salud de quien los consume,
- (3) Por su ayuda en la regulación metabólica,
- (4) Porque ayudan a reducir el riesgo de contraer enfermedades,
- (5) O Simplemente porque no poseen elementos que sobrecargan el organismo como los alimentos libres de lactosa o gluten, por ejemplo.

Y dentro de los cuales se encuentran los llamados alimentos funcionales, alimentos a los cuales se les ha incrementado o incorporado un componente cuyo consumo representa un beneficio para la salud establecido, sin que el producto deje de ser un alimento, y los nutraceuticos, los cuales son un concepto más complejo, ya que no se tratan de alimentos como propiamente tales, sino de componentes de estos, que se pueden consumir en mayores concentraciones que las habituales y que también reportan beneficios para la salud. Los nutraceuticos no deben ser confundidos como medicamentos, ya que no se les atribuyen propiedades terapéuticas específicas, pero sí potencialmente preventivas.

Dentro de esta amplia gama de alimentos, en Chile, en particular, el maqui se presenta como una fuente atractiva de ingredientes funcionales, ya que presenta un alto contenido de antocianinas con altos niveles antioxidantes (DPPH de 28,18 (Genskowsky, 2016)), y ha probado tener efectos cardioprotectores y antidiabéticos (Rojo, 2012).

1.2 El maqui (*Aristotelia chilensis*) como fuente de ingredientes funcionales.

El maqui es una especie nativa chilena que produce pequeñas bayas, las que son recolectadas en forma silvestre en el sur de Chile.

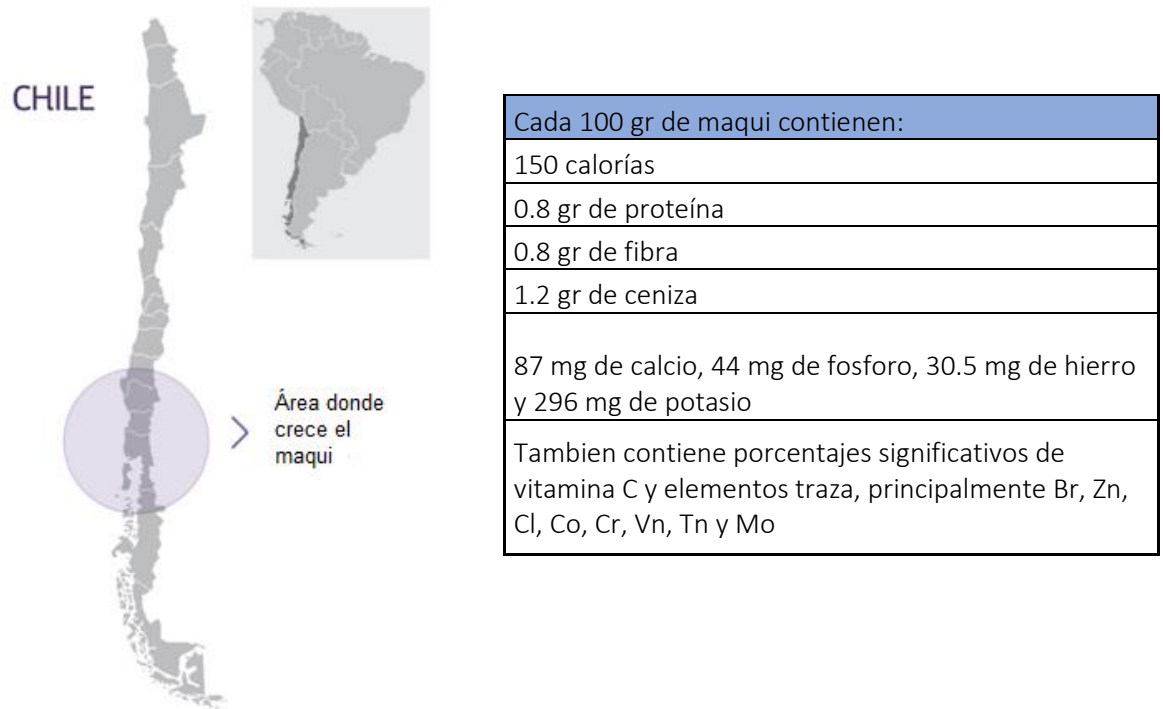


Figura 3. Zona en donde crece la planta del maqui en Chile (INTA, 2010), además de la tabla nutricional de esta baya.

Ha sido reconocido por sus múltiples beneficios a la salud, atribuidos a su alto contenido de polifenoles, y a su amplia variedad de antocianinas y flavonoides (Fredes, 2012). Se ha demostrado que el maqui es rico en compuestos fenólicos (Girones-Vilaplana, 2014) con una alta capacidad antioxidante en comparación con otros berries también de alto poder antioxidante, como es el açai o el arándano.

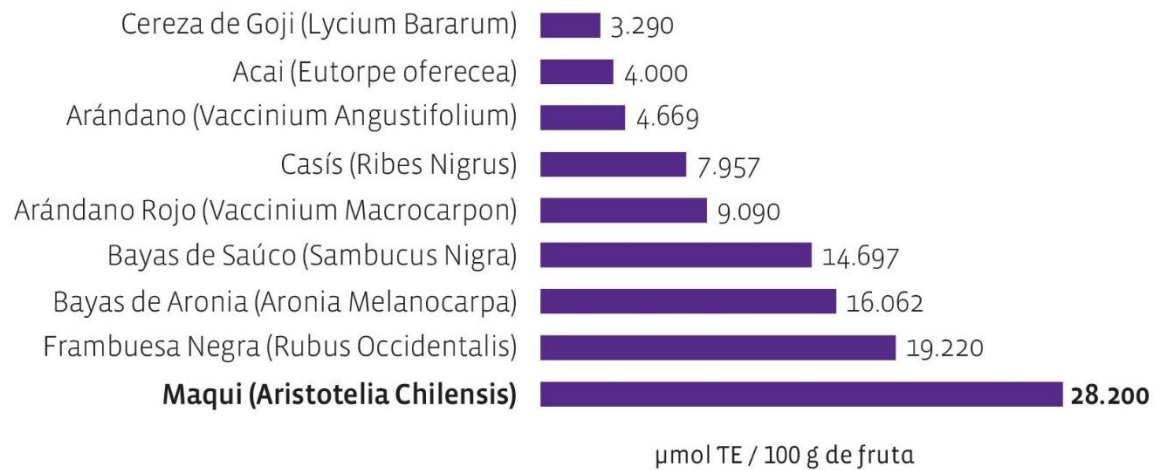


Figura 4. Comparación de la capacidad antioxidante del maqui con otros frutos similares (EEUU, 2010).

Asimismo, hay evidencia científica sobre las propiedades antiinflamatorias, antiespasmódicas, astringentes y analgésicas conferidas por sus principios activos (alcaloides y taninos) (Muñoz O, 2004). Se ha observado que productos derivados de maqui en condiciones adecuadas de formulaciones alimenticias, tienen efectos positivos sobre la resistencia a la insulina, mejorando el control glicémico de las personas que lo consumen. Del mismo modo, ejerce un efecto en la disminución del colesterol total y el colesterol LDL, mientras que sube los niveles de HDL. También hemos demostrado efectos benéficos sobre los fenómenos de estrés oxidativo e inflamación, lo que lo posiciona muy bien en el mercado de ingredientes saludables de origen natural (Jara, 2012).

Dentro de las biomoléculas que le confieren sus propiedades a este fruto son de especial importancia las antocianinas, moléculas polifenólicas subcategoría de los flavonoides y que están formadas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, unida a una azúcar (generalmente glucosa) por medio de un enlace glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio y un anillo fenólico; el flavilio normalmente funciona como un catión.

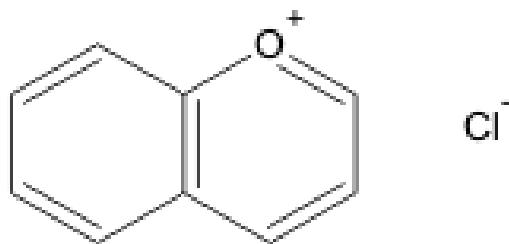
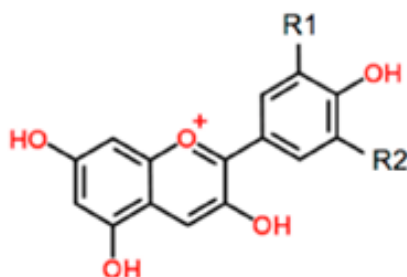


Figura 5. Estructura química del ion flavilio, formando en este caso una sal con el anión cloruro.

De todas las antocianidinas que actualmente se conocen (aproximadamente 19), las más importantes son la pelargonidina, la delfinidina, la cianidina, la petunidina, la peonidina y la malvidina.



| Nombre | R1 | R2 |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|
| Pelargonidina | <i>-H</i> | <i>-H</i> |
| Cianidina | <i>-OH</i> | <i>-H</i> |
| Peonidina | <i>-OCH₃</i> | <i>-H</i> |
| Delfinidina | <i>-OH</i> | <i>-OH</i> |
| Petunidina | <i>-OCH₃</i> | <i>-OH</i> |
| Malvidina | <i>-OCH₃</i> | <i>-OCH₃</i> |

Figura 6. Estructura química de las principales antocianidinas (Burton-Freeman, 2016).

La baya de maqui tiene el mayor contenido de Delfinidinas de todas las bayas conocidas, además cuenta también con una cantidad importante de Cianidinas (Genskowsky, 2016).

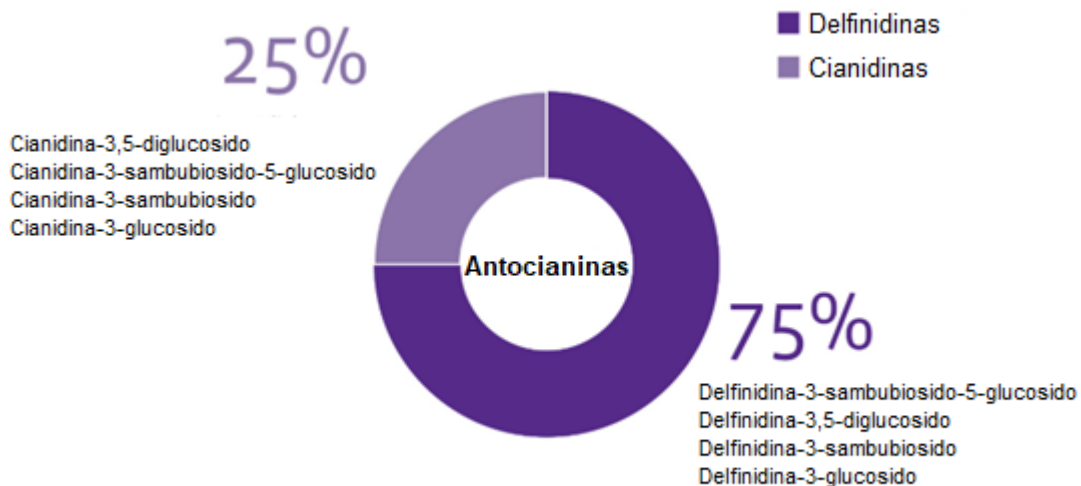


Figura 7. Delfinidinas y Cianidinas presentes en el maqui.

La alta actividad antioxidante de las antocianinas se debe a su capacidad para eliminar los radicales libres al donar un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo, así como para soportar un electrón no apareado. Los radicales generados en estas reacciones se estabilizan mediante resonancia y/o enlaces de hidrógeno intramoleculares (Burton-Freeman, 2016).

La evidencia de los beneficios para la salud humana relacionados con el consumo de antocianinas en la dieta se ha presentado a partir de múltiples experimentos en diversas enfermedades. Los primeros informes sugirieron que las propiedades antioxidantes de estos compuestos eran responsables de sus efectos promotores de la salud; sin embargo, ahora se aprecia que las antocianinas funcionan mucho más allá de sus propiedades antioxidantes y probablemente influyen en una variedad de vías de señalización celular y expresión génica (Burton-Freeman, 2016).

Por ejemplo, se ha demostrado que la ingesta de antocianinas en la dieta está inversamente asociada con eventos cardiovasculares, incluyendo infarto de miocardio y muerte por enfermedad coronaria y enfermedad cardiovascular en modelos multivariados (Cassidy, 2013). Estos resultados pueden explicarse en parte por la reducción del factor de riesgo: Se ha informado que la ingesta de antocianinas en la dieta se asocia significativamente inversamente con la hipertensión (Jennings, 2014), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Wedick, 2012),

resistencia a la insulina y marcadores de inflamación / proteína C reactiva (Jennings, 2014). La evidencia de ensayos clínicos aleatorizados (ECA) muestra que las fuentes dietéticas de antocianinas, incluidas las fresas y los arándanos, mejoran los perfiles de lípidos aterogénicos, como la disminución del colesterol total y LDL, el aumento del colesterol HDL y la mejora de los patrones de tamaño de las partículas de lipoproteína (Novotny, 2015). También se han informado mejoras en los factores emergentes de riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV) y diabetes con los suplementos de bayas y antocianinas, incluida la inflamación (Joseph, 2014), el control glucémico y la sensibilidad a la insulina mejorada (Li, 2015).

1.3 El mercado de ingredientes funcionales a nivel mundial.

Actualmente existen múltiples industrias en el mundo interesadas en la extracción de estos ingredientes funcionales para su posterior venta, ya sea en el mercado de alimentos funcionales o de nutracéuticos. Según un estudio realizado por Grand View Research en 2016 el mercado mundial de estos ingredientes se valoró en alrededor de USD \$205.390 millones y se espera que alcance alrededor de USD \$294.790 millones en 2022 (Tabla 1 y Tabla 2), impulsado por países con alta población geriátrica como EEUU, Japón y Europa Occidental (Mordor-Intelligence, 2016).

Tabla 1. Mercado Global: Crecimiento, tendencias y pronóstico (En millones de USD) (Mordor-Intelligence, 2016).

| Año | 2016 | 2017 | 2018 | 2020 | 2022 |
|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Suplementos alimenticios | 71887 | 76416 | 81230 | 91465 | 103177 |
| Alimentos funcionales | 67778 | 72049 | 76588 | 86238 | 97281 |
| Bebestibles funcionales | 65725 | 69865 | 74267 | 83625 | 94332 |
| Total | 205390 | 218330 | 232085 | 261328 | 294790 |

Tabla 2. Proyección del mercado global de ingredientes funcionales (en millones de USD) (Mordor-Intelligence, 2016).

| MERCADO | 2016 | 2017 | 2018 | 2020 | 2022 |
|------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Vitaminas y Minerales | 94479 | 100432 | 106759 | 120211 | 135603 |
| Probióticos y Fibra | 43132 | 45849 | 48738 | 54879 | 61906 |

| | | | | | |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| Omega 3, proteínas y péptidos | 34916 | 37116 | 39454 | 44426 | 50114 |
| Otros (fitoquímicos principalmente) | 32863 | 35023 | 37134 | 41812 | 47167 |
| Total | 205390 | 218330 | 232085 | 261328 | 294790 |

Este mercado está liderado principalmente por los llamados productos "Blockbuster", los cuales corresponden a aquellos que tienen características que los hacen destacar y que van apareciendo en la medida que son descubiertos o desarrollados por empresas del mercado. Especial atractivo en este sector tiene el mercado de los "Superfruits", los cuales tienen mayores beneficios nutricionales en comparación a otras frutas. Los superfruits poseen ingredientes funcionales que en estos días están asociados a productos con cualidades antienviejimiento, beneficiosos para la salud, y muy demandados por las personas de edad avanzada y con mayor poder adquisitivo. El principio bioactivo más conocido de los superfruits es su capacidad antioxidante.

Dentro de los países con mayor participación económica en este mercado se encuentran EEUU, Japón, Corea del Sur y Alemania principalmente. El aumento del consumo de ingredientes funcionales está impulsando el mercado estadounidense, que se espera alcance los USD \$96 mil millones en 2022 (Mordor-Intelligence, 2016), con lo que dominaría el mercado para ese entonces. Esto es seguido por Asia-Pacífico, donde el 47% de la población japonesa consume estos productos. Además, el principal mercado de productos para la vista corresponde al japonés con un tamaño de USD \$822 millones, donde el 45% es liderado por nutraceuticos a base de arándano (Crawford & Mellentin, 2008).

1.4 Maqui New Life S.A. (MNL S.A.)

En este contexto aparece Maqui New Life S.A. (MNL S.A.), una compañía chilena creada en diciembre del 2010 y radicada en la ciudad de Santiago, basada en la iniciativa de un grupo de emprendedores y científicos en proveer soluciones naturales estandarizadas obtenidas a partir del fruto del maqui y orientadas al mercado nutraceutico y de alimentos funcionales utilizando biotecnologías de extracción.

MNL S.A. apunta principalmente al mercado de los antioxidantes, un subconjunto del mercado de los nutraceutico y de alimentos funcionales, y más específicamente a tres perfiles de empresas que ofrecen productos naturales para la prevención de patologías:

- El primer grupo se enfoca en la población que sufre de síndrome metabólico (hipercolesterolemia, hiperglicemia, etc.) que solamente en EEUU corresponden a 120 millones de personas (34% de la población al año 2012 (Moore, 2017)).
- El segundo atiende a aquellos que consumen productos para problemas de la vista (como degeneración macular, sequedad de ojos, cansancio de la vista, retinopatía diabética, entre otras), con 13 millones de personas mayores de 40 años en EEUU (National Eye Institute, US), y en Japón, el principal mercado en Asia, a 8 millones de personas (Department of Ophthalmology at Keio University School of Medicine, Tokyo).
- El tercer mercado de interés corresponde a productos ofrecidos a personas que suplementan su sistema inmunológico como método de prevención o recuperación de enfermedades. En este caso a una población de 48 millones de personas mayores de 65 años en EEUU.

Aprovechando los altos índices nutricionales, los múltiples efectos regulatorios que genera en el metabolismo y la alta capacidad antioxidante (ORAC) que posee el fruto del maqui en comparación con otros berries similares más ampliamente utilizados en la industria (Figura 4), además de que este crece de forma silvestre en la zona sur de nuestro país, Maqui New Life S.A. pretende generar un producto innovador que sea altamente competitivo para ingresar en estos mercados.

Actualmente MNL S.A. produce este producto bajo el nombre de Delphinol® exclusivamente para la industria nutraceutica, ya que al momento de querer ingresar al mercado de alimentos funcionales se presentan problemas debido al alto costo de producción de este producto. Para la industria de alimentos

funcionales es esencial contar con ingredientes de buena calidad y cuyo rango de precio sea bajo para obtener un producto competitivo, en comparación con la industria nutracéutica que usualmente compra y utiliza extractos de frutos o plantas cuyo precio no es una limitante. Un producto desarrollado con el actual extracto de maqui de MNL tendría un costo para el consumidor final tan alto que estaría fuera de línea y no sería posible comercializarlo. Aunque el maqui actualmente es reconocido por su alto nivel antioxidante, y su posicionamiento en términos de mercado es relevante, éste ha tenido una baja penetración en este mercado por estos motivos. Por lo tanto, es necesario para MNL implementar un nuevo proceso para la obtención de ingredientes saludables que no presenten degradación, obteniendo un producto de una alta pureza y actividad biológica, y que necesariamente presente un menor costo de producción para ser competitivos en la industria alimentaria.

En la mayoría de las industrias de este rubro la obtención de extractos desde frutos o plantas se realiza utilizando solventes orgánicos, principalmente alcoholes (Naczek, 2006). Estos procesos son costosos debido a un alto requerimiento de insumos, a la alta pureza de los solventes utilizados y a su alta selectividad de extracción. Además, se requiere de un proceso posterior de secado por calor para eliminar dichos solventes. Este proceso provoca altas pérdidas de moléculas con efecto biológico, llegando hasta casi el 30% del contenido total de antocianinas y flavonoides.

En la Figura 8 se presenta un diagrama del actual proceso utilizado por Maqui New Life S.A. para la obtención del Delphinol®.

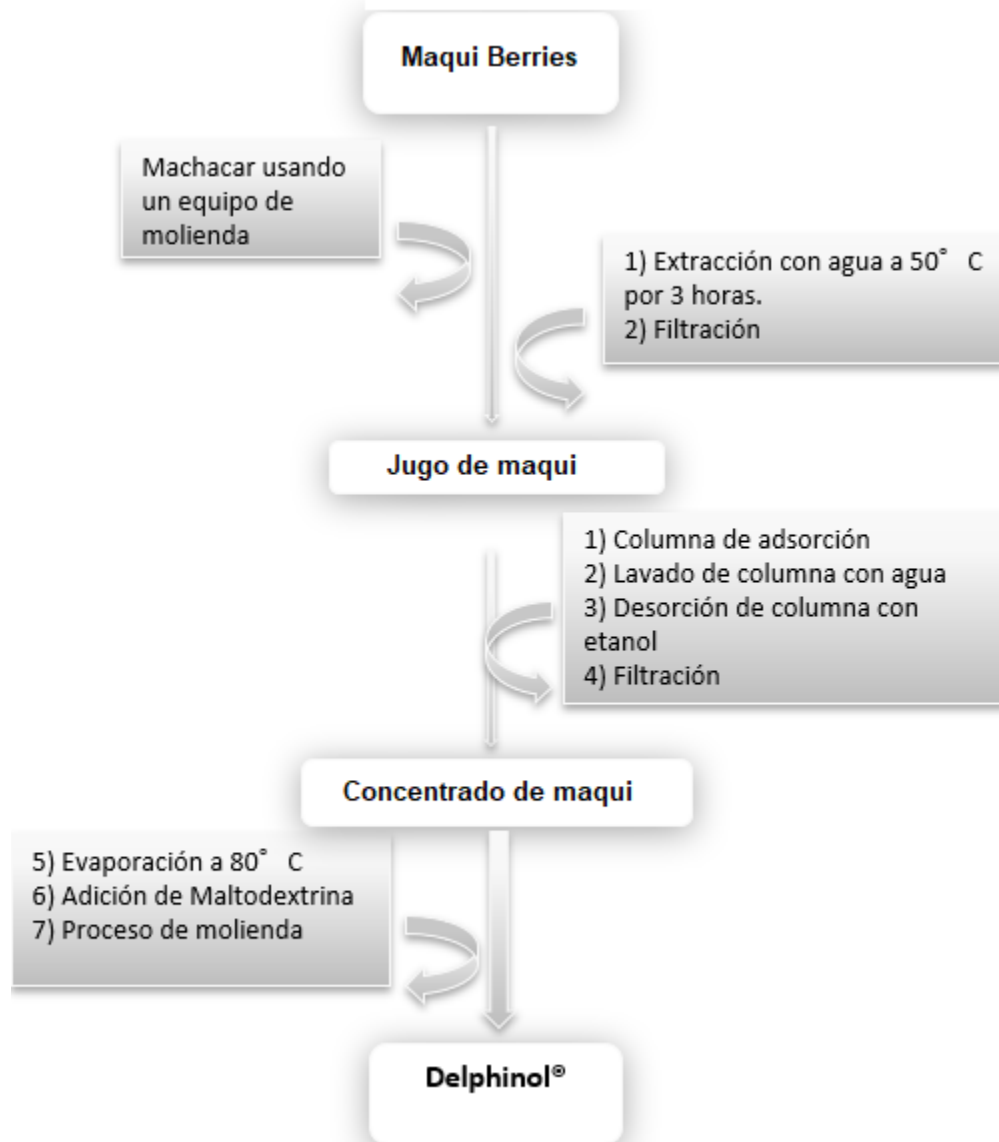


Figura 8. Diagrama de Flujo del actual proceso utilizado por MNL S.A. para la producción del extracto de Maqui (Delphinol).

A pesar de algunas modificaciones particulares que se le puedan hacer, este es el proceso mayormente utilizado por las empresas de este rubro, y en general metanol o etanol son utilizados como solventes para la extracción.

Otro problema lo constituye el hecho de que los solventes utilizados durante el proceso de producción impiden la entrada de estos productos a mercados de medio oriente, debido a que poseen regulaciones más estrictas, y, además, son considerados como compuestos no deseados en mercados como el coreano, canadiense, japonés y en algunos países de Europa, perdiéndose así potenciales clientes.

En la Figura 9 se presenta la composición en peso del Delphinol® producido con este proceso.

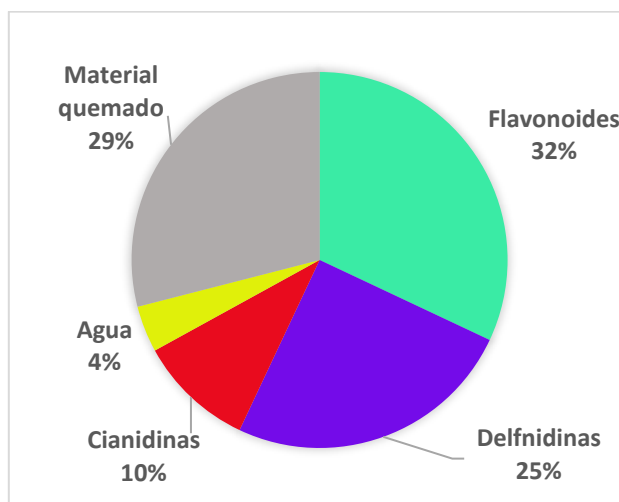


Figura 9. Composición en peso del Delphinol® producido por MNL utilizando el proceso de extracción con etanol y posterior secado con calor.

Actualmente el costo de producción del Delphinol® es de USD \$700-750 por cada kilo de extracto obtenido. El contenido de productos degradados y los costos de producción señalados también son transversales en la industria, ya que es el método de extracción por solvente el más utilizado para obtener compuestos antioxidantes a partir de biomasa vegetal. En la Tabla 3 se presenta un cuadro comparativo en distintas industrias sobre estos índices.

Tabla 3. Comparación entre los índices de MNL y las principales industrias en el sector de los ingredientes funcionales. Los valores no informados se estima que estén dentro del mismo rango que el resto de las empresas.

| Empresa | Costo de Producción de extracto [USD/kg] | % de pérdidas en el proceso | % de participación en el mercado global |
|---------------------|---|------------------------------------|--|
| Indena | 700 | 30 | 10% |
| Anklam | 650 | 30 | 16% |
| Naturex | No informado | No informado | 39% |
| Chauser Food | No informado | No informado | 23% |
| MNL S.A. | 700-750 | 29 | <5% |

Por lo tanto, es necesario para MNL implementar un nuevo proceso para la obtención de ingredientes saludables que no presenten degradación, obteniendo un producto de una alta pureza y actividad biológica, y que necesariamente presente un menor costo de producción para ser competitivos en la industria alimentaria.

1.5 Nuevo proceso de producción.

En este contexto se propone un nuevo proceso basado primeramente en la degradación enzimática de macromoléculas para disminuir la viscosidad del concentrado de maqui, lo que permitirá clarificar la mezcla, liberar los ingredientes saludables y una mayor eficiencia en el proceso de filtración por membranas. La hidrólisis enzimática permite disminuir la viscosidad debido a que su actividad catalítica consiste en romper enlaces de polímeros grandes, a su vez existe un grado de influencia en la ruptura de la pared celular de células que hayan quedado completas, rompiendo su estructura y liberando pigmentos al exterior. Posteriormente el concentrado será sometido a un proceso de fermentación para eliminar azúcares que interfieren tanto en la solubilidad como en la pureza del producto final y a un proceso de filtración secuencial, para permitir la purificación y concentración de los ingredientes activos en base a su tamaño molecular. Para lograr esto, se evaluarán las condiciones de operación para microfiltración en primer lugar, que consideran comprobar los parámetros óptimos como tipo de membrana, velocidad de flujo tangencial, presión y ciclos de operación normal. El objetivo de esta etapa es eliminar material particulado para obtener una solución clarificada libre de impurezas y moléculas no deseadas en el producto final. Por otro lado, la ultrafiltración, tiene parámetros de operación muy similares, pero con el objetivo de eliminar macromoléculas y polímeros orgánicos de gran tamaño integrando y estandarizando el proceso en su conjunto. Así, continúa la nanofiltración que tiene el objetivo de obtener factores de separación para los compuestos de interés y moléculas no deseadas para distintas condiciones y membranas. Finalmente, una etapa de osmosis reversa para eliminar agua, iones y alcoholes.

En la Figura 10 se presenta el diagrama de flujo del tentativo nuevo proceso.

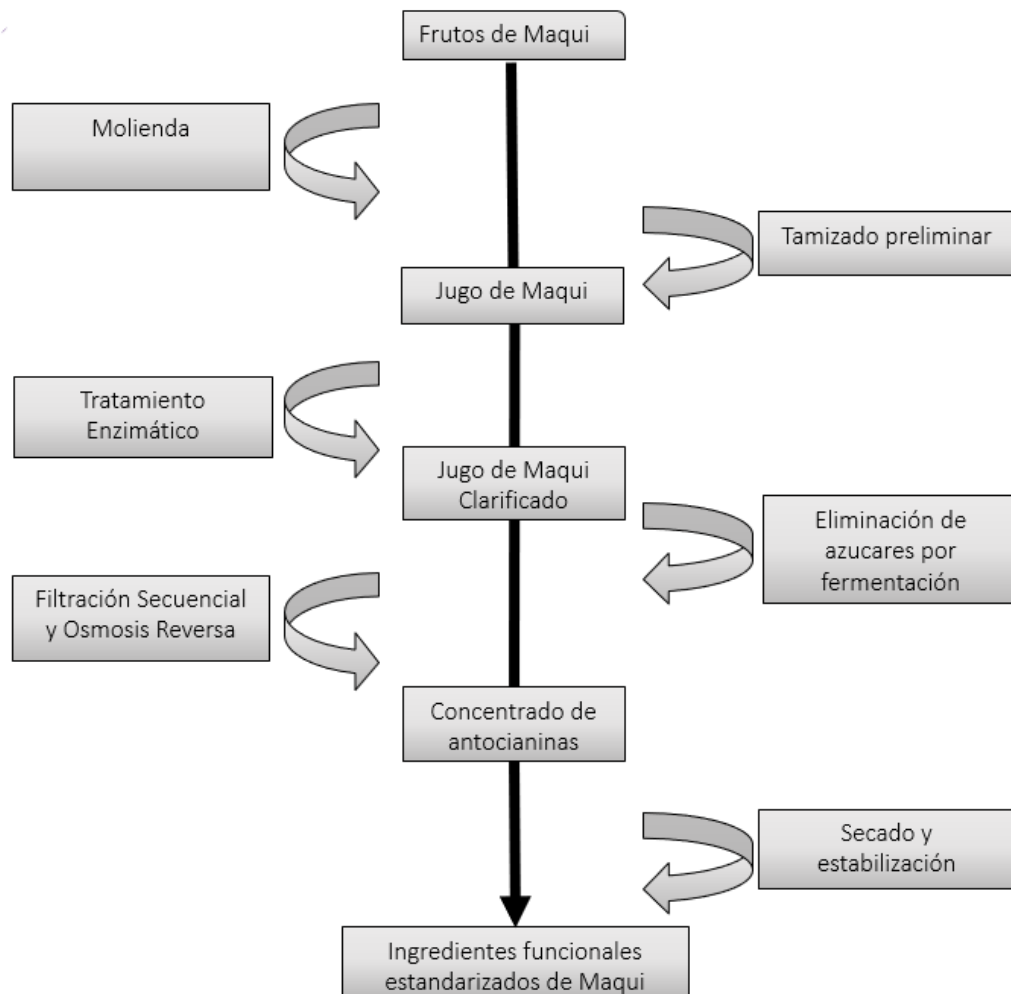


Figura 10. Diagrama de flujo del tentativo nuevo proceso para la producción de extracto de maqui.

Más específicamente el proceso diseñado consiste en las siguientes etapas:

- I. Mezcla de maqui con agua y generación de pulpa por molienda.
- II. Filtración con papel o tela para eliminación de cáscaras, semillas y residuos de fruta.
- III. Tratamiento enzimático, con pectinasas, celulasas y xilanasas, para disminuir la viscosidad y permitir la liberación de pigmentos.
- IV. Eliminación de azúcares a través de la fermentación con levaduras.
- V. Filtración secuencial para purificar la solución clarificada. El objetivo es eliminar desde restos de fruta hasta macromoléculas y elementos no deseados, reduciendo la pérdida de pigmentos. Para esto está contemplado utilizar membranas de 1- 5 - 10 y 30 kDa y de 0,1 a 0,45 y 1,2 micrones.
- VI. Osmosis inversa para eliminación de agua y iones.
- VII. Secado y estabilización del ingrediente saludable de maqui mediante liofilización.

Las principales ventajas que se esperan obtener con este nuevo proceso son:

- Disminución en un 60% de los costos de producción. Esta proyección se basa fundamentalmente en la eliminación del etanol y la resina de las columnas de intercambio iónico del proceso actual, además de la eliminación de los costos de transporte, ya que con el presente proyecto se espera que la producción pueda ser llevada a cabo en Chile, en lugar de enviar la materia prima hasta Alemania para producirla allí, como ocurre actualmente. Con esta reducción se espera que el costo de producción por kilogramo de producto oscile entre los 200-300 USD.
- No requiere de solventes orgánicos y la purificación se realiza a través del uso de membranas, lo que permitirá la entrada del producto a mercados de mayor valor agregado. Además, la disminución en los costos de producción permitirá que el producto entre también en el mercado de alimentos funcionales, en el cual un bajo rango de precios es esencial para que el producto pueda ser competitivo.
- Reducción de la degradación y pérdida de compuestos de interés en el proceso de un 29% a un 5%, debido a que no se aplica temperatura.
- Un mejor rendimiento en cuanto a la relación de kg de producto obtenido/kg de materia prima necesaria. Con el actual proceso se requieren 40 kg de fruto de maqui para producir 1 kg de extracto.
- Obtención de un producto de igual composición (35% antocianinas) y mejor solubilidad que el producto actual, debido a que no presenta azúcares (eliminados durante el proceso de fermentación).

Finalmente se presenta un cuadro comparativo que muestra las ventajas comerciales del nuevo producto por sobre sus competidores en el mercado.

Tabla 4. Cuadro comparativo entre las distintas soluciones ofrecidas por MNL S.A. y dos empresas del rubro.

| Atributos | Solución propuesta | Soluciones Competencia | |
|-----------------------------------|--|---|---|
| | | Sol 1 (Indena) | Sol 2 (Anklam) |
| Composición (pureza) | 8 antocianinas, otros flavonoides, vitaminas, proteínas oligosacáridos propios del Maqui (Pureza: 80%) | 8 antocianinas, otros flavonoides. Productos de adición de flavonoides (Pureza 60%) | 8 antocianinas, otros flavonoides. Productos de adición de flavonoides (Pureza 60%) |
| Contenido de productos degradados | Menos del 5% | 30% | 30% |
| Uso de solventes orgánicos | NO | SI (Etanol) | SI (Etanol) |
| Costo de producción (US\$/Kg) | 350 USD/ Kg | 700 USD /kg | 650 USD/Kg |
| Certificación Orgánica | Sí | NO | NO |
| Penetración en mercado alimentos | Sí | NO | NO |
| Categoría de producto | Ingrediente Saludable orgánico (libre de solventes) | Suplemento Alimenticio (Extracto) | Suplemento Alimenticio (Extracto) |

A la fecha MNL S.A. vende 1000 kg de producto al año en mercados de EEUU, Japón e Italia. Con el nuevo proceso se espera que esta cifra llega a los 4000 kg por año en el año 2021, lo que equivaldría a una facturación de USD 2,8 millones anuales. Mientras que para el 2022 se esperan vender 5000 kg anuales, equivalentes a USD 3,5 millones.

2. Objetivos

2.1 General

El **objetivo general** del presente trabajo de título consiste en desarrollar un prototipo experimental para obtener un ingrediente saludable de maqui rico en antocianinas y flavonoides estandarizado, altamente soluble y puro, mediante el desarrollo de un proceso de ingeniería secuencial de eliminación de macromoléculas, purificación y concentración.

2.2 Específicos

- a) Establecer una metodología para aumentar la estabilidad de antocianinas en el jugo de maqui, con el fin de disminuir la tasa de degradación de estas bajo las condiciones de operación presentes a lo largo del nuevo proceso.
- b) Disminuir la viscosidad del jugo prensado de maqui y aumentar la disponibilidad de antocianinas en solución utilizando un tratamiento enzimático.
- c) Eliminar los azúcares presentes en el jugo mediante fermentación para mejorar la solubilidad del producto final.
- d) Purificar las antocianinas presentes en el jugo de maqui mediante un sistema de filtración secuencial, estableciendo la configuración de membranas que maximice esta recuperación, y posterior estabilización mediante liofilización para obtener un producto íntegro y de alta pureza.
- e) Establecer el diseño óptimo del nuevo proceso en función de la composición final del producto solicitada por Maqui New Life S.A.
- f) Determinar dimensionamiento de equipos y análisis económico del proceso, en función de los requerimientos de producción solicitados por Maqui New Life S.A.

3. Metodología

3.1 Obtención de la fruta.

Se gestionó el traslado de dos envíos de maqui congelado (30 kg cada envío) desde la bodega de MNL hacia las instalaciones del CeBiB. El primer envío es de fruta cuyo contenido en peso de antocianinas es de 0,7%, mientras que el segundo envío contiene 1,4%. Esta fruta se mantiene en stock en un freezer a -20°C.

3.2 Pruebas de estabilización y conservación de antocianinas.

Para la estabilización y conservación de antocianinas en el jugo de maqui, se evaluaron dos estrategias. La primera, consiste en la inactivación de la enzima β -glucosidasa nativa del fruto a través de un tratamiento con temperatura, ya que esta enzima rompe el enlace existente entre la antocianidina y las moléculas de azúcar que la conforman, provocando la pérdida de sus propiedades. Como segunda estrategia, se estudia el efecto estabilizante de dos agentes, EDTA y ácido ascórbico, en la solución de maqui. El EDTA es un agente quelante capaz de formar complejos con diversos iones metálicos que actúan como cofactores de enzimas polifenol oxidasas, cuya activación provoca la oxidación de los polifenoles presentes en la fruta, causando la pérdida de sus propiedades antioxidantes. Por otra parte, el ácido ascórbico, actúa como agente protector frente a las moléculas oxígeno presentes en el aire, evitando así la oxidación de polifenoles por causas ambientales.

Se prepara jugo de maqui utilizando como proporción 30 gr de maqui por cada 75 ml de agua destilada, y se tritura en una juguera. Esta proporción se utiliza de forma fija para todos los experimentos aquí descritos. Para la inactivación de β -glucosidasa nativas se preparan 3 muestras de jugo y se filtran para eliminar el mosto, a cada solución filtrada se le aplica un tratamiento con calor distinto, con el fin de denaturar la enzima. Se testea un tratamiento a 85°C durante 2 minutos y un tratamiento a 70°C por 4 minutos con el propósito de determinar bajo qué condición se logra la inactivación con una menor pérdida de antocianinas por calor. Posterior al tratamiento, las muestras se dejan a temperatura ambiente (21°C).

Se analizan por HPLC las muestras para determinar concentración de antocianinas previa a la aplicación de calor y posterior, a las 1, 3, 11, 22 y 52

horas, con el propósito de definir las condiciones en que se logra la inactivación de β -glucosidasa, con una menor pérdida de antocianinas.

El set experimental utilizado se muestra en la **Figura 11**, mientras que los parámetros de medición de antocianinas por HPLC, para todos los experimentos aquí detallados, se presentan a continuación.



Figura 11. Set experimental para la medición de actividad de β -glucosidasa en el maqui. A la derecha placas magnéticas para agitación de jugo de maqui y tratamiento con shock de calor. A la izquierda sistema de filtración de jugo de maqui para posterior análisis por HPLC.

▪ **Condiciones experimentales HPLC.**

Se utiliza equipo HPLC Shimadzu LC20A con columna de fase reversa Onyx® C18 monolítica de 4,6x100 mm y equipo de medición por longitud de onda. Se sigue el protocolo de medición de antocianinas en HPLC proporcionado por MNL:

- Flujo: 0,7 mL/min
- Volumen de inyección de 10 μ L.
- Temperatura de columna: 30°C
- Longitud de onda: 520 nm
- Fase Movil A: 0,3% TFA en agua.
- Fase Movil B: 100% Acetonitrilo

Tabla 5. Gradiente de fases móviles para medición de antocianinas en HPLC.

| Tiempo [min] | Fase móvil A [v/v] | Fase móvil B [v/v] |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0 | 95 | 5 |
| 4 | 95 | 5 |
| 4.5 | 90 | 10 |
| 27 | 85 | 15 |
| 47 | 45 | 55 |
| 48 | 10 | 90 |
| 50 | 10 | 90 |
| 51 | 95 | 5 |
| 60 | 95 | 5 |

Todas las muestras recolectadas para medición de concentración de antocianinas en los diversos ensayos se conservaron a -20°C en oscuridad en solución de MeOH-HCl en la siguiente proporción: 0,25 mL jugo de maqui/3,82 mL MeOH/ 83,5 μL HCl (Dilución de 16,6 veces). Previas al análisis en HPLC se filtran pasándolas a través de un filtro de 0,22 μm .

Para evaluar el efecto del EDTA y ácido ascórbico, se preparan 4 muestras de jugo de maqui filtrado (de la misma forma que se detalla en el experimento anterior). Se evalúan cuatro condiciones:

- 1) EDTA 20 [mM]
- 2) Ácido ascórbico al 0,5% v/v
- 3) EDTA 20 [mM] + ácido ascórbico al 0,5% v/v
- 4) Control sin tratamiento

Las muestras se dejan reaccionando a 21°C y se miden antocianinas disueltas cada 15 minutos durante la primera hora, luego cada 30 minutos durante las siguientes 4 horas y una medición final a las 24 horas.

3.3 Tratamiento enzimático para liberación de antocianinas.

Con el objetivo de evaluar el impacto del tratamiento con enzimas comerciales (Enartis®) sobre la liberación de pigmentos, se realizan pruebas con dos mix enzimáticos distintos. El primero, denominado CP, está compuesto por enzimas pectolíticas además de celulasas, hemicelulasas y proteasas. El segundo mix, llamado RS, contiene enzimas pectolíticas, hemicelulasas, arabinasas, xilanasas, β -1,3-glucanasas, y proteasas.

Se preparan 120 ml de jugo de maqui sin filtrar para estas pruebas. Se evalúan 4 condiciones distintas en duplicado y para cada mezcla de enzimas (CP y RS):

- 1) 0,67 mL de enzima/100 L
- 2) 2 mL de enzima/100 L (concentración recomendada por el proveedor)
- 3) 6 mL de enzima/100 L de solución
- 4) Control sin enzima

Dado que las enzimas presentes en la mezcla actúan de forma óptima a pH ácido, se prueban además dos formas de preparación de la solución de maqui, una con agua destilada a pH 7 y otra con buffer citrato a pH 3,5. Para cada prueba se mide la concentración de antocianinas en el tiempo.

Cada condición se deja reaccionar durante 1,5 horas a 21°C, tomando la muestra de tiempo 0 previa a la adición de la mezcla enzimática. Luego de esto, se agrega la cantidad de enzima correspondiente a cada solución, y en adelante se toman muestras cada 15 minutos para medición de la concentración de antocianinas.

Se utiliza un montaje experimental similar a las pruebas anteriores, el que se muestra en la Figura 12.



Figura 12. (Izquierda) Mezcla de jugo de maqui con mix enzimático (Derecha) Filtración de jugo de maqui para posterior medición de antocianinas disueltas.

3.4 Fermentación con levaduras, para eliminar azúcares que afectan la solubilidad del producto final.

Se realizan pruebas de fermentación con levaduras sobre jugo de maqui sin filtrar, preparado como se menciona en la sección 3.2, con el objetivo de eliminar los azúcares (glucosa y fructosa principalmente), los que, al poseer propiedades fisicoquímicas similares a las antocianinas y flavonoides, son difíciles de separar y afectan la solubilidad del producto final.

Se utilizan dos cepas de levadura aplicadas normalmente en la industria del vino (*S. cerevisiae* bayanus EC118 y *S. cerevisiae* C6 FUEL), disponibles en el cepario del CeBiB. Ambas se caracterizan por poseer un buen desempeño en concentraciones de alcohol por sobre el 18% y por alimentarse de igual forma tanto de glucosa como fructosa, lo cual es altamente deseable ya que el maqui posee concentraciones similares de glucosa y fructosa (4,6 gr y 4,3 gr respectivamente por cada 100 gr de fruta (Brauch, 2016)). Sin embargo, la cepa EC1118 logra un mejor desempeño a bajas temperaturas (entre 15-25°C) y la cepa C6 posee una temperatura óptima de fermentación recomendada de 30°C.

Todas las fermentaciones se realizan con 150 ml de jugo de maqui sin filtrar en matraces Erlenmeyer de 250 ml. Se evalúan distintas condiciones en las fermentaciones, con el objetivo de determinar el efecto en el contenido final de azúcar:

- 1) Medio de preinóculo: Se preparan preinóculos de ambas cepas en dos medios distintos: YPD con fructosa a pH 4 y solución de maqui al 40% p/v (para aminorar los tiempos de aclimatación). En ambos casos se utiliza prepara un volumen de 5 ml del medio correspondiente, a 28°C y 250 rpm de agitación. Se inoculan las fermentaciones con 0,4% v/v de preinóculo y se mantienen las mismas condiciones de 28°C y 250 rpm para las fermentaciones.

Tabla 6. Diseño experimental de las primeras fermentaciones.

| Experimento | Tipo de levadura | Preinóculo |
|-------------|------------------|------------|
| 1 | Sin | - |
| 2 | C6 | YPD |

| | | |
|----------|--------|-------|
| 3 | C6 | Maqui |
| 4 | EC1118 | YPD |
| 5 | EC1118 | Maqui |

2) Temperatura de incubación y atmosfera inerte: Se realizan pruebas de fermentación a 20°C, además se testea el uso de una atmosfera de nitrógeno inerte para evaluar el efecto de la ausencia de oxígeno en la velocidad de oxidación de las antocianinas. Para ello se bombea N₂ durante 15 segundos en los cultivos mientras se toma cada muestra. Los preinóculos se crecen en medio YPD a 28°C y 250 rpm, y se inoculan las fermentaciones de 150 ml con 0,4% v/v de preinóculo.

Tabla 7. Diseño experimental de las segundas fermentaciones.

| Experimento | Tipo de levadura | Atmosfera |
|--------------------|-------------------------|------------------|
| 1 | Sin | Aire |
| 2 | C6 | Aire |
| 3 | EC1118 | Aire |
| 4 | Sin | Nitrógeno |
| 5 | C6 | Nitrógeno |
| 6 | EC1118 | Nitrógeno |

3) Concentración de preinóculo, tratamiento con EDTA, ácido ascórbico y shock térmico: Se realizan pruebas con concentración inicial de biomasa de 10% en 150 ml de jugo de maqui 40% p/v sin filtrar, para evaluar este parámetro en la velocidad de consumo de azúcares. Adicionalmente, con el mismo porcentaje de preinóculo, se realizan ensayos de fermentación con shock térmico de 70°C por 10 minutos previo al inicio de la incubación, y ensayos con EDTA 20 [mM] y ácido ascórbico 0.5% p/p para evaluar el efecto de estas condiciones en la tasa de degradación de antocianinas. Se mantiene la temperatura a 28°C y la agitación en 250 rpm.

Tabla 8. Diseño experimental para la tercera tanda de fermentaciones.

| Experimento | Tipo de tratamiento |
|--------------------|----------------------------|
| 1 | Sin |
| 2 | 70°C por 10 minutos |
| 3 | EDTA + Ac. Ascórbico |

A cada muestra se le analiza concentración de antocianinas con los parámetros previamente establecidos, y glucosa y fructosa utilizando kit de medición de Biosystems®, número de catálogo 12800. Para cada medición de azúcares se

diluye la muestra 10 veces en H₂O destilada (100 µL de muestra en 900 µL de agua) y se mantiene guardada a 4°C en oscuridad hasta su uso.

3.5 Filtraciones Secuenciales

Se preparan 2 litros de jugo bajo las condiciones previamente establecidas y posteriormente se diluyen en razón 1:1 con agua destilada generando 4 litros de jugo para filtrar.

El sistema de filtración corresponde a una bomba que empuja el jugo a través de una serie de membranas cilíndricas de filtración radial con tamaño de poro especificado en la Tabla 9. El jugo filtrado (PERMEADO) se acumula en un bidón mientras que el jugo no filtrado (CONCENTRADO) vuelve al estanque inicial de jugo para ser empujado a través de la membrana nuevamente.

Tabla 9. Membranas disponibles para el sistema de filtración secuencial y su correspondiente presión máxima de operación.

| Operación | Tamaño de Poro | Presión de Operación [psi] |
|-----------------|----------------|----------------------------|
| Microfiltración | 0.4-1.25 µm | 120 |
| Ultrafiltración | 10 kDa | 120 |
| Ultrafiltración | 5 kDa | 120 |
| Ultrafiltración | 1 kDa | 120 |
| Nanofiltración | 300-500 Da | 600 |
| Osmosis Reversa | 200 Da | 600 |

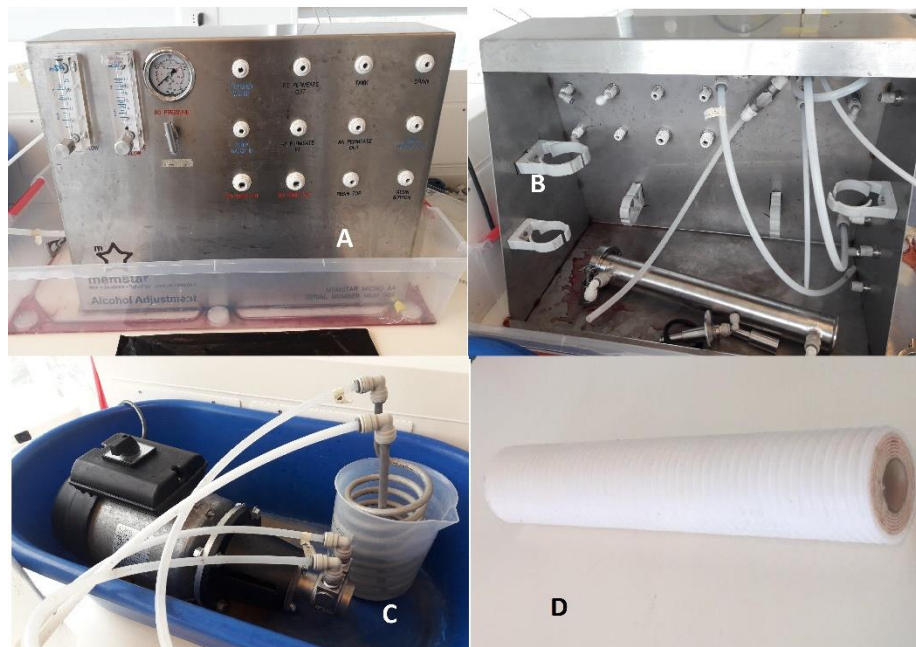


Figura 13. (A) Equipo de filtración de frente, (B) Equipo de filtración por atrás, (C) Bomba y equipo de enfriamiento, (D) Membrana de Osmosis Reversa.

Para los primeros experimentos de filtración el jugo se hace pasar a través de las membranas de Microfiltración, Ultrafiltración de 5 y 1 kDa y de Nanofiltración. Posterior a cada etapa de filtración se toman muestras tanto en el jugo permeado como en el jugo concentrado para medir concentración de antocianinas, glucosa y fructosa. Se mide además la velocidad instantánea de filtrado y la concentración en el tiempo de antocianinas, glucosa y fructosa, tanto en permeado como en concentrado.

El esquema experimental se muestra a continuación:

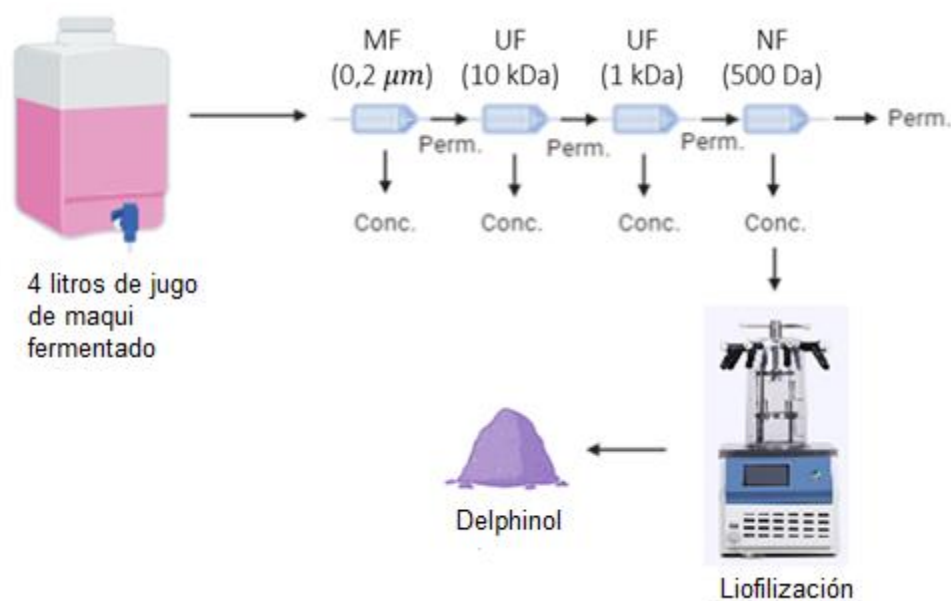


Figura 14. Set experimental para los experimentos de filtraciones secuenciales.

3.6 Proceso Completo

Se determinó realizar un pretratamiento al jugo de maqui, de acuerdo a los resultados de los experimentos iniciales. Este se muestra en la figura a continuación:

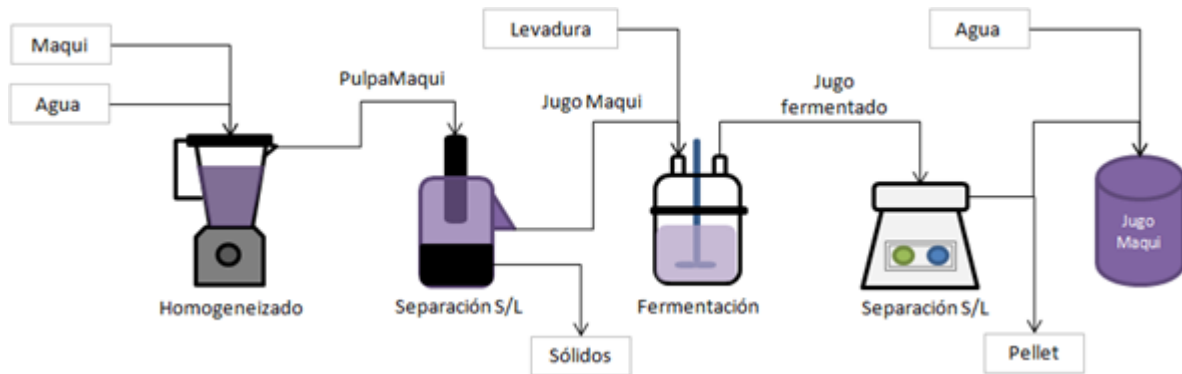


Figura 15. Diagrama del proceso completo.

Las etapas de pre tratamiento se realizaron de la siguiente manera:

1. Se preparó jugo de maqui para el ensayo utilizando la proporción 30 gr de maqui / 75 ml de agua y se dejó triturar durante 2 minutos en una juguera.
2. Se deja reposar el jugo durante 30 minutos para que las antocianinas difundan y alcancen su concentración de equilibrio.
3. Se eliminan los sólidos en suspensión tales como semillas, hollejo, ramas pequeñas, etc. Mediante una filtradora continua de jugo.
4. No se agregaron enzimas de ningún tipo al jugo de maqui.
5. Se fermentó el jugo utilizando los siguientes parámetros:

Tabla 10. Parámetros de fermentación para proceso completo.

| PARAMETRO | ESPECIFICACIÓN | OTROS |
|--|------------------------|--------------------------------|
| Temperatura | 28°C | |
| Agitación | 200 rpm | |
| Tiempo de fermentación | 13-14 hrs | |
| pH | 4 | |
| Proporción volumen jugo/volumen fermentador | 0,2 | |
| Tipo de levadura | EC1118 | |
| Medio de preinóculo | YPD con fructosa | |
| % en volumen de preinóculo | 10% | |
| Tiempo de preinóculo | 12-14 hrs | OD600 entre 2.5 y 5 |
| Agentes antioxidantes | EDTA y Ácido ascórbico | 6 gr/L y 5gr/L respectivamente |

6. Posterior a la fermentación se centrifugó el jugo por 5 minutos a 4000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se eliminó el pellet de levaduras.
7. Se diluye el jugo con agua en relación 1:1.
8. Se pasó el jugo por el sistema de filtraciones secuenciales utilizando las membranas de Microfiltración, Ultrafiltración (5 y 1 kDa) y Nanofiltración (Figura 14). Descartando los concentrados no filtrados de las etapas de microfiltración y ultrafiltración y conservando el concentrado de nanofiltración, descartando el permeado de esta última etapa.
9. Se liofilizaron 30 ml de las fracciones de concentrado de nanofiltración.

3.7 Modificaciones al proceso lineal

Con el fin de aumentar el porcentaje de recuperación de antocianinas desde el jugo inicial hasta el concentrado final y la pureza del liofilizado resultante se plantean las siguientes modificaciones al proceso:

- a. Se reemplaza la fruta que se había estado usando (0.7% p/p) por una con mayor cantidad de antocianinas en peso (1.4% p/p). Se espera que con esta modificación no varíen los porcentajes de recuperación por etapa, pero sí que el liofilizado final tenga un mayor porcentaje en peso de antocianinas ya que la cantidad de elementos contaminantes del liofilizado debería mantenerse constante, mientras que el peso de antocianinas debería aumentar.
- b. Cambiar la membrana de 5 kDa por una de 10 kDa. De esta forma se espera que al aumentar el tamaño del poro se forme una torta más pequeña en la superficie de la membrana, con lo que debería haber menor resistencia al paso de antocianinas y una disminución en el tiempo de filtrado.
- c. Cambiar la membrana de nanofiltración por una de osmosis inversa. Si con la membrana de nanofiltración se recuperaba aproximadamente el 90% de las antocianinas con la de osmosis reversa se espera recuperar un porcentaje cercano al 99%.

3.8 Reciclos

Con el fin de aumentar el porcentaje de recuperación de antocianinas sin reducir la pureza del producto seco se plantea el uso de una corriente de reciclaje, conformada por todas las corrientes de concentrado que son rechazadas en cada etapa de filtración. Esta corriente se espera que vuelva al tanque de jugo inicial para darle así una segunda oportunidad a las antocianinas presentes en esta corriente de pasar por todas las etapas de filtración nuevamente.

Para testear la eficiencia de esta modificación se toman todas las corrientes de concentrado de cada etapa y se mezclan en un nuevo jugo (5,5 litros). Este jugo se somete posteriormente a las filtraciones secuenciales de la misma forma que el jugo inicial.

Cabe recalcar que para este experimento se presentaron algunas dificultades en la instalación de la membrana de nanofiltración, la cual se encontraba funcionando de forma errónea, dejando pasar al permeado una gran cantidad de antocianinas (80%), por lo que este experimento se realizó con ambas membranas, de nanofiltración y OR, en conjunto. Se espera que la inclusión de estas dos membranas al final disminuya el porcentaje de recuperación total de antocianinas, pero para observar el efecto de la corriente de reciclaje no existan mayores problemas.

3.9 Diseño de la configuración del proceso en función de la composición final del extracto de maqui requerida, dimensionamiento de equipos y análisis económico de planta de producción.

Para determinar la configuración del proceso para la obtención de un extracto de maqui con un contenido de antocianinas de 35% en peso se utilizaron los resultados obtenidos de los experimentos realizados en conjunto con ecuaciones de diseño para así determinar el número y la configuración de membranas requerida en las filtraciones secuenciales para la obtención de un producto con estas características.

Mientras que, para el dimensionamiento de los equipos, una vez definida la configuración de estos, se calcula en base a los requerimientos de producción anuales solicitados por MNL, los cuales ascienden a 5000 kg/año. Suponiendo 12 meses por año, 20 días por mes y 20 horas por día.

Finalmente, se realiza una evaluación económica del proyecto considerando tanto los ingresos por venta como los costos de inversión y de operación de los equipos, salarios, etc., y se concluye sobre la viabilidad económica del proyecto. En esta evaluación no se consideran los costos ya previamente establecidos en la estructura de Maqui New Life, como costos de marketing, por ejemplo, funcionando esta evaluación como ítems agregados a esta estructura.

4. Resultados y Discusiones

4.1 Pruebas de estabilización y conservación de antocianinas.

En el Gráfico 1 se muestra la variación en la concentración de antocianinas en el tiempo para los distintos tratamientos con temperatura para inactivar β -glucosidasa: condición control (temperatura ambiente), a 70°C y 85°C.

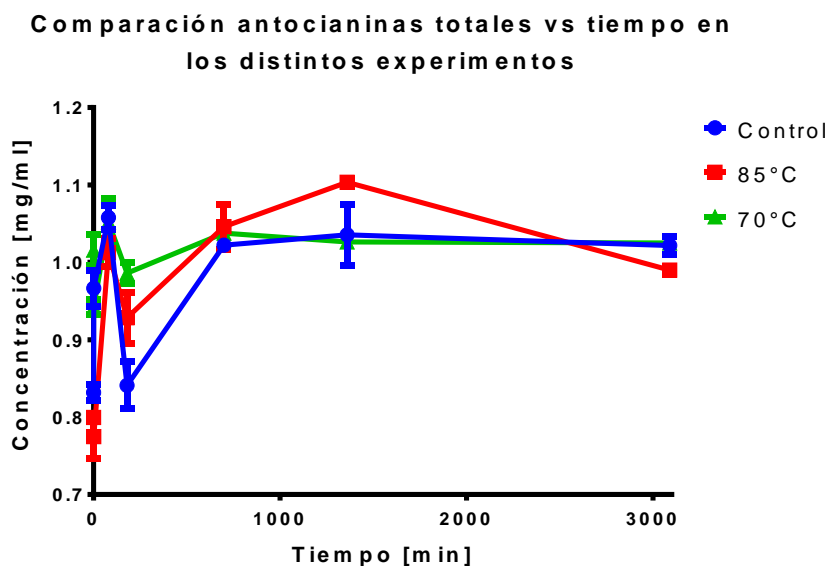


Gráfico 1. Concentración de antocianinas totales vs tiempo para cada condición de temperatura estudiada.

La variación en la concentración de antocianinas es menor al 10% durante todo el periodo del ensayo (52 horas), lo que ocurre tanto para la muestra control, como en las muestras tratadas con temperatura. En estas últimas se observa una pequeña disminución en la concentración de antocianinas posterior al tratamiento con temperatura (3,1% para la condición a 70°C y 7,3% para 85°C). Estos resultados nos indican que las β -glucosidasa nativas de maqui no tienen mayor influencia sobre la tasa de degradación de antocianinas en el jugo de maqui.

En el Gráfico 2 se observa la variación en la concentración de antocianinas en función del tiempo para las muestras de maqui tratadas con EDTA, ácido ascórbico y ambas condiciones juntas, expresada en función de la OD a 520 nm.

Comparación entre la OD a 520 nm de las distintas condiciones medidas

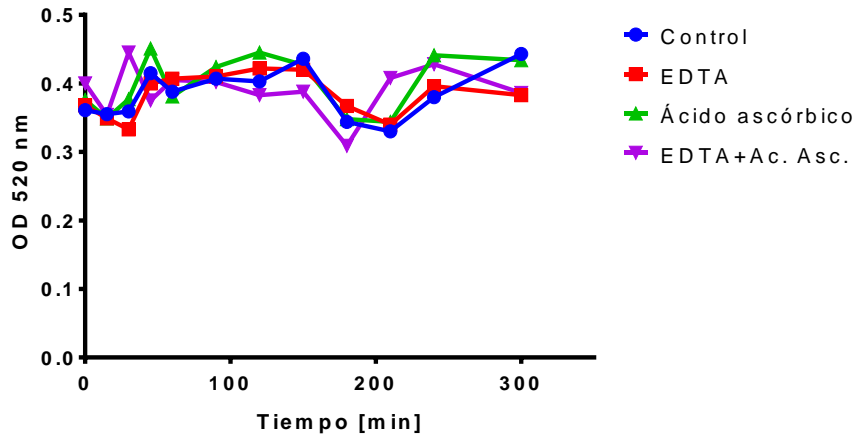


Gráfico 2. OD a 520 [nm] de las muestras de maqui tratadas con EDTA, ácido ascórbico, con mezcla EDTA y Ácido Ascórbico más el control.

En el Gráfico 3 a continuación se compara la concentración inicial y final de antocianinas para las muestras tratadas con EDTA, ácido ascórbico y ambos juntos, para un tiempo de 24 hrs.

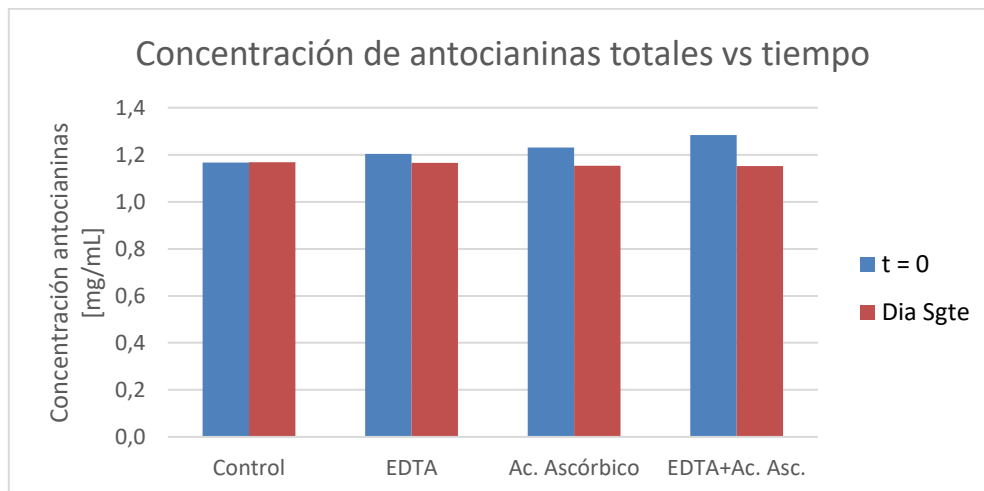


Gráfico 3. Comparación en la concentración de antocianinas para las muestras tratadas con EDTA y ácido ascórbico en los tiempos inicial y final (24 horas).

En cuanto a los efectos protectores del EDTA y ácido ascórbico sobre los polifenoles del maqui, en el Gráfico 2 y Gráfico 3, se observa que tanto en el control como en las muestras con EDTA, ácido ascórbico y mezcla de ambos, la concentración de antocianinas no presenta una variación significativa dentro de las primeras 24 horas.

4.2 Tratamiento enzimático para liberación de antocianinas

En el **iError! No se encuentra el origen de la referencia.** y Gráfico 5 se presenta un resumen de los resultados obtenidos para el mix enzimático CP en las distintas concentraciones (CP =0; 0,67; 2; 6 ml/100 Lt), para la solución de maqui preparada con agua destilada (pH 7) y buffer citrato (pH 3,5), respectivamente.

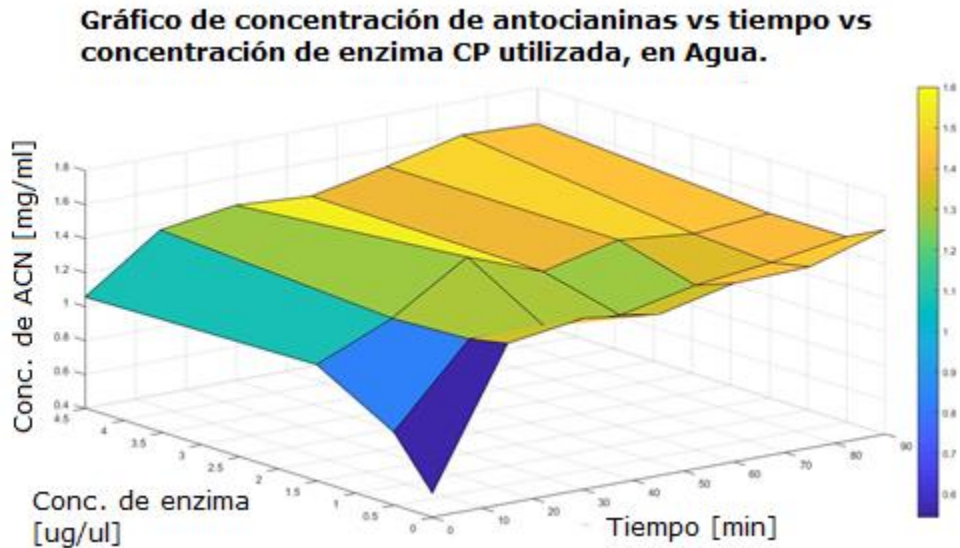


Gráfico 4. Variación en la concentración de antocianinas para mix CP y solución de maqui en agua.

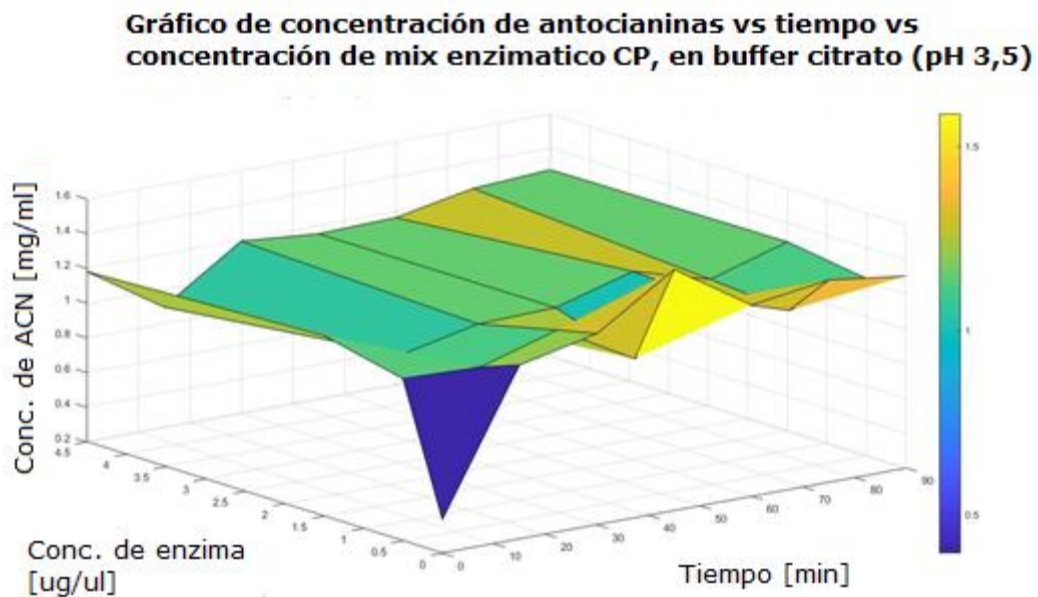


Gráfico 5. Variación en la concentración de antocianinas para mix CP y solución de maqui en buffer citrato.

Se observa que la concentración de antocianinas aumenta en ambos gráficos en los primeros 20-30 minutos, alcanzando valores de entre 1,6 y 1,3 mg/ml respectivamente, y que estas concentraciones se mantienen constante entre los 30 y 90 minutos posteriores. Se observa además que, en ambos casos, el aumento en la concentración del mix enzimático CP no tiene un impacto significativo en la concentración final de antocianinas liberadas, pero si en la concentración inicial de antocianinas, ya que se observa que la concentración inicial de cada muestra (tiempo 0) aumenta a medida que aumenta la concentración de mix CP agregado.

En cuanto al uso de agua y buffer citrato, no se observan diferencias significativas en cuanto a los niveles de concentración de antocianinas.

En cuanto a los ensayos realizados utilizando mix RS, en distintas concentraciones (RS = 0; 0,67; 2; 6 ml/100 L), para la solución de maqui preparada con agua y buffer citrato, los resultados se muestran en los **iError! No se encuentra el origen de la referencia.** y **iError! No se encuentra el origen de la referencia..**

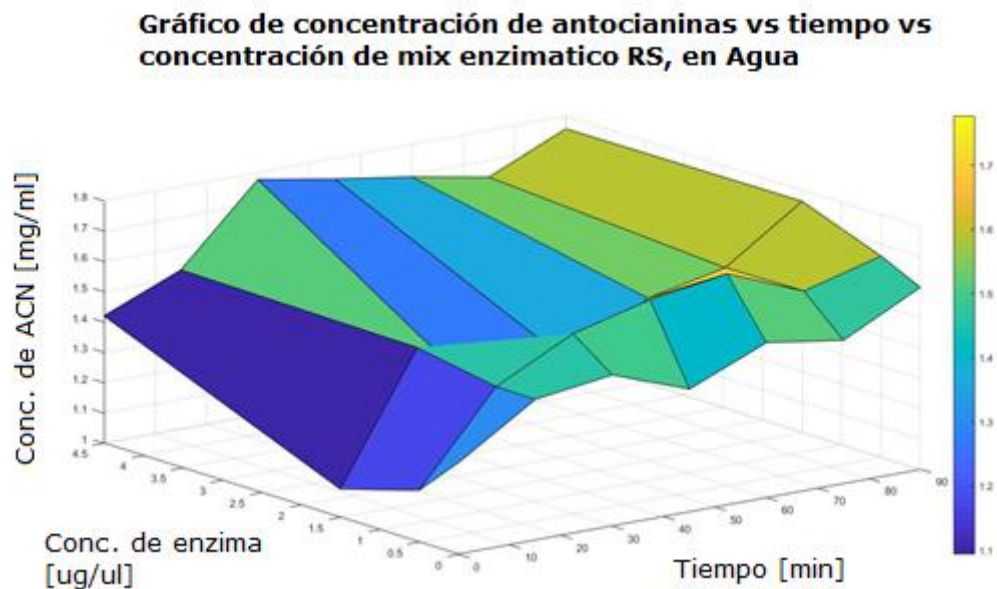


Gráfico 6. Variación en la concentración de antocianinas para mix RS y solución de maqui en agua.

Gráfico de concentración de antocianinas vs tiempo vs concentración de mix enzimático RS, en Agua

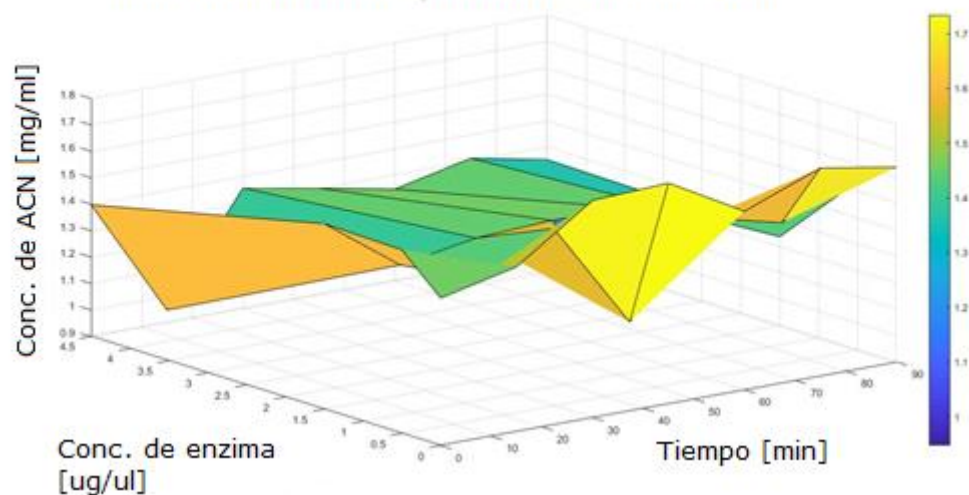


Gráfico 7. Variación en la concentración de antocianinas para mix RS y solución de maqui en buffer citrato.

Al igual que el caso del mix CP, con mix RS también se aprecia que la concentración de antocianinas se mantiene relativamente constante entre los 30 y 90 minutos alcanzando un valor de alrededor de 1,75 [mg/ml] para el experimento con agua y de 1,3 [mg/ml] para el caso de buffer citrato, no observándose un aumento mayor al 10% dentro de este rango de tiempo. Sin embargo, entre los tiempos 0 y 30 se pueden observar diferencias significativas (por sobre el 50%) en la concentración de antocianinas liberadas, para algunas de las muestras.

Se aprecia además que el aumento en la concentración del mix enzimático RS no tiene un impacto en la concentración de antocianinas liberadas, y por lo tanto no tiene relevancia el uso de buffer citrato.

En todas las pruebas realizadas, se observa un aumento en la concentración de antocianinas entre los 0 y 30 minutos, tanto en las muestras con enzimas como en las de control. Además, el aumento en la concentración inicial de cada muestra a medida que se aumenta la concentración de mix enzimático aplicado responde principalmente a un fenómeno de transferencia de masa en lugar de a un efecto enzimático. Probablemente debido a que cada medición tomó un tiempo aproximado de 2 minutos, siendo el tiempo total de análisis de 8 minutos para las primeras 4 tomas de muestra, dándole tiempo a las antocianinas de difundir a través de la solución y así aumentar su concentración en los experimentos en los que la toma de muestra se hace más tardía.

4.3 Fermentación con levaduras, para eliminar azúcares que afectan la solubilidad del producto final.

- **Distintos medios de preinóculo: YPD y maqui**

En el **iError! No se encuentra el origen de la referencia.** se presenta la variación en la concentración de antocianinas en el tiempo para las fermentaciones hechas con las 2 cepas de levadura propuestas (C6 y EC1118), y crecidas tanto en medio YPD como en jugo de maqui, incubadas a 28°C y 250 rpm.

Gráfico de comparación entre las distintas condiciones evaluadas

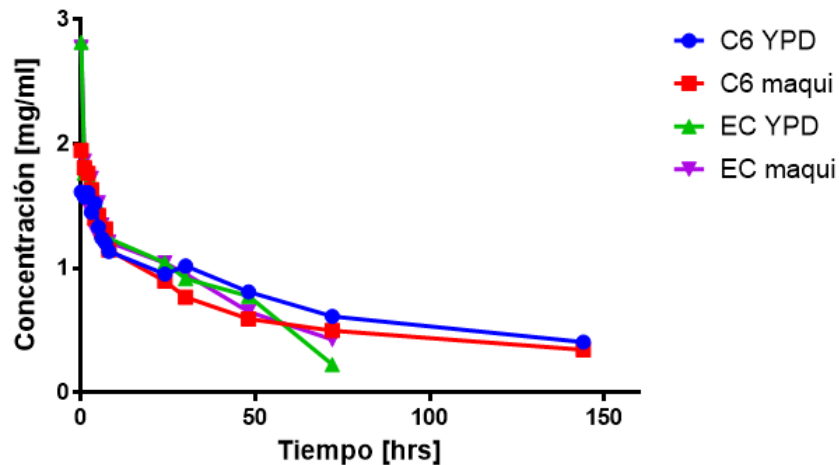


Gráfico 8. Concentración de antocianinas para fermentaciones con cepas C6 y EC1118, inoculadas al 0,2% en las fermentaciones y crecidas en medio YPD y jugo de maqui a 28°C y 250rpm.

Se aprecia que las levaduras cultivadas en jugo de maqui no presentan una diferencia significativa en la tasa de degradación de antocianinas en comparación a las cultivadas en medio YPD. Además, se puede observar que, a medida que transcurre el tiempo de fermentación, la concentración de antocianinas baja considerablemente (más de un 60%), lo que se podría deber a que las levaduras fermentan los azúcares a los que están unidas las antocianinas, degradando así las antocianinas. Esto, en conjunto con el efecto de la temperatura y agitación, constituyen condiciones poco amigables para la estabilidad de estas moléculas.

Para evaluar el efecto de la concentración inicial de levadura en la tasa de degradación de antocianinas en el Gráfico 9 se presentan los resultados de la

comparación entre 3 condiciones distintas a 28°C: Inoculación al 0.4% de levadura C6, EC1118 crecidas en YPD, y un control sin levadura añadida.

Gráfico de antocianinas vs tiempo para los distintas levaduras, a 28°C

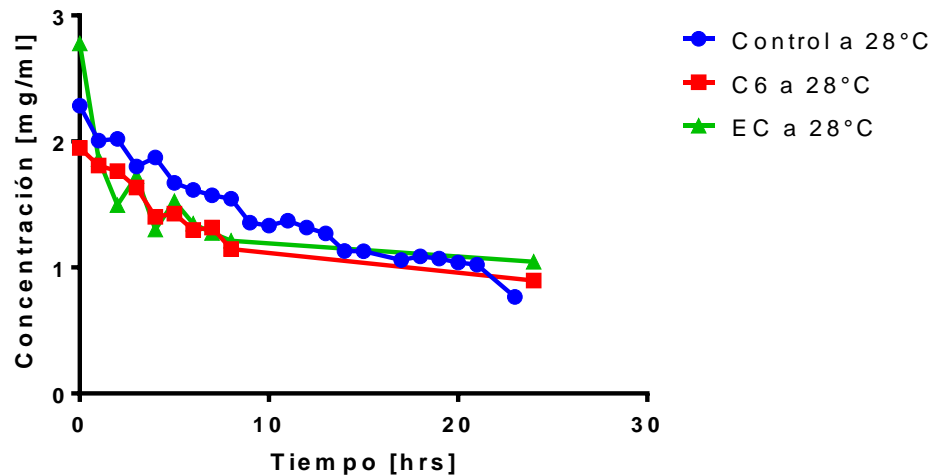


Gráfico 9. Antocianinas totales vs tiempo para fermentación con EC, C6 al 0,4% y control.

Se observa que la tasa de degradación de antocianinas se mantiene constante independiente de la cantidad o tipo de levadura añadida, por lo que la causa de la degradación de antocianinas es debido probablemente a las condiciones de operación (temperatura, agitación y concentración de oxígeno).

- **Temperatura de incubación y atmosfera inerte**

Nuevamente, para evaluar el efecto de las condiciones de operación en la tasa de degradación se prueban fermentaciones a 20°C y en ausencia de oxígeno. Los resultados comparados se presentan en el Gráfico 10.

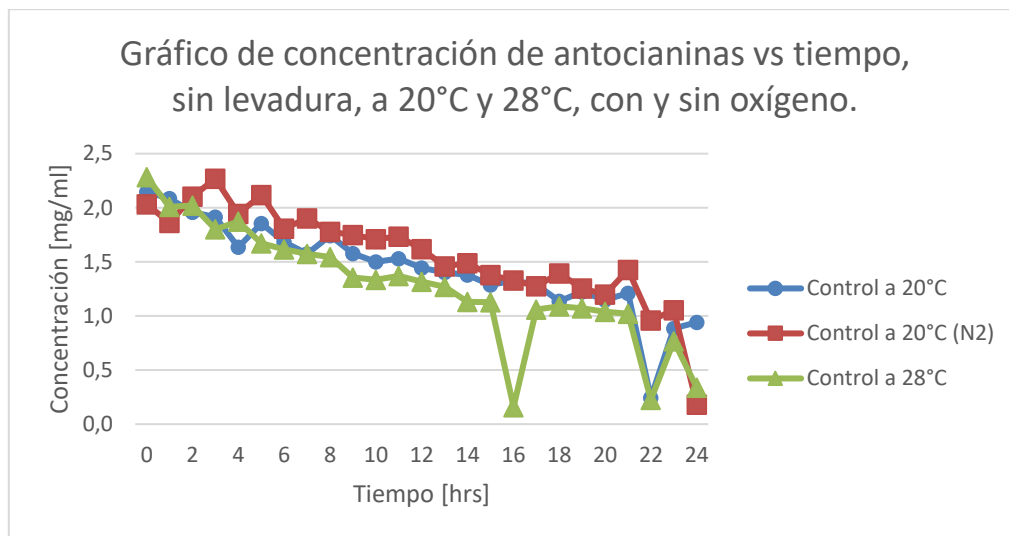


Gráfico 10. Antocianinas totales vs tiempo para las 3 condiciones señaladas.

Se aprecia de este gráfico que la tasa de degradación de antocianinas es mayor a los 28°C, mientras que la de menor tasa de degradación es la curva correspondiente al experimento a 20°C en ausencia de oxígeno. Esto confirma que la degradación de las antocianinas ocurre principalmente por las condiciones de operación y no por la cantidad o cepa de levadura añadida.

Al mismo tiempo se midieron las concentraciones de glucosa y fructosa en solución para analizar la tasa de degradación de estas, objetivo principal de la etapa de fermentación. Ya habiendo observado que la mejor condición para la conservación de antocianinas correspondía a 20°C y en ausencia de oxígeno se dispuso a medir los azúcares en esa condición. Los resultados se presentan en el Gráfico 11.

Gráfico de Azúcares totales vs tiempo, a 20°C, sin oxígeno y con distintas cepas de levadura

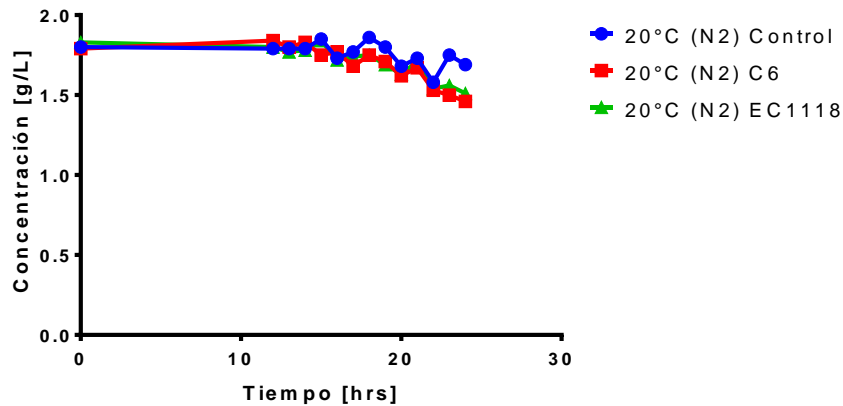


Gráfico 11. Azúcares totales (Glucosa y Fructosa) vs tiempo para fermentaciones a 20°C, en ausencia de oxígeno y en las condiciones señaladas: Control, con 0.4% de inóculo de levadura C6 y EC1118.

De este gráfico se aprecia que la concentración de azúcares decrece más rápido cuando se añade levadura C6 o EC1118, no habiendo mayor diferencia entre ellas, en comparación a la condición de control, aun así, la tasa de decaimiento es lenta ya que luego de transcurridas 24 horas la concentración baja menos del 10%. Esta dinámica no varía en presencia de oxígeno como se puede ver en el Gráfico 12.

Gráfico de Azúcares totales vs tiempo, a 20°C y con distintas cepas de levadura

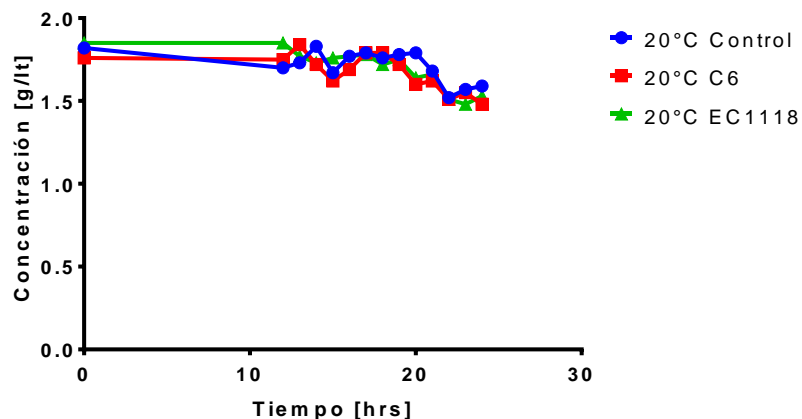


Gráfico 12. Azúcares totales (Glucosa y Fructosa) vs tiempo para fermentaciones a 20°C, en presencia de oxígeno y en las condiciones señaladas: Control, con 0.4% de inóculo de levadura C6 y EC1118.

Sin embargo, cuando analizamos las condiciones en presencia de oxígeno y a 28°C observamos que la totalidad de la azúcar se consume a las 24 horas y que incluso en la condición de control sin levadura añadida hay una disminución en la cantidad de azúcares totales. Esto se debe probablemente a los microorganismos nativos del maqui. Este resultado se observa en el Gráfico 13.

Gráfico de Azúcares totales vs tiempo, a 28°C y con distintas cepas de levadura

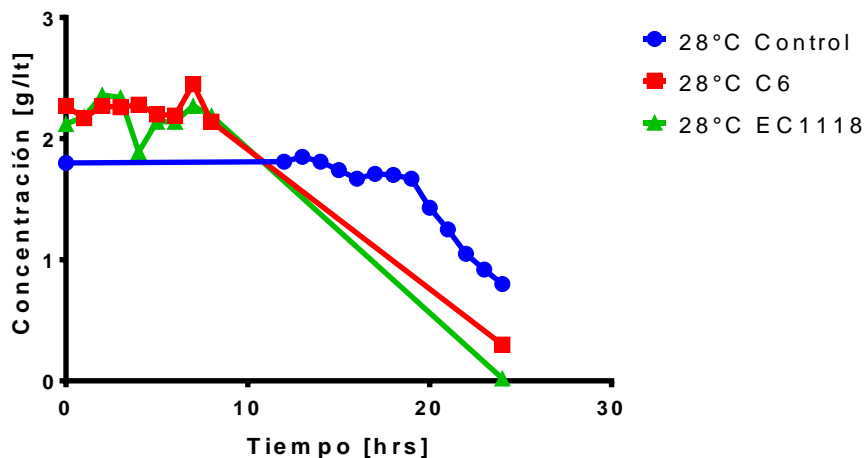


Gráfico 13. Azúcares totales (Glucosa y Fructosa) vs tiempo para fermentaciones a 28°C, en presencia de oxígeno y en las condiciones señaladas: Control, con 0.4% de inóculo de levadura C6 y EC1118.

De este gráfico es posible observar también que la cepa de levadura EC1118 muestra una leve ventaja sobre la cepa C6 en cuanto al consumo de azúcares en el tiempo final correspondiente a las 24 horas.

Dado que en esta condición se consume azúcar a una velocidad significativamente mayor que a 20°C (100% vs >10%), se propone dejar esta condición como la establecida para la etapa de fermentación. Sin embargo, en esta condición es donde se produce también la mayor tasa de degradación de antocianinas, por lo que los siguientes experimentos tienen como finalidad reducir al máximo los tiempos de fermentación con el fin de que la cantidad de antocianinas degradadas sea la menor posible, además de probar distintas opciones adicionales para proteger a las antocianinas de las condiciones poco amigables del proceso.

- **Concentración de preinóculo, tratamiento con EDTA y ácido ascórbico, y shock térmico.**

Para reducir los tiempos de fermentación se prueba inocular con un mayor porcentaje de preinóculo (10% v/v) y se realiza en fase exponencial (10-11 horas a 28°C (Gráfico 28)), con el fin de reducir el tiempo de latencia en el nuevo cultivo de maqui. Mientras que para reducir la degradación de antocianinas debido a las condiciones de operación se testean dos protocolos: Agregar EDTA y ácido ascórbico para evitar la oxidación de antocianinas por la agitación en una atmosfera de oxígeno (implementar una atmosfera de nitrógeno también es igualmente válido, pero a escala industrial resulta más complejo y más costoso) y, utilizar un shock térmico previo de 70°C durante 10 minutos para inactivar las enzimas β -Glucosidasas nativas del maqui que pudiesen romper los enlaces entre las antocianidinas y las moléculas de azúcar.

Los resultados de estos experimentos se presentan a continuación.

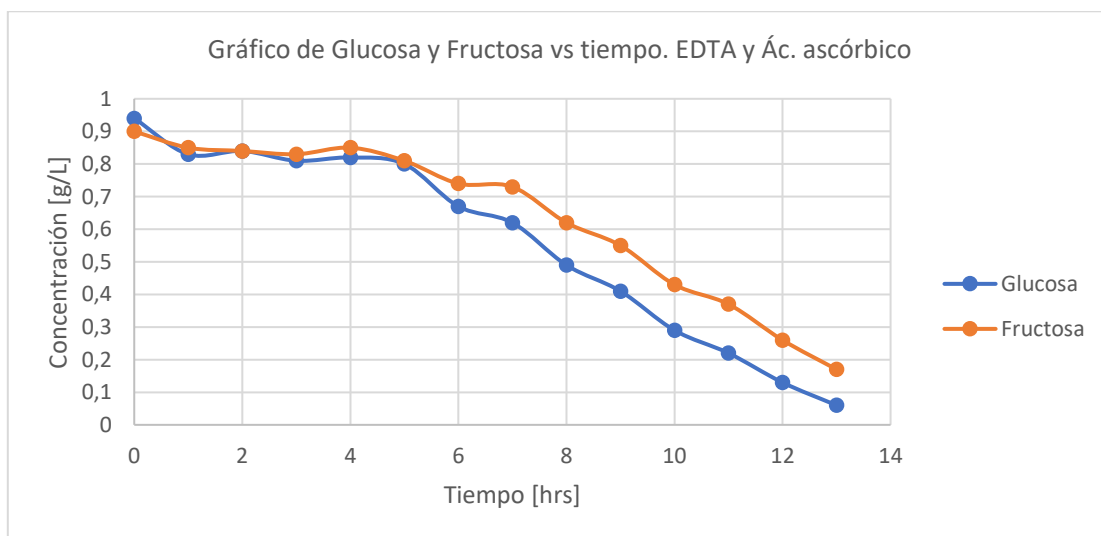
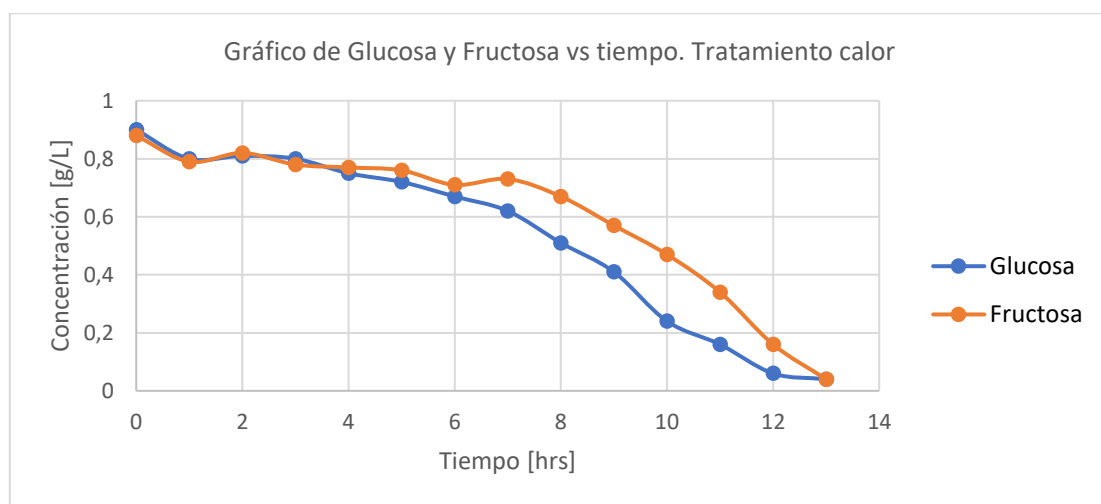
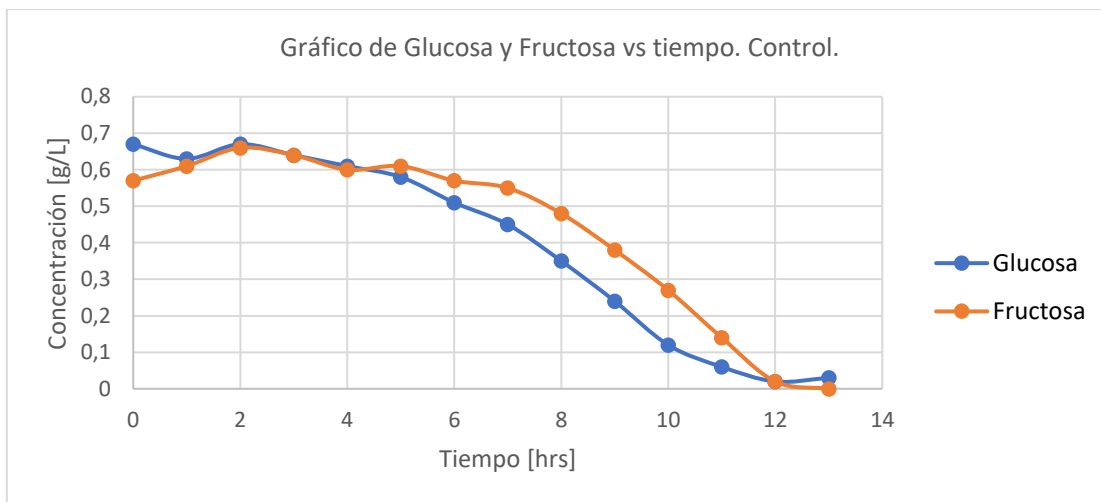


Gráfico 14. Azúcares totales (glucosa y fructosa) vs tiempo para fermentación con 10% de inóculo de levadura EC1118. El gráfico superior corresponde al control, el intermedio al tratamiento con calor y al inferior al tratamiento con EDTA 20 [mM] y ácido ascórbico 0,5%.

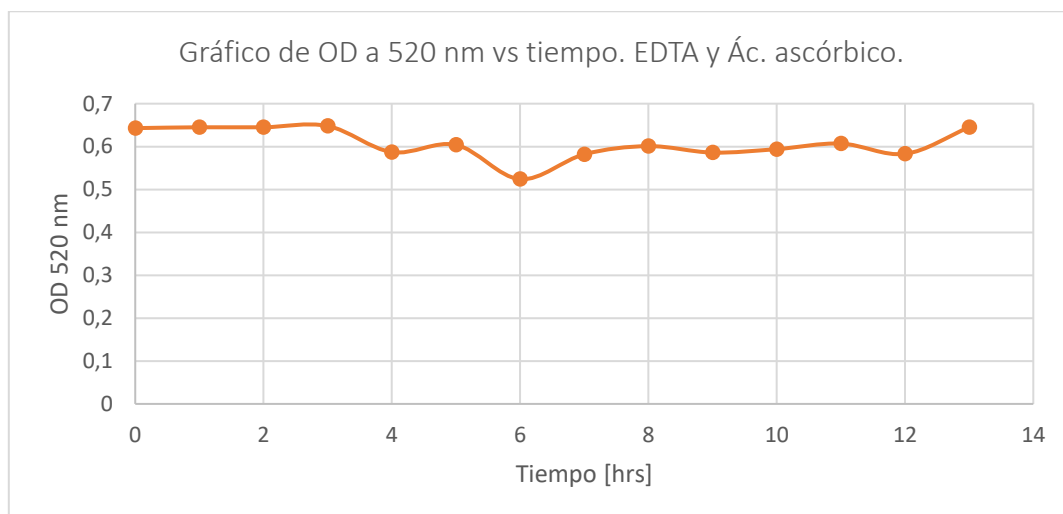
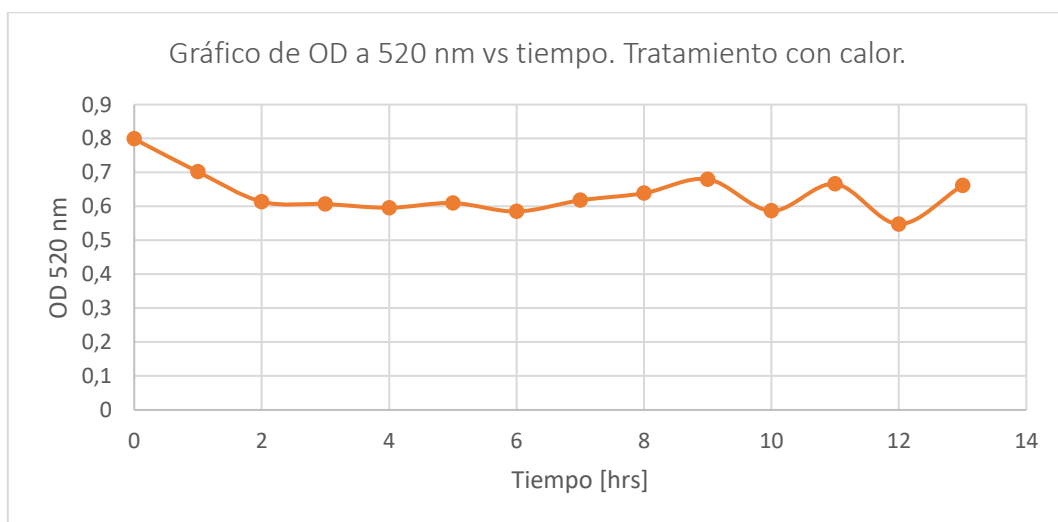
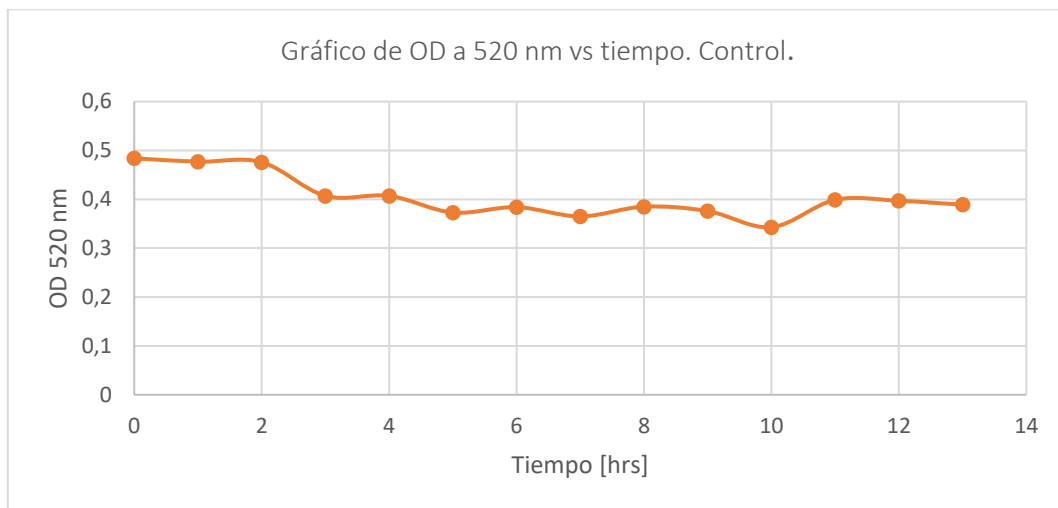


Gráfico 15. Medición de OD a 520 nm para medir antocianinas totales en muestras de fermentación con 10% de inóculo de levadura EC1118. El gráfico superior corresponde al control, el intermedio al tratamiento con calor y al inferior al tratamiento con EDTA 20 [mM] y ácido ascórbico 0,5%.

Del Gráfico 14 se observa que efectivamente al inocular un mayor porcentaje de levadura en crecimiento exponencial aumenta la tasa de consumo de azúcar por las levaduras en el tiempo. En estos experimentos se observa que a las 13 horas de fermentación se consume prácticamente la totalidad de glucosa y fructosa presente en la solución, no teniendo mayor incidencia en este fenómeno el pretratamiento con calor o el uso de EDTA y ácido ascórbico, mientras que las antocianinas experimentan un decrecimiento en su concentración dada por la medición de densidad óptica (OD) de un 20% aproximadamente, lo que se condice con los resultados obtenidos anteriormente.

En los experimentos posteriores para reducir la tasa de degradación de antocianinas, se trató la solución de maqui con calor para inactivar las enzimas β -glucosidasas nativas y se agregó EDTA y ácido ascórbico para proteger a las antocianinas de la oxidación. Se observó que en cuanto al consumo de azúcares en los experimentos tratados con calor estos se consumieron totalmente a las 13 horas, no presentando mayor variación con el control. Mientras que en las muestras tratadas con EDTA y ácido ascórbico la glucosa se consumió de manera prácticamente completa, pero no así la fructosa, que a las 13 horas de fermentación aún tenía un 14% de fructosa total sin consumir.

En cuanto a la tasa de degradación de antocianinas, en los experimentos tratados con calor se observa una caída del 17% en la concentración inicial a las 13 horas de fermentación, lo cual no varía de forma significativa en comparación al control sin tratamiento con calor, por lo que es probable que una mínima parte de antocianinas sea degradada de esta forma. Mientras que en las muestras tratadas con EDTA y ácido ascórbico se observa una disminución en la concentración de antocianinas de un 9% pasado 13 horas de fermentación, por lo que es probable que el mayor porcentaje de degradación de antocianinas ocurra por oxidación en sistemas con agitación.

En base a estos resultados y a que el objetivo principal de esta investigación es obtener un mayor porcentaje de recuperación de antocianinas, se proponen como condiciones de operación utilizar un 10% de preinóculo en fase de crecimiento exponencial, tratar las muestras con EDTA y ácido ascórbico y fijar un tiempo de fermentación de 14 horas. Se proponen 14 horas de fermentación ya que a las 13 horas la fructosa no alcanza a consumirse completamente, pero se espera que, siguiendo el mismo ritmo de consumo, a las 14 horas ya no queden azúcares en solución. Además, aunque se aumente el tiempo de fermentación, las antocianinas no sufrirán una mayor degradación gracias a la protección del EDTA y ácido ascórbico.

4.4 Filtraciones Secuenciales

A partir de los experimentos de filtración realizados se analizan dos tipos de resultados distintos:

- 1) Grado de rechazo de las membranas tanto para antocianinas totales como para cada tipo de antocianina.
- 2) Curvas de velocidad de filtración, variación en concentración de antocianinas y variación en concentración de azúcares.

En cuanto al primer punto, se presentan en primer lugar los resultados correspondientes al grado de rechazo de cada membrana en la cantidad total de antocianinas en la Tabla 12.

En las dos primeras columnas se señala la etapa de filtración y si pertenece a la fracción de concentrado o permeado, en la tercera la concentración de antocianinas en esa fracción, en la cuarta el volumen obtenido de dicha fracción, en la quinta el peso de antocianinas totales existentes en esa fracción, en la sexta los porcentajes de recuperación total de antocianinas de cada etapa de filtración y que porcentaje del total recuperado pertenece a la fracción de permeado.

Tabla 11. Simbología

| | |
|-----------|------------------------|
| MF | Microfiltración |
| UF | Ultrafiltración |
| NF | Nanofiltración |
| OR | Osmosis Reversa |
| C | Concentrado |
| P | Permeado |
| CR | Concentrado Residual |
| PR | Permeado Residual |

Tabla 12. Grado de rechazo por membrana para antocianinas totales.

| Contenido inicial | | | | | | |
|--------------------------------|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|
| ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | | | | |
| 0,78 | 5000 | 3920 | | | | |
| Membrana Micro Filtración (MF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 0,83 | 150 | 123,8 | 95,8% | 83,9% | 80,3% |
| P | 0,68 | 4225 | 2883,4 | | | |
| CR | 0,28 | 1750 | 481,4 | | | |
| PR | 0,26 | 1000 | 264,4 | | | |
| P+PR | | | 3147,8 | | | |
| TOTAL | | | 3753,0 | | | |
| Membrana 5kDa | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 1,13 | 290 | 327,9 | 78,9% | 66,2% | 52,2% |
| P | 0,37 | 3800 | 1411,3 | | | |
| CR | 0,26 | 1675 | 441,8 | | | |
| PR | 0,14 | 660 | 94,4 | | | |
| P+PR | | | 1505,7 | | | |
| TOTAL | | | 2275,5 | | | |
| Membrana Ultra Filtración (UF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 0,311 | 130 | 40,5 | 72,6% | 86,3% | 62,7% |
| P | 0,259 | 3150 | 815,0 | | | |
| CR | 0,095 | 1050 | 99,4 | | | |
| PR | 0,114 | 610 | 69,4 | | | |
| P+PR | | | 884,4 | | | |
| TOTAL | | | 1024,3 | | | |
| Membrana Nano Filtración (NF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 0,719 | 160 | 115,0 | 89,3% | 8,0% | 7,1% |
| P | 0,017 | 2400 | 40,8 | | | |
| CR | 0,437 | 1270 | 555,0 | | | |
| PR | 0,057 | 300 | 17,1 | | | |
| P+PR | | | 57,9 | | | |
| TOTAL | | | 727,93 | | | |

Se observa que en cada etapa la cantidad de antocianinas totales recuperadas es distinta a la cantidad de antocianinas iniciales. Esto se puede deber a que parte de las antocianinas pudieron quedar atrapadas en las membranas, en la torta de filtrado o en las tuberías del equipo de filtración. En la membrana de 5 kDa es donde se aprecia más notoriamente este efecto.

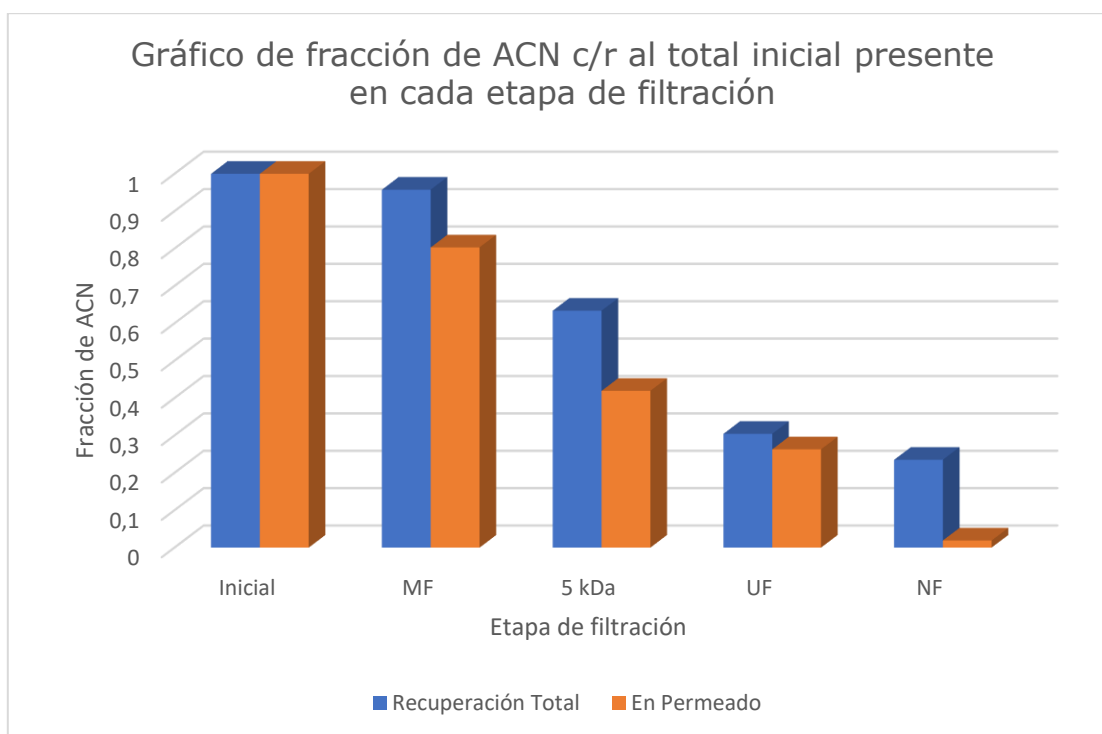


Gráfico 16. Fracción de antocianinas con respecto al total inicial presente en cada etapa de las filtraciones secuenciales.

Luego, es posible apreciar también que de la cantidad de antocianinas recuperadas la mayoría de estas se encuentran en el permeado resultante de la filtración, a excepción de la etapa de nanofiltración, en donde la mayoría de las antocianinas permanecen en el concentrado.

A partir de los datos presentados se calcula el porcentaje de recuperación de antocianinas totales para cada membrana: Hasta la etapa de microfiltración tenemos una recuperación total del 80%, hasta la membrana de 5 kDa del 42%, hasta la ultrafiltración del 26% y en el concentrado de nanofiltración del 21,6%. En la última etapa de nanofiltración la mayoría de las antocianinas (92%) permanecen en el concentrado, lo cual se debe probablemente a que el tamaño de poro de esta etapa es de aproximadamente 400 Da, y que las antocianinas poseen tamaños de entre 480-790 Da.

Tabla 13. Tamaña en Dalton de las antocianinas presentes en el maqui.

| Antocianina | [Da] |
|---|-------------|
| Delphinidin-3-sambubioside-5-glucoside | 758,635 |
| Delphinidin-3,5-diglucoside | 626,52 |
| Cyanidin-3-sambubioside-5-glucoside | 743,644 |
| Cyanidin-3,5-diglucoside | 611,529 |
| Delphinidin-3-sambubioside | 597,502 |
| Delphinidin-3-glucoside | 500,837 |
| Cyanidin-3-sambubioside | 581,503 |
| Cyanidin-3-glucoside | 484,838 |

Posteriormente se estudia de la misma forma el grado de rechazo de las membranas sobre las antocianinas, pero esta vez se analiza el grado de rechazo para cada una de las ocho antocianinas presentes en el jugo de maqui. Los resultados se presentan en la Tabla 14.

A partir de esta tabla se observa que se mantiene el comportamiento observado en el anterior análisis sobre las antocianinas totales. En este caso las antocianinas que tienen un mayor nivel de recuperación hasta la etapa de ultrafiltración corresponden a Delfinidina-3-sam-5-glu con un 18.1%, Delfinidina-3,5-glucoside con un 17.8% y cianidina-3-sam-5-glu con un 17.7%. Todas las antocianinas restantes poseen un porcentaje de recuperación bajo el 20%, siendo la cianidina-3-glu la que presenta menor porcentaje de recuperación (8.7%). Esto se debe probablemente a que las antocianinas de menor tamaño son filtradas en mayor grado a través de la membrana de nanofiltración en comparación a las de mayor tamaño, que son mayormente retenidas.

Tabla 14. Grado de rechazo por membrana para cada antocianina.

| Antocianina | Cantidad Inicial [mg] | MF | | | 5 kDa | | | UF | | | NF | | | Conc. De NF |
|-----------------|-----------------------|------------------------|---------|------|------------------------|--------|------|------------------------|--------|------|------------------------|-------|------|-------------|
| | | Recuperado En permeado | | | Recuperado En permeado | | | Recuperado En permeado | | | Recuperado En permeado | | | |
| del 3-sam-5-glc | 1948,02 | 1834,67 | 1546,42 | [mg] | 1106,93 | 727,77 | [mg] | 525,74 | 453,81 | [mg] | 376,65 | 23,54 | [mg] | 0,181 |
| | | 94,2 | 84,3 | % | 71,6 | 65,7 | % | 72,2 | 86,3 | % | 83,0 | 6,3 | % | |
| | | α | 0,11 | | α | 0,48 | | α | 0,26 | | α | 0,95 | | |
| del diglc | 677,36 | 683,56 | 563,06 | [mg] | 423,41 | 285,82 | [mg] | 188,26 | 162,72 | [mg] | 135,37 | 14,61 | [mg] | 0,178 |
| | | 100,9 | 82,4 | % | 75,2 | 67,5 | % | 65,9 | 86,4 | % | 83,2 | 10,8 | % | |
| | | α | 0,14 | | α | 0,40 | | α | 0,32 | | α | 0,91 | | |
| cya 3-sam-5-glc | 785,11 | 750,91 | 631,39 | [mg] | 461,99 | 307,96 | [mg] | 213,45 | 184,38 | [mg] | 150,48 | 11,60 | [mg] | 0,177 |
| + | | 95,6 | 84,1 | % | 73,2 | 66,7 | % | 69,3 | 86,4 | % | 81,6 | 7,7 | % | |
| cya diglc | | α | 0,13 | | α | 0,44 | | α | 0,29 | | α | 0,94 | | |
| del 3-sam | 214,29 | 198,33 | 166,49 | [mg] | 123,93 | 82,66 | [mg] | 45,00 | 39,14 | [mg] | 32,13 | 3,14 | [mg] | 0,135 |
| | | 92,6 | 83,9 | % | 74,4 | 66,7 | % | 54,4 | 87,0 | % | 82,1 | 9,8 | % | |
| | | α | 0,15 | | α | 0,44 | | α | 0,44 | | α | 0,91 | | |
| del 3-glc | 193,35 | 187,01 | 157,18 | [mg] | 104,39 | 66,69 | [mg] | 34,25 | 29,47 | [mg] | 22,30 | 4,32 | [mg] | 0,093 |
| | | 96,7 | 84,1 | % | 66,4 | 63,9 | % | 51,4 | 86,0 | % | 75,7 | 19,4 | % | |
| | | α | 0,20 | | α | 0,48 | | α | 0,48 | | α | 0,84 | | |
| cya 3-sam | 55,42 | 61,05 | 52,38 | [mg] | 31,88 | 20,82 | [mg] | 10,91 | 9,18 | [mg] | 6,73 | 0,94 | [mg] | 0,104 |
| | | 110,2 | 85,8 | % | 60,9 | 65,3 | % | 52,4 | 84,1 | % | 73,3 | 14,0 | % | |
| | | α | 0,03 | | α | 0,53 | | α | 0,49 | | α | 0,88 | | |
| cya 3-glc | 46,02 | 37,47 | 30,90 | [mg] | 22,94 | 14,01 | [mg] | 6,70 | 5,71 | [mg] | 4,69 | 0,68 | [mg] | 0,087 |
| | | 81,4 | 82,5 | % | 74,2 | 61,1 | % | 47,8 | 85,2 | % | 82,1 | 14,5 | % | |
| | | α | 0,31 | | α | 0,42 | | α | 0,57 | | α | 0,88 | | |

Tabla 15. Comparación del perfil de antocianinas del maqui, del extracto obtenido en el CeBiB y del extracto obtenido por MNL.

| Antocianina | CeBiB (%) | MNL (%) | Maqui (%) |
|------------------------------------|------------------|----------------|------------------|
| del 3-sam-5-glc | 57,62% | 37,63% | 54,93% |
| del diglc | 9,91% | 18,25% | 10,36% |
| cya 3-sam-5-glc + cya diglc | 18,63% | 20,29% | 18,45% |
| del 3-sam | 6,69% | 7,23% | 7,10% |
| del 3-glc | 4,52% | 9,80% | 5,99% |
| cya 3-sam | 1,52% | 3,32% | 1,79% |
| cya 3-glc | 1,09% | 3,48% | 1,38% |
| Total | 100% | 100% | 100% |

En cuanto al grado de rechazo de azúcares, en la Tabla 16 se presentan los resultados para la glucosa y fructosa presente en el jugo de maqui.

Tabla 16. Grado de rechazo por membrana para la Glucosa y Fructosa.

| Azúcar | Cantidad Inicial [mg] | MF | | | 5 kDa | | |
|-----------------|------------------------------|------------|-------------|------|--------------|-------------|------|
| | | Recuperado | En permeado | | Recuperado | En permeado | |
| Glucosa | 2,70 | 2,74 | 2,38 | [mg] | 2,03 | 1,71 | [mg] |
| | | 101,6 | 86,8 | % | 89,1 | 84,2 | % |
| Fructosa | 0,70 | 0,64 | 0,59 | [mg] | 0,51 | 0,46 | [mg] |
| | | 92,1 | 91,8 | % | 86,7 | 90,5 | % |

| Azúcar | UF | | | NF | | |
|-----------------|------------|-------------|------|------------|-------------|------|
| | Recuperado | En permeado | | Recuperado | En permeado | |
| Glucosa | 0,73 | 0,63 | [mg] | 0,52 | 0,24 | [mg] |
| | 43,6 | 86,3 | % | 86,3 | 46,4 | % |
| Fructosa | 0,86 | 0,76 | [mg] | 0,66 | 0,29 | [mg] |
| | 206,2 | 88,3 | % | 91,3 | 44,5 | % |

Se observa que al igual que con las antocianinas hay una diferencia entre la cantidad total de azúcares recuperados y la cantidad inicial presente en la solución. De la misma forma, la mayoría de los azúcares se rescatan en el permeado, a excepción de la etapa de nanofiltración en donde la mayoría de los azúcares permanece en el concentrado, sin embargo, a diferencia de las antocianinas en esta última etapa el 45% aproximadamente de glucosa y fructosa se encuentran en el permeado a diferencia del 8% en las antocianinas, esto probablemente se debe al tamaño de las moléculas ya que la glucosa y fructosa son moléculas más pequeñas que las antocianinas, y pasan a través del poro de nanofiltración con mayor facilidad. Además, se observa en la etapa de ultrafiltración una baja recuperación de glucosa (43,6%) y una recuperación del 206% de fructosa, resultados inesperados y que probablemente se deben a errores de medición.

En cuanto a la segunda parte de los resultados, se presentan a continuación los resultados correspondientes a las curvas de velocidad de filtrado y variación en concentración de antocianinas, tanto en concentrado, permeado y concentración de azúcares.

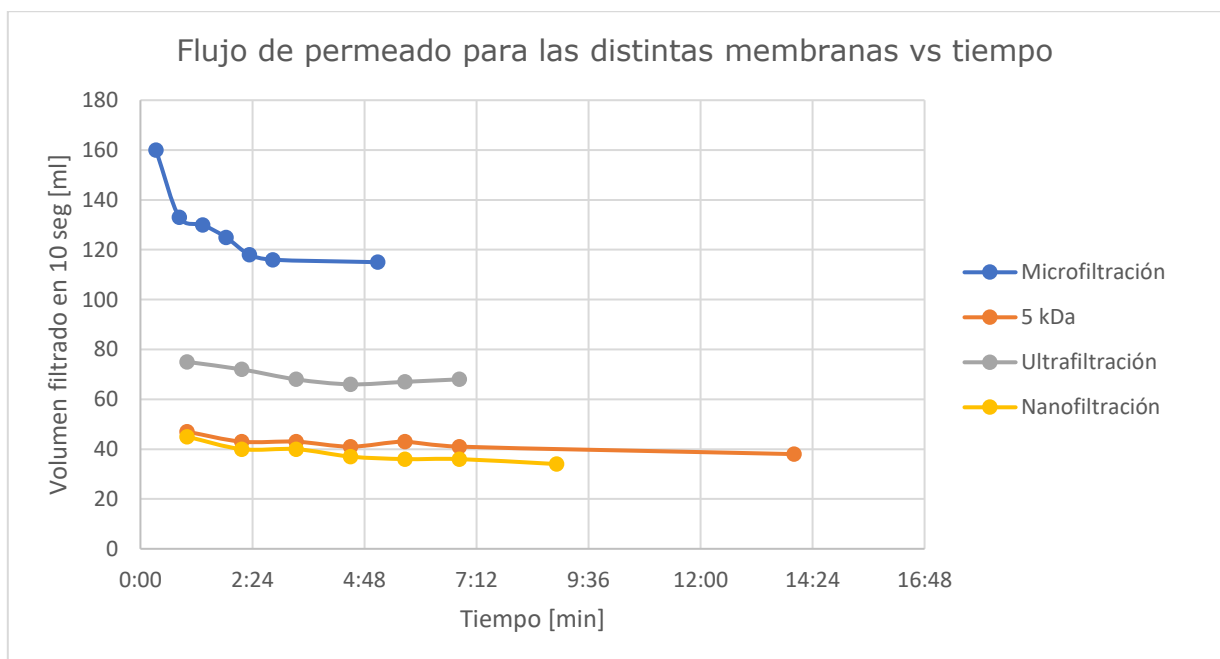


Gráfico 17. Velocidad de filtrado para las etapas de microfiltración, 5 kDa, ultrafiltración y nanofiltración.

Se observa del Gráfico 17 que en los primeros tiempos la velocidad de filtrado es mayor y que esta va disminuyendo a medida que va transcurriendo la filtración. Esto se puede deber a que la torta de filtrado hace cada vez más difícil el paso de moléculas a través de la membrana.

Se observa además que los mayores volúmenes de filtrado se dan en las etapas de microfiltración y ultrafiltración. Esto se contrapone a la idea de que a menor tamaño de poro menor debiese ser el flujo filtrado. Es por esto que se asume que dicho fenómeno se debe a que la solución de maqui es rica en macromoléculas de tamaño sobre 5 kDa, por lo que la membrana se satura rápidamente con el paso de la solución, y como consecuencia disminuye el volumen de filtrado. Asimismo, al quedar retenidas en esta etapa, a la etapa posterior de ultrafiltración ingresa una solución libre de macromoléculas entre 1 y 5 kDa, aumentando la velocidad de filtración.

Se observa del Gráfico 18 al Gráfico 21 que la concentración de antocianinas, tanto en los volúmenes permeados cada 10 segundos como en el concentrado, va el aumento en todas las etapas de filtración, lo cual concuerda con los resultados esperados.

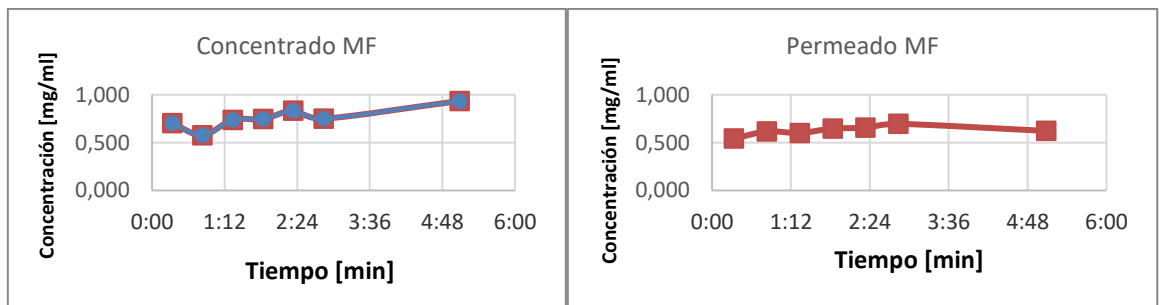


Gráfico 18. Concentración de antocianinas en el concentrado (izquierda) y en el volumen generado cada 10 segundos de permeado (derecha) a medida que transcurre la microfiltración.

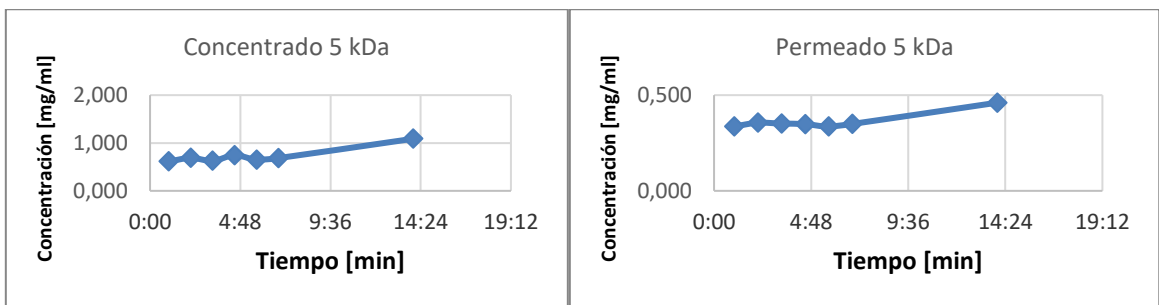


Gráfico 19. Concentración de antocianinas en el concentrado (izquierda) y en el volumen generado cada 10 segundos de permeado (derecha) a medida que transcurre la filtración con 5 kDa.

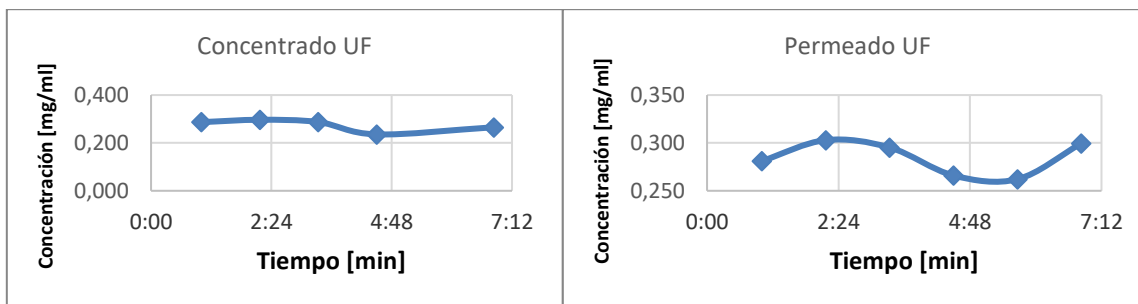


Gráfico 20. Concentración de antocianinas en el concentrado (izquierda) y en el volumen generado cada 10 segundos de permeado (derecha) a medida que transcurre la ultrafiltración.

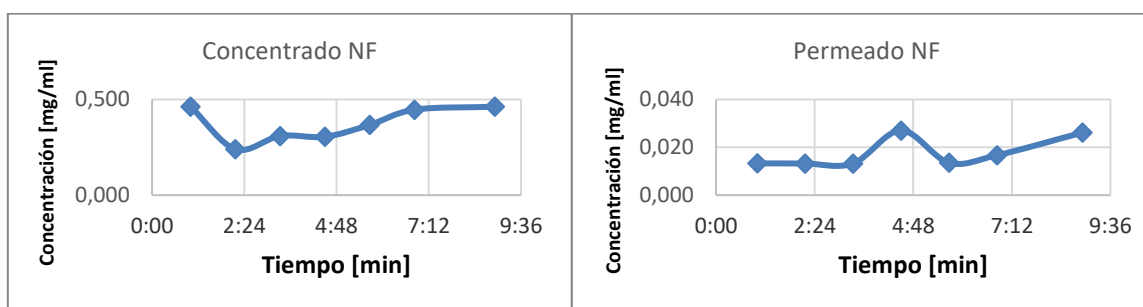


Gráfico 21. Concentración de antocianinas en el concentrado (izquierda) y en el volumen generado cada 10 segundos de permeado (derecha) a medida que transcurre la nanofiltración.

Del Gráfico 22 al Gráfico 25 se presentan las concentraciones de glucosa y fructosa medidas en el concentrado y en los volúmenes permeados cada 10 segundos para cada etapa de filtración. Se observa que se sigue la misma lógica que para las antocianinas, la concentración en concentrado y permeado tiende a aumentar, aunque en estos análisis el aumento es menor que en los análisis hechos a antocianinas.

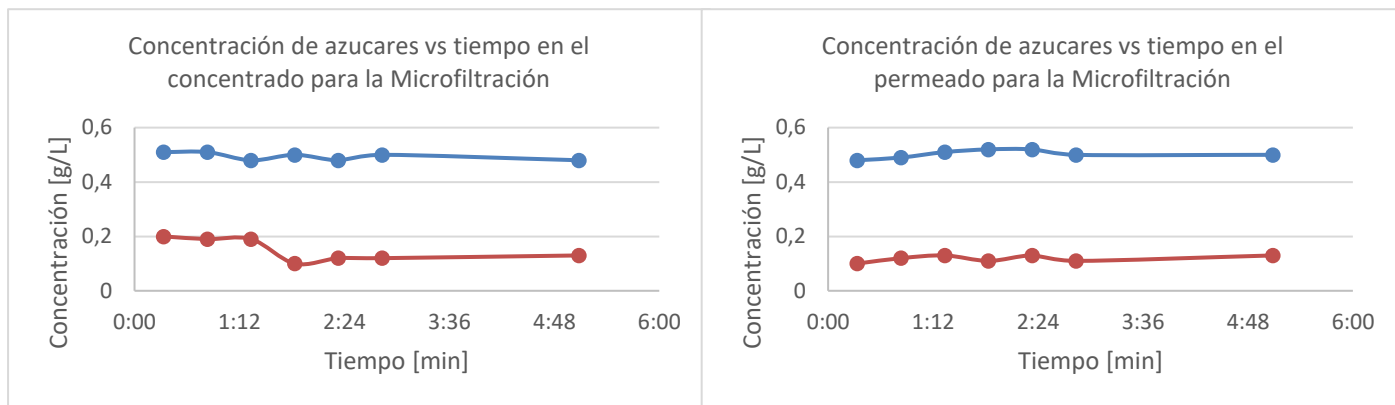
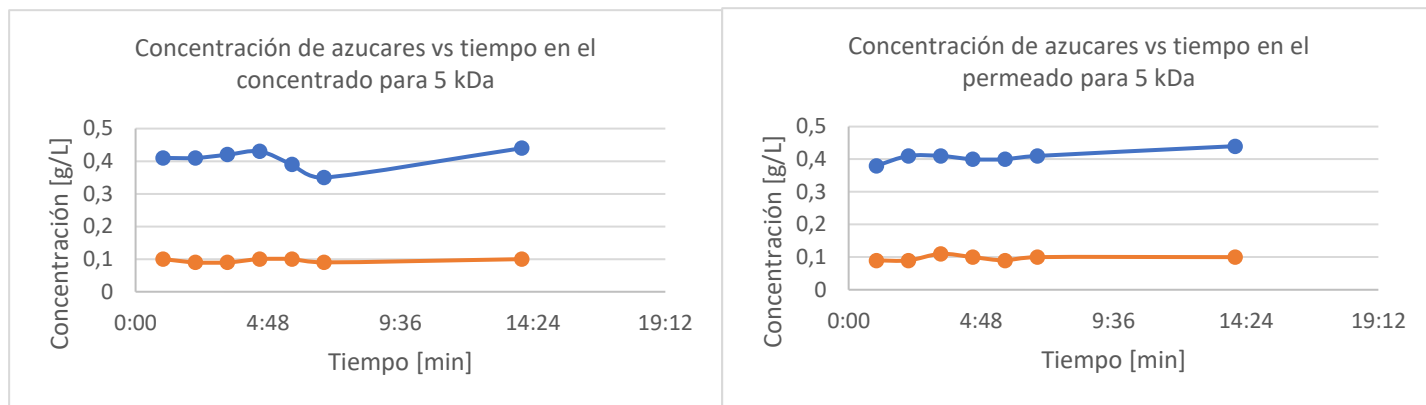


Gráfico 22. Concentración de Glucosa (Azul) y Fructosa (Naranja) en los distintos tiempos tomados cada 10 segundos en el concentrado (izquierda) y permeado (derecha) para la etapa de microfiltración.



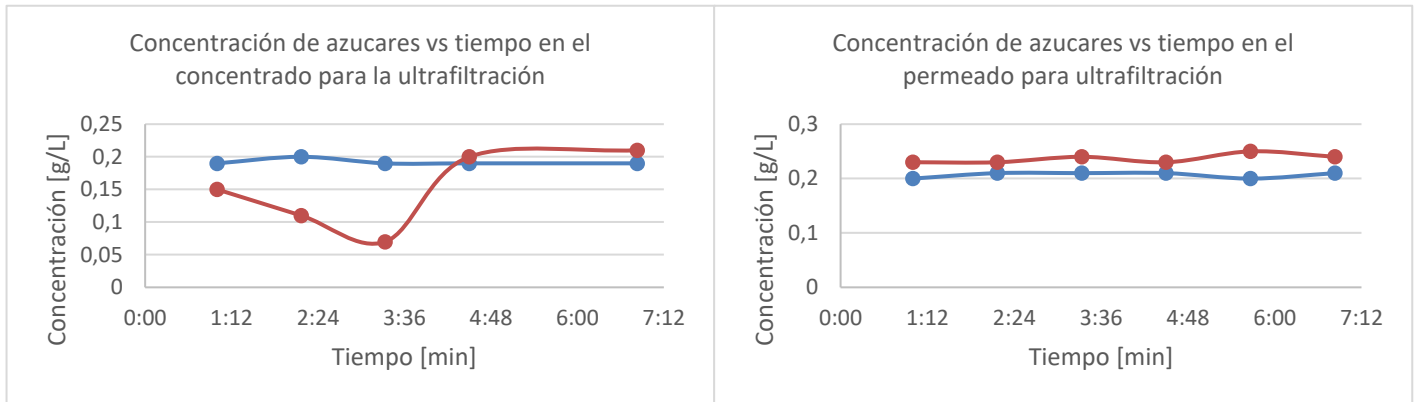


Gráfico 24. Concentración de Glucosa (Azul) y Fructosa (Naranja) en los distintos tiempos tomados cada 10 segundos en el concentrado (izquierda) y permeado (derecha) para la etapa de ultrafiltración.

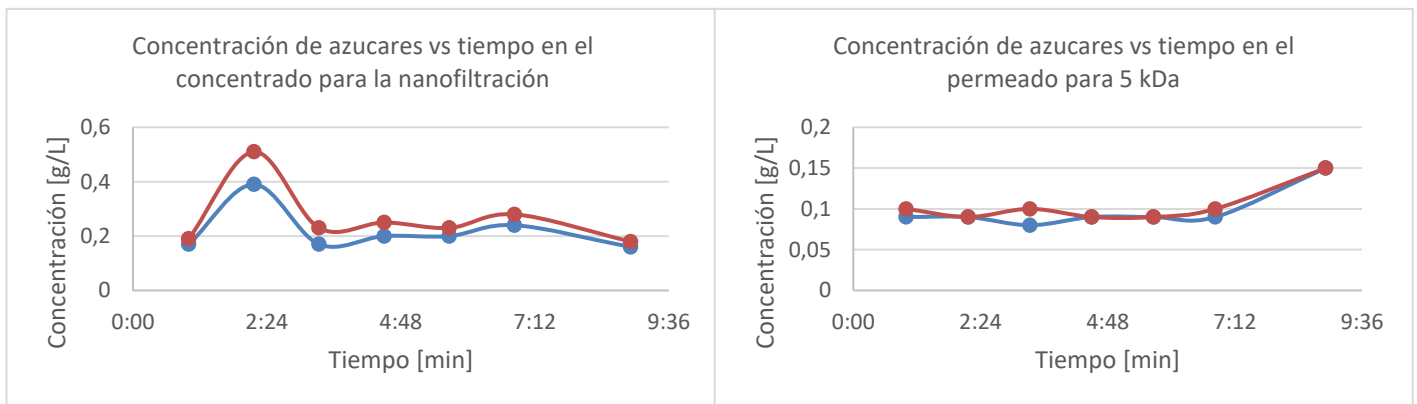


Gráfico 25. Concentración de Glucosa (Azul) y Fructosa (Naranja) en los distintos tiempos tomados cada 10 segundos en el concentrado (izquierda) y permeado (derecha) para la etapa de nanofiltración.

4.5 Proceso completo

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 17.

Tabla 17. Resumen de los resultados obtenidos en el proceso completo.

| Contenido inicial | | | | | | |
|--------------------------------|--------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|------------|
| ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | | | | |
| 1,71 | 2100 | 3599,4 | | | | |
| 1,35 | 2100 | 2839,2 | | | | |
| Membrana Micro Filtración (MF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 0,62 | 320 | 197,8 | 91,3% | 79,5% | 72,6% |
| P | 0,51 | 3900 | 1992,9 | | | |
| CR | 0,19 | 1800 | 334,8 | | | |
| PR | 0,14 | 500 | 68,0 | | | |
| P+PR | | | 2060,9 | | | |
| TOTAL | | | 2593,5 | | | |
| Membrana 5kDa | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 1,10 | 420 | 459,9 | 102,8% | 57,0% | 58,5% |
| P | 0,29 | 3850 | 1097,3 | | | |
| CR | 0,23 | 2000 | 452,0 | | | |
| PR | 0,31 | 350 | 109,2 | | | |
| P+PR | | | 1206,5 | | | |
| TOTAL | | | 2118,4 | | | |
| Membrana Ultra Filtración (UF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 0,26 | 200 | 51,2 | 90,2% | 73,4% | 66,1% |
| P | 0,24 | 3200 | 752,0 | | | |
| CR | 0,22 | 1100 | 238,7 | | | |
| PR | 0,12 | 400 | 46,0 | | | |
| P+PR | | | 798,0 | | | |
| TOTAL | | | 1087,9 | | | |
| Membrana Nano Filtración (NF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN concentrado | Eficiencia |
| C | 0,67 | 270 | 181,4 | 123,3% | 92,6% | 114,2% |
| P | 0,02 | 2800 | 64,4 | | | |
| CR | 0,37 | 2000 | 730,0 | | | |
| PR | 0,02 | 400 | 8,4 | | | |
| C+CR | | | 911,4 | | | |
| TOTAL | | | 984,2 | | | |

La mayoría de los resultados obtenidos calzan con lo esperado. Los procesos de filtraciones secuenciales tienen una eficiencia de 32,1% en cuanto a la recuperación de antocianinas en el concentrado de nanofiltración.

Se aprecia que la menor eficiencia ocurre en la etapa de 5 kDa con un 58,7% de antocianinas recuperadas, por otro lado, esta etapa es la que mayor tiempo demora en filtrar. Esto se puede deber a que esta membrana atrapa gran cantidad de partículas de tamaño superior a 5 kDa (pero menor a 0.4 μ m, correspondiente a la etapa de MF), generando una capa espesa de residuos sólidos en la pared de la membrana, dificultando así que las antocianinas se filtren correctamente al quedar atrapadas en esta torta y al mismo tiempo aumentando considerablemente el tiempo de filtrado.

Se observa también que la eficiencia en la fermentación es del 78,8%, bastante por debajo de lo esperado, ya que en los experimentos de fermentación la tasa de degradación de antocianinas no era inferior al 10%. En cuanto a los resultados de liofilización, estos se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18. Resultados de liofilización.

| Muestra | | Peso [mg] | Concentración [mg/ml] | En 30 [ml] | % en peso de ACN |
|---------|----|-----------|-----------------------|------------|------------------|
| NF | C | 225 | 0,672 | 20,160 | 8,960 |
| NF | CR | 110 | 0,365 | 10,950 | 9,955 |

Al liofilizar 30 ml de concentrado de nanofiltración se obtuvo un polvo seco de 225 mg de peso, de los cuales el 9% de este (20,16 mg) corresponden a antocianinas. Además, también se liofilizó el concentrado residual (concentrado remanente que queda en las tuberías del equipo) de la misma forma que la muestra de concentrado, generando un polvo seco de 110 mg, de los cuales el 10% (10,95 mg) corresponden a antocianinas.

4.6 Modificaciones al proceso lineal

Los resultados obtenidos utilizando las modificaciones indicadas se presentan en la Tabla 19 y Tabla 20.

Tabla 19. Resultados obtenidos con las modificaciones realizadas al proceso completo.

| Contenido inicial | | | | | | |
|--------------------------------|--------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|------------|
| ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | | | | |
| 0,90 | 2000 | 1808 | | | | |
| 1,01 | 4200 | 4242 | | | | |
| Membrana Micro Filtración (MF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 0,81 | 180 | 145,3 | 91,1% | 85,4% | 77,9% |
| P | 0,81 | 3800 | 3078,0 | | | |
| CR | 0,40 | 1050 | 417,9 | | | |
| PR | 0,13 | 1700 | 224,4 | | | |
| P+PR | | | 3302,4 | | | |
| TOTAL | | | 3865,6 | | | |
| Membrana 10kDa | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 0,51 | 100 | 51,2 | 95,3% | 85,9% | 81,8% |
| P | 0,53 | 4800 | 2558,4 | | | |
| CR | 0,17 | 2300 | 393,3 | | | |
| PR | 0,29 | 500 | 144,0 | | | |
| P+PR | | | 2702,4 | | | |
| TOTAL | | | 3146,9 | | | |
| Membrana Ultra Filtración (UF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 0,48 | 70 | 33,7 | 94,8% | 86,3% | 81,8% |
| P | 0,45 | 4700 | 2100,9 | | | |
| CR | 0,23 | 1400 | 317,8 | | | |
| PR | 0,27 | 400 | 109,6 | | | |
| P+PR | | | 2210,5 | | | |
| TOTAL | | | 2562,0 | | | |
| Membrana Nano Filtración (NF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN concentrado | Eficiencia |
| C | 1,41 | 820 | 1154,6 | 91,9% | 97,3% | 89,4% |
| P | 0,03 | 1950 | 52,7 | | | |
| CR | 0,82 | 1000 | 822,0 | | | |
| PR | 0,02 | 100 | 2,1 | | | |
| C+CR | | | 1976,6 | | | |
| TOTAL | | | 2031,3 | | | |

En primer lugar, se observa que la concentración de antocianinas en el jugo antes y después de la fermentación no se condicen con lo esperado ya que post fermentación hay una mayor cantidad de antocianinas presentes en el jugo que pre fermentación. Esto se debe probablemente a un error de medición en la muestra del jugo pre fermentado, ya que en el jugo post fermentación la cantidad de antocianinas se condice con lo esperado, dado que este jugo es producido a partir de fruta de buena calidad (1.4%) se esperaba que la cantidad de antocianinas fuese cercana al doble en comparación al jugo post fermentación producido con fruta de baja calidad (0.7%) (4243 mg de ACN en el jugo post fermentación producido a partir de fruta de buena calidad versus 2839 mg de ACN en el jugo post fermentación producido a partir de fruta de baja calidad).

En segundo lugar, se observa el efecto del cambio de membranas, tanto en la recuperación total como en el porcentaje presente en el permeado. En la membrana de 10 kDa estos parámetros corresponden a 95% y 86% respectivamente, concluyendo con una eficiencia de 81,8%, muy por sobre el valor obtenido en las filtraciones con la membrana de 5 kDa (58.7%), además el tiempo requerido para filtrar a través de esta membrana también disminuyó (data not shown), y aunque se esperaba una disminución en la eficiencia de filtración en la membrana de ultrafiltración (ya que ahora se genera una torta más grande en la superficie de esta), ocurre lo contrario, la eficiencia de esta etapa aumentó, sobre todo en cuanto al porcentaje de retención en permeado (86%), mientras que con respecto al tiempo de filtrado en esta membrana, este se mantuvo relativamente constante (data not shown). Por otro lado, utilizando la membrana de osmosis reversa (OR) se observa que la recuperación total se mantiene en alta (92%), mientras que la recuperación en el permeado aumento marginalmente (97.3%) en comparación a la membrana de nanofiltración, obteniéndose así una eficiencia total en el proceso de filtraciones secuenciales del 46,6%. Estos resultados van de acuerdo a lo esperado, el efecto de disminuir la carga de filtrado en una sola membrana (5 kDa) para producir que el sistema funcione de forma más pareja y de reducir el último tamaño de poro de la última etapa de filtración para conseguir una mayor cantidad de retención en el concentrado de la osmosis reversa. Finalmente recalcar que el valor en la eficiencia de la microfiltración permanece relativamente constante.

Tabla 20. Resultados de liofilizaciones en el proceso modificado.

| Muestra | | Peso [mg] | Concentración [mg/ml] | En 30 [ml] | % en peso de ACN |
|---------|----|-----------|-----------------------|------------|------------------|
| OR | C | 1165 | 0,829 | 24,87 | 2,13 |
| OR | CR | 535 | 0,654 | 19,62 | 3,67 |

En cuanto a los resultados obtenidos analizando las fracciones liofilizadas se observa que, si bien la concentración de antocianinas subió tanto en el concentrado como en el concentrado residual de OR, también lo hizo en peso del polvo seco, dando como resultado una considerable baja en los porcentajes de pureza del producto final (2.13% y 3.67% respectivamente). Esto se puede deber a que al disminuir el tamaño del poro de la última membrana no solamente quedan retenidas una mayor cantidad de antocianinas, sino también una mayor cantidad de elementos inespecíficos que contaminan el producto seco final, los cuales probablemente poseen un tamaño de entre 200 y 500 Dalton, ya que la membrana de nanofiltración si filtra estos elementos, aumentando la pureza.

En este punto se discute sobre el *trade off* existente entre el porcentaje de recuperación total de antocianinas y el porcentaje de pureza de estas en el producto seco final. Si bien cada membrana lleva asociada un porcentaje de pérdida en la recuperación de antocianinas, estas también colaboran en cuanto a la eliminación de elementos indeseados en el producto final. Como se observa en los resultados, la eliminación de alguna de estas etapas de filtración, con el fin de aumentar el porcentaje de recuperación, tendría como consecuencia la sobrecarga de la membrana siguiente en la secuencia de filtraciones, aumentando el tiempo de filtrado en esta y además disminuyendo la eficiencia de la misma, no siendo viable a lo largo del tiempo. En teoría la mejor elección de membranas sería utilizar una membrana de microfiltración del menor tamaño de poro posible (0.1 μm), una primera membrana de ultrafiltración (10 kDa), y dos membranas finales que acoten lo más posible los tamaños de las antocianinas más grandes y más pequeñas (760 Da máximo y 480 Da mínimo), para lo cual las membranas de ultrafiltración (1 kDa) y nanofiltración (500 Da) deberían funcionar bien.

4.7 Reciclos

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 21, Tabla 22, Tabla 23 y Tabla 24.

Tabla 21. Resultados obtenidos de las filtraciones secuenciales del jugo inicial.

| Contenido inicial | | | | | | |
|--------------------------------|--------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|------------|
| ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | | | | |
| 6,23 | 2000 | 12450,0 | | | | |
| 2,02 | 2000 | 4048,0 | | | | |
| Membrana Micro Filtración (MF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 1,32 | 270 | 356,9 | 122,8% | 85,6% | 105,1% |
| P | 1,12 | 3450 | 3857,1 | | | |
| CR | 0,36 | 1000 | 361,0 | | | |
| PR | 0,50 | 800 | 396,8 | | | |
| P+PR | | | 4253,9 | | | |
| TOTAL | | | 4971,8 | | | |
| Membrana 10kDa | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 1,39 | 250 | 348,5 | 103,5% | 68,9% | 71,3% |
| P | 0,76 | 3700 | 2793,5 | | | |
| CR | 0,73 | 1400 | 1020,6 | | | |
| PR | 0,48 | 500 | 240,5 | | | |
| P+PR | | | 3034,0 | | | |
| TOTAL | | | 4403,1 | | | |
| Membrana Ultra Filtración (UF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 0,74 | 300 | 220,8 | 111,1% | 82,2% | 91,3% |
| P | 0,76 | 3500 | 2649,5 | | | |
| CR | 0,38 | 1000 | 379,0 | | | |
| PR | 0,24 | 500 | 120,5 | | | |
| P+PR | | | 2770,0 | | | |
| TOTAL | | | 3369,8 | | | |
| Membrana Nano Filtración (NF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN concentrado | Eficiencia |
| C | 0,73 | 340 | 247,2 | 86,7% | 74,3% | 64,4% |
| P | 0,50 | 3400 | 1713,6 | | | |
| CR | 0,37 | 1000 | 371,0 | | | |
| PR | 0,28 | 250 | 70,8 | | | |
| P+PR | | | 1784,4 | | | |
| TOTAL | | | 2402,5 | | | |
| Membrana Osmosis Reversa (OR) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN concentrado | Eficiencia |
| C | 1,89 | 370 | 698,6 | 85,6% | 95,8% | 82,0% |
| P | 0,02 | 3600 | 61,2 | | | |
| CR | 0,64 | 1200 | 764,4 | | | |
| PR | 0,02 | 150 | 2,7 | | | |
| C+CR | | | 1463,0 | | | |
| TOTAL | | | 1526,9 | | | |

Tabla 22. Resultados obtenidos de las filtraciones secuenciales del jugo producido a partir de los concentrados rechazados en cada etapa del proceso anterior.

| Contenido inicial | | | | | | |
|--------------------------------|--------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|------------|
| ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | | | | |
| 0,55 | 5560 | 3052,2 | | | | |
| Membrana Micro Filtración (MF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 0,53 | 465 | 246,4 | 101,5% | 88,6% | 89,9% |
| P | 0,53 | 5030 | 2676,1 | | | |
| CR | 0,13 | 800 | 107,8 | | | |
| PR | 0,14 | 500 | 68,0 | | | |
| P+PR | | | 2744,2 | | | |
| TOTAL | | | 3098,3 | | | |
| Membrana 10kDa | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 0,45 | 290 | 130,3 | 90,7% | 87,8% | 79,7% |
| P | 0,42 | 4950 | 2088,5 | | | |
| CR | 0,17 | 1000 | 172,3 | | | |
| PR | 0,28 | 350 | 98,6 | | | |
| P+PR | | | 2187,1 | | | |
| TOTAL | | | 2489,8 | | | |
| Membrana Ultra Filtración (UF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN permeado | Eficiencia |
| C | 0,43 | 375 | 161,4 | 110,0% | 85,2% | 93,7% |
| P | 0,42 | 4700 | 1973,7 | | | |
| CR | 0,24 | 800 | 195,8 | | | |
| PR | 0,22 | 350 | 75,3 | | | |
| P+PR | | | 2048,9 | | | |
| TOTAL | | | 2406,2 | | | |
| Membrana Nano Filtración (NF) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN concentrado | Eficiencia |
| C | 0,57 | 290 | 164,9 | 84,1% | 78,2% | 65,7% |
| P | 0,28 | 4550 | 1284,9 | | | |
| CR | 0,21 | 1000 | 211,3 | | | |
| PR | 0,18 | 350 | 61,3 | | | |
| P+PR | | | 1346,2 | | | |
| TOTAL | | | 1722,4 | | | |
| Membrana Osmosis Reversa (OR) | | | | | | |
| Fase | ACN [mg/ml] | Volumen [ml] | ACN Total [mg] | %Rec ACN total | % ACN concentrado | Eficiencia |
| C | 1,44 | 310 | 447,6 | 88,9% | 96,0% | 85,3% |
| P | 0,01 | 4600 | 46,0 | | | |
| CR | 0,58 | 1200 | 700,6 | | | |
| PR | 0,03 | 80 | 2,1 | | | |
| C+CR | | | 1148,3 | | | |
| TOTAL | | | 1196,4 | | | |

Tabla 23. Liofilizaciones de las cuatro fracciones correspondientes a nanofiltración y OR para las filtraciones realizadas con el jugo inicial.

| Jugo Inicial | | | | |
|--------------|-----------|---------------|------------|------------------|
| Muestra | Peso [mg] | Concentración | En 10 [ml] | % en peso de ACN |
| NF C | 320 | 0,727 | 7,270 | 2,272 |
| NF P | 150 | 0,504 | 5,040 | 3,360 |
| NF CR | 330 | 0,371 | 3,711 | 1,124 |
| NF PR | 250 | 0,283 | 2,830 | 1,132 |
| OR C | 430 | 1,888 | 18,876 | 4,390 |
| OR P | 230 | 0,017 | 0,169 | 0,074 |
| OR CR | 350 | 0,637 | 6,365 | 1,819 |
| OR PR | 220 | 0,018 | 0,181 | 0,082 |

Tabla 24. Liofilizaciones de las cuatro fracciones correspondientes a nanofiltración y OR para las filtraciones realizadas con el jugo de reciclo.

| Reciclos | | | | |
|----------|-----------|---------------|------------|------------------|
| Muestra | Peso [mg] | Concentración | En 10 [ml] | % en peso de ACN |
| NF C | 250 | 0,568 | 5,685 | 2,274 |
| NF P | 100 | 0,282 | 2,824 | 2,824 |
| NF CR | 140 | 0,211 | 2,113 | 1,509 |
| NF PR | 230 | 0,175 | 1,752 | 0,762 |
| OR C | 450 | 1,444 | 14,439 | 3,209 |
| OR P | 120 | 0,010 | 0,100 | 0,083 |
| OR CR | 230 | 0,584 | 5,839 | 2,539 |
| OR PR | 230 | 0,026 | 0,263 | 0,114 |

De los resultados obtenidos se observa en primer lugar la gran variación en la cantidad de antocianinas entre el jugo antes y después de fermentar. Se esperaban pérdidas no mayores al 10%, pero en este caso la cantidad de redujo de 12500 mg a 4000 mg (68% de pérdida). Esta gran variabilidad en comparación a los resultados obtenidos de fermentaciones anteriores se puede deber a que el *setting* utilizado para realizar las fermentaciones, en general, no mantiene un control muy estricto de las variables de operación. Por otro lado, es posible que en el centrifugado post fermentación se pierda un porcentaje de antocianinas igualmente. En los experimentos de fermentación de la sección 4.3, pasadas las 14 horas, se mide la concentración de antocianinas sin eliminar levaduras, obteniéndose una degradación menor al 10%, mientras que en este procedimiento se mide concentración de antocianinas posterior a este centrifugado, obteniéndose porcentajes de pérdida por sobre el 20%. Este pellet de levaduras formado es de un color morado intenso, por lo que probablemente posee gran cantidad de antocianinas absorbidas.

En segundo lugar, se aprecian los porcentajes de recuperación de cada etapa, tanto para el primer proceso como para el proceso con reciclo. En ambos experimentos las eficiencias de cada etapa no presentan mayor variación entre el jugo original y el jugo de reciclo, dando a entender así que independiente del volumen y la concentración inicial de antocianinas las eficiencias de las membranas permanecen constantes. Además, para ambos procesos, los porcentajes de cada etapa de filtración se mantienen dentro de los rangos esperados de acuerdo a los resultados obtenidos previamente, resultando así una recuperación de antocianinas del 36.1% para el primer proceso, del 37.6% para el proceso de reciclo y del 64.5% para ambos juntos. Se observa, además, tanto para el primer proceso como para el proceso de reciclo, el erróneo funcionamiento en la membrana de nanofiltración, dejando pasar a la fracción de permeado cerca del 75% de las antocianinas.

Finalmente, al analizar los resultados obtenidos de liofilización se aprecia que la mayor pureza de producto seco se obtiene de liofilizar la fracción de concentrado de OR en ambos procesos, con un mayor porcentaje en el primer proceso (4.89%) en comparación al proceso con reciclo (3.2%). Estos resultados se explican en base a un efecto combinado entre las membranas de OR y nanofiltración: La membrana de OR es la que retiene mayor cantidad de antocianinas en el concentrado, mientras que la membrana de nanofiltración, aun funcionando de forma errónea, logra retener un porcentaje de contaminantes, aumentando de esta forma la pureza obtenida. Que en el primer proceso la pureza sea mayor que en el segundo proceso se puede deber a que en el primer proceso hay mayor cantidad de antocianinas en comparación a los contaminantes presentes, mientras que en el segundo proceso esta proporción debe ser probablemente menor (relación [mg de ACN]/[mg de contaminantes] en el jugo de reciclo es menor que en el jugo inicial).

4.8 Diseño de la configuración del proceso en función de la composición final del extracto de maqui requerida

Con los resultados obtenidos de los experimentos previamente mencionados, fue posible determinar los principales parámetros de operación: Etapas y condiciones para el pretratamiento del maqui, coeficientes de rechazo de las membranas en la filtración secuencial, flujo y presión de operación.

Con esta información, se tienen los datos necesarios para utilizar ecuaciones de diseño complementadas con modelamiento matemático con el fin de determinar la configuración óptima del sistema de membranas para obtener un producto seco bajo las especificaciones deseadas, en particular, se determinó un producto final con una concentración de 35% de antocianinas, considerando una producción de 5000 Kg de producto al año.

El proceso de filtración secuencial resultante se muestra en la Figura 16. Como se observa, el jugo de maqui ingresa, de manera continua, a una etapa de microfiltración con una serie de membranas (preliminarmente 4) de tamaño de poro de 0,2 μm . El concentrado de esta etapa está constituido por solutos de alto peso molecular, que son desechados del sistema. El permeado, por su parte, pasa a la etapa de ultrafiltración compuesta por una serie de 4 membranas de 10 kDa de tamaño de poro. El concentrado de esta etapa se recircula a la etapa de MF y el permeado pasa a una nueva etapa de UF, con una membrana de 1 kDa. Luego de la UF, el permeado sigue hacia una serie de filtraciones con membranas de nanofiltración de 500 Da. El concentrado se recircula a la fase de UF y el permeado pasa a una concentración por osmosis reversa, donde se obtiene el extracto rico en antocianinas y una solución salina como subproducto. El proceso considera purgas en distintas etapas para evitar la concentración de moléculas en el sistema.

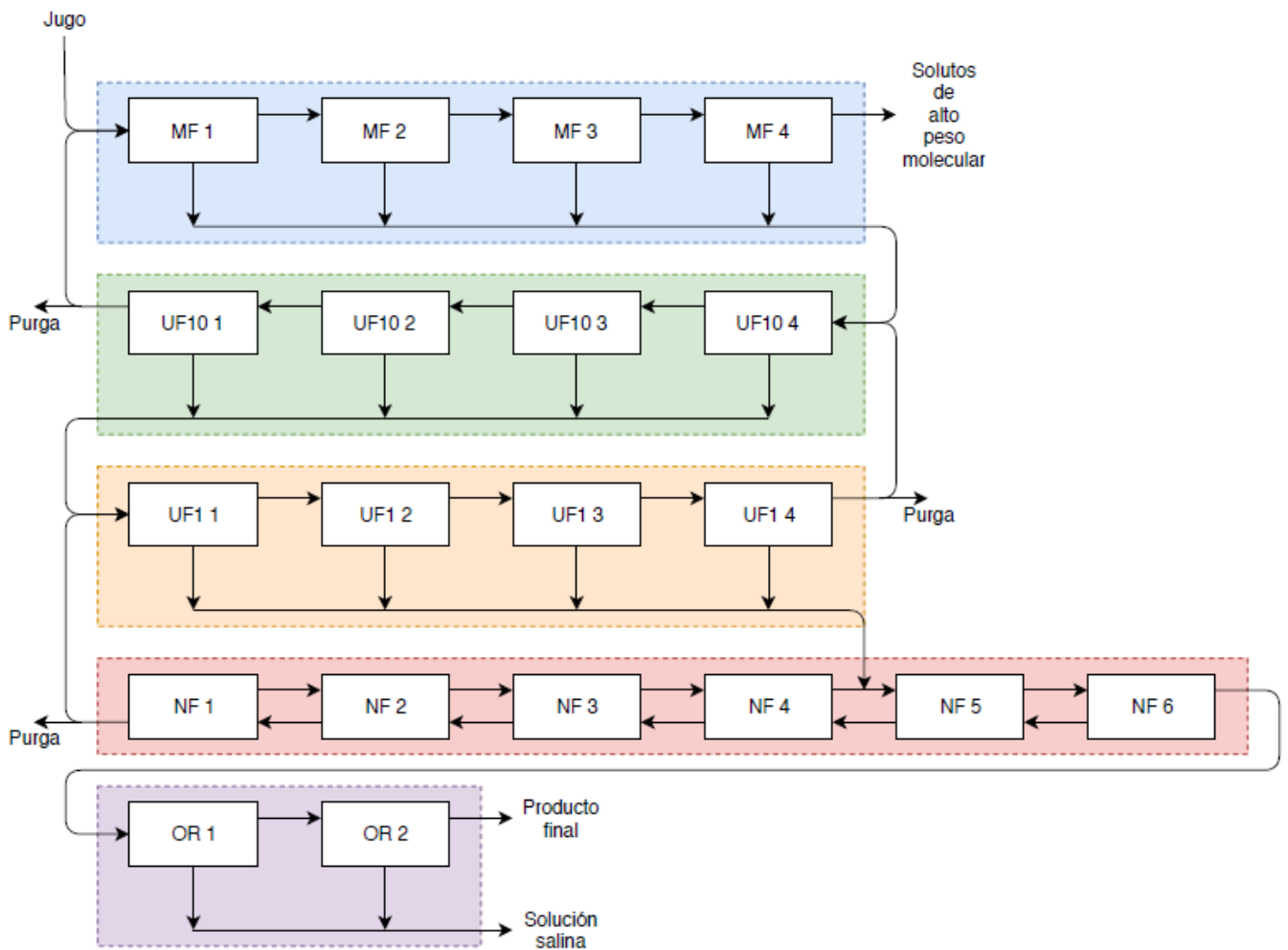


Figura 16. Proceso de filtración propuesto para la obtención de un producto con un contenido de antocianinas del 35% en peso.

El proceso diseñado se puede adaptar de acuerdo al porcentaje de recuperación y pureza que se requiera. Mientras mayor sea la pureza requerida del producto, mayor será el número de etapa. Asimismo, en caso de requerir un aumento de capacidad, se puede replicarla la planta de acuerdo a la demanda.

4.9 Dimensionamiento de equipos y análisis económico de planta de producción.

Se desarrolló un balance de masa del proceso para determinar las dimensiones de los equipos requeridos y su costo de inversión. Los supuestos utilizados para el balance se sustentaron en la información obtenida a escala de laboratorio. La base de cálculo consideró una producción de 5000 kg/extracto al año, para una planta que opera 12 meses, 20 días al mes y 20 horas diarias.

De acuerdo a las eficiencias de proceso consideradas, 5000 kg de extracto al año equivalen a una producción de 1,0 kg/hr de extracto y, por lo tanto, al tratamiento 112,2 kg/hr de maqui.

El diagrama de proceso se muestra en la Figura 17, mientras que el detalle del balance de masa se encuentra en la sección Anexos 6.2.

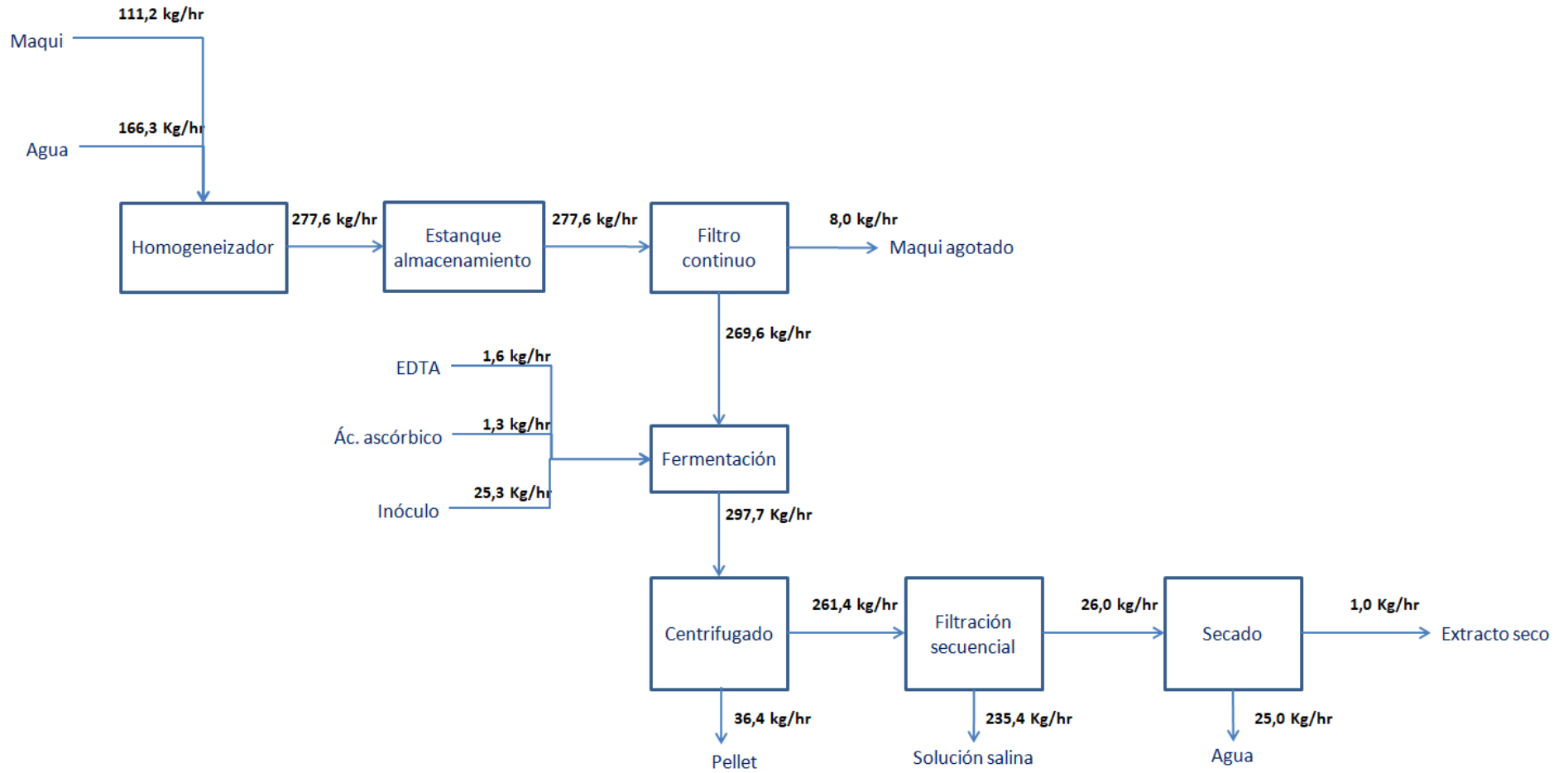


Figura 17. Diagrama de bloques y balance de masa del proceso.

Con los valores obtenidos, se dimensionaron los equipos requeridos y se estimaron los costos de inversión de la planta. Se consideraron dos opciones de secado: Liofilizador y spray dryer. El listado de equipos y sus costos se encuentra en Anexos 6.3.

Para la opción con liofilizador, el costo total de equipos se estima en **USD \$330.300**. Como se observa en el Gráfico 26, los principales costos de inversión corresponden al liofilizador, equipo de filtración y membranas. El equipo de liofilización considerado tiene una capacidad de 1000 litros y un valor USD \$200.000, equivalente al 61% de los costos de inversión en equipos. El equipo de filtración tiene un costo de USD \$50.000 (15%). Se estimó que se requieren 9,7 m² de membrana para el proceso propuesto, equivalente a 30 cartuchos de USD \$1500 cada una, lo que resulta en un costo total en membranas de USD \$45.000, equivalente al 14% del total de costos.

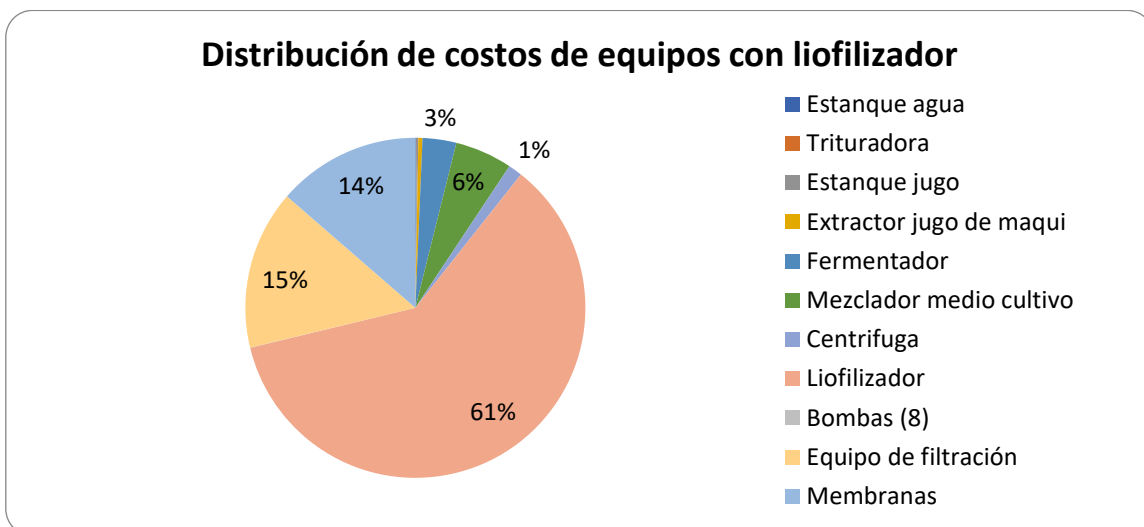


Gráfico 26. Distribución de costos de equipo para proceso con etapa de secado por liofilización.

Por otra parte, para el proceso con spray dryer el costo de inversión en equipos es de **USD \$180.300**, donde el equipo de secado spray tiene un valor de USD \$50.000, equivalente al 28% del total, como se ve en el Gráfico 27.

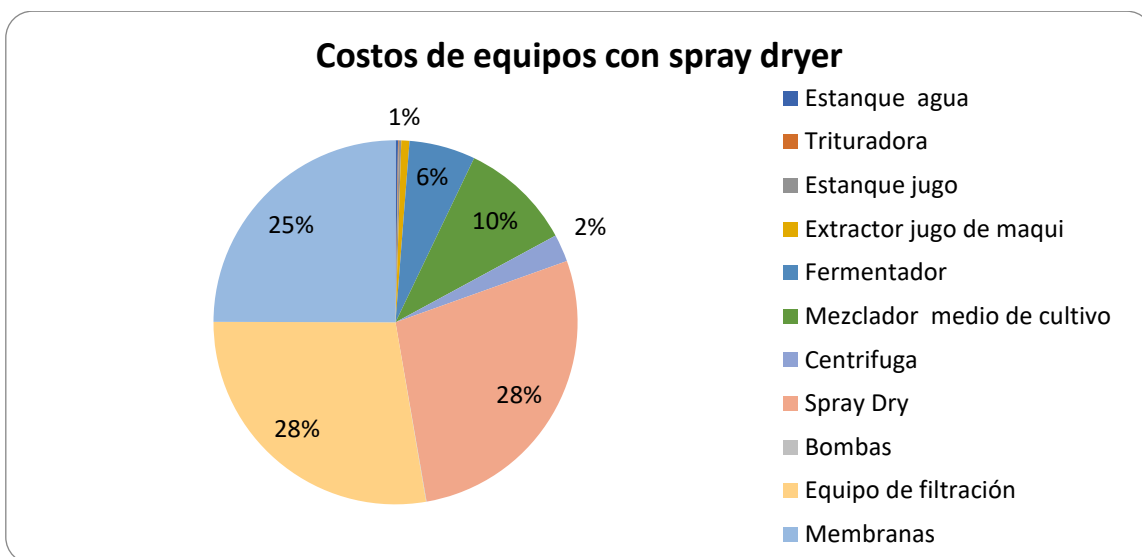


Gráfico 27. Distribución de costos de equipo para proceso con etapa de secado por liofilización.

Finalmente, para el flujo de caja del proyecto, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- Los costos se estimaron bajo el supuesto de que son costos agregados a la estructura actual de MNL.
- Precio de venta del producto: 400 USD/kg extracto para uso en industria de alimentos.
- Costos variables de operación:
 - El precio de compra de la materia prima de 6 USD/kg maqui. Para una producción de 5000 kg extracto/año se requieren 550.000 kg/maqui, lo que eleva los costos anuales en materia prima a USD \$3.300.000.
 - El consumo energético se calculó acuerdo a las especificaciones de los equipos, el cual es de USD \$329.663 por año para el caso del liofilizador, y de USD \$242.009 para el caso del spray dryer.

- Para mano de obra, se consideraron 3 turnos de producción, de 8 horas cada turno (2 operadores por turno, más 2 operadores con descanso) de acuerdo a las siguientes especificaciones:

Tabla 25. Especificaciones sobre de mano de obra de producción.

| Mano de obra producción | | | | |
|-------------------------|--------------------------|----------|-----------|------------------|
| | | | Unitario | Anual |
| Descripción | | Cantidad | USD/año | USD/año |
| General | | | | |
| | Jefe de planta parcial | 0,5 | \$ 46.154 | \$ 23.077 |
| Operación | | | | |
| | Operador pretratamiento | 4 | \$ 9.231 | \$ 36.923 |
| | Operador filtro y secado | 4 | \$ 9.231 | \$ 36.923 |
| Total | | | | \$ 96.923 |

- En administración, se considera una persona dedicada a la gestión de compras de la planta:

Tabla 26. Especificaciones sobre mano de obra de administración.

| Mano de obra administración | | | | |
|-----------------------------|-----------------------|----------|----------|-----------------|
| | | | Unitario | Anual |
| Descripción | | Cantidad | USD/año | USD/año |
| General | | | | |
| | Administración planta | 1 | \$ 7.692 | \$ 7.692 |
| Total | | | | \$ 7.692 |

Al desarrollar el flujo de caja bajo las condiciones actuales, consideradas el "peor escenario", es decir, con un requerimiento de 550.000 kg/maqui año para producir 5000 kg/año de extracto, utilizando un liofilizador para el secado, tomando un precio de venta del producto de 400 USD/kg, un precio de compra de materia prima de 6 USD/kg y un periodo de vida útil de los equipos de 15 años, resulta que el proyecto es económicamente infactible (VAN=-8.521.478). Este es un resultado esperable dado que el balance de masa fue realizado bajo condiciones obtenidas a escala de laboratorio.

Para mejorar los indicadores económicos del proyecto, es fundamental mejorar la eficiencia de producción de manera de requerir menor volumen de biomasa para cumplir el mismo requerimiento productivo. En particular, para alcanzar un valor de VAN = 0 se necesita reducir en al menos un 60% el maqui necesario (aprox. 209.000 kg maqui/año) para los 5000 kg/año de extracto, a través de un aumento en la eficiencia del proceso. Este escenario se muestra en el flujo de caja de Anexos 6.4. Para obtener una TIR mayor al 25%, se requiere aumentar la eficiencia de producción, de tal manera que para cumplir los 5000 kg/año de extracto, no se requieran más de 190.000 kg/maqui.

Mejorar la eficiencia del proceso es un desafío tecnológico factible de resolver, y las estrategias para esto se centran principalmente en mejorar la primera etapa de extracción de antocianinas, para hacerla más eficiente, a través de un proceso con flujos a contracorriente y posterior tratamiento enzimático, y a una etapa de clarificación del jugo post fermentación donde se pierda una menor cantidad de antocianinas.

Asimismo, estos costos y los resultados del proceso deben ser, en una siguiente etapa, calculados a partir de experimentos a escala piloto del proceso, para corroborar y mejorar los números obtenidos a partir de la etapa experimental y de la presente validación a nivel de laboratorio.

Por lo tanto, se sugiere continuar con las etapas de investigación y escalamiento del proceso, de manera de optimizar y validar los parámetros de operación a escala prototipo y piloto, y reducir la incertidumbre para una nueva evaluación de costos del proyecto.

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Tratamiento enzimático para liberación de antocianinas.

No se observa un aumento en la concentración de antocianinas al aplicar enzimas comerciales para las condiciones estudiadas, por lo cual se concluye que el tratamiento enzimático no tiene un impacto significativo en la liberación de pigmentos del fruto de maqui a la solución.

5.2 Fermentaciones

A partir de los resultados de las primeras fermentaciones se decide establecer los siguientes parámetros:

- Temperatura de fermentación de 28°C y agitación 250 rpm.
- Cepa de levadura EC1118 crecida previamente (preinóculo) en medio YPD con fructosa y a pH 4.

Mientras que de la segunda tanda de fermentaciones se concluye lo siguiente:

- Utilizar un porcentaje de preinóculo del 10% con respecto al volumen de la fermentación e inocular cuando las levaduras se encuentren fase de crecimiento exponencial. Con respecto al volumen de la fermentación, este debe ocupar un 25% del matraz.
- El método que se establece para proteger las antocianinas del oxígeno en las fermentaciones, y así evitar una mayor tasa de degradación de estas, será mediante EDTA y ácido ascórbico. Al utilizar estos agentes la tasa de degradación de antocianinas se reduce de un 20% a un 9%, mientras que el tratamiento con calor reduce la tasa de degradación de antocianinas de un 20% a un 17%. Por otro lado, utilizar una atmósfera inerte de nitrógeno para desplazar el oxígeno resulta igualmente efectivo, pero económicamente más caro.
- Dejar fermentando durante 14 horas las soluciones de maqui para eliminar la totalidad de glucosa y fructosa en solución.

5.3 Filtraciones Secuenciales

- El grado de recuperación de antocianinas totales es diferente en cada una de las membranas testeadas. En general los porcentajes de recuperación total fluctúan entre 95% y 70%, teniendo mayor porcentaje de recuperación total la membrana de microfiltración (95,2%) y menor porcentaje de recuperación total la membrana de ultrafiltración (72%). Mientras que, de las antocianinas totales recuperadas, el porcentaje que efectivamente se recupera en el permeado varía entre el 86% y el 9%, siendo mayormente selectiva la membrana de ultrafiltración (86%) y en menor medida la membrana de 5 kDa (66%). La selectividad de la membrana de nanofiltración se mide por el porcentaje de antocianinas que retiene en el concentrado (92%), estando este porcentaje dentro de lo esperado de acuerdo al tamaño de poro de esta membrana y al tamaño de las antocianinas presentes en el jugo.
- En cuanto al grado de recuperación de cada una de las 8 antocianinas presentes en el jugo, los porcentajes de recuperación de estas presentan un comportamiento similar al de recuperación de antocianinas totales. El rango de recuperación varía entre un 18,1% y un 8,7%, siendo el mayor porcentaje correspondiente a delfinidina-3-sam-5-glc y el menor a cianidina 3-glc. El comportamiento de los distintos porcentajes de recuperación para cada antocianina se explica en base al tamaño de estas, las más pequeñas presentan un menor porcentaje debido a que por su tamaño pasan a través de la membrana de nanofiltración, mientras que las de mayor tamaño se mantienen en el concentrado de nanofiltración por su dificultad para pasar a través de este tamaño de poro.
- En cuanto a la velocidad instantánea de filtración los resultados se ajustan a lo esperado. A medida que transcurre el tiempo de filtrado la velocidad de generación de permeado va disminuyendo, lo cual se debe a la formación de una capa de desecho (torta) en la superficie de la membrana que va aumentando la dificultad de filtrado a medida que avanza el proceso.
- Finalmente, las curvas obtenidas de las concentraciones de antocianinas y azúcares a lo largo de cada etapa de filtración, tanto en concentrado como en los 10 ml de volumen permeado, de igual forma se ajustan a lo esperado. Las concentraciones en estas curvas van aumentando con el tiempo, pero la pendiente es mayor en el caso de las antocianinas que en el de los azúcares.

5.4 Proceso completo, modificaciones al proceso lineal y reciclos.

- Con respecto a las fermentaciones del jugo, el *setting* utilizado no ofrece un control muy estricto con respecto a las variables del proceso, y en consecuencia se obtiene una gran variabilidad en los resultados obtenidos. Se recomienda realizar este proceso en un fermentador bien equipado, con un buen control sobre los parámetros del proceso para poder obtener así resultados repetibles y replicables.
- Se recomienda analizar la concentración de antocianinas en el jugo previo y posterior a la etapa de centrifugación, con el fin de analizar el porcentaje que se pierde en esta operación unitaria. Se recomienda el diseño de una etapa para el agotamiento de este pellet y así recuperar una mayor cantidad de antocianinas.
- Para las filtraciones secuenciales se recomienda la siguiente configuración de membranas: Una membrana de microfiltración del menor tamaño de poro posible (0.1 μm), una primera membrana de ultrafiltración (10 kDa), y dos membranas finales que acoten lo más posible los tamaños de las antocianinas más grandes y más pequeñas (760 Da y 480 Da respectivamente), para lo cual las membranas de ultrafiltración (1 kDa) y nanofiltración (500 Da) deberían funcionar bien. Además, se recomienda que, una vez obtenido el concentrado de nanofiltración, se pase por una última etapa de osmosis inversa, con el fin de eliminar la mayor cantidad de agua y contaminantes pequeños, para así disminuir los costos de la etapa de liofilización, y con la ventaja de que esta membrana retiene cerca del 99% de las antocianinas en el concentrado.
- Se recomienda incluir una corriente de reciclo que retorne los concentrados no filtrados en cada etapa de las filtraciones secuenciales al tanque de jugo inicial, con el fin de aumentar el porcentaje de recuperación total de antocianinas sin disminuir la pureza del producto seco.

5.5 Diseño del proceso, dimensionamiento de equipos y balance económico de planta de producción.

- Utilizando los datos obtenidos de los experimentos realizados, ecuaciones de diseño y un modelo matemático en Matlab se determinó el número y la configuración de membranas para obtener un producto seco con un 35% en peso de antocianinas. Este diseño es fácilmente ajustable en función de la composición requerida.
- Se determinaron las dimensiones de las distintas operaciones unitarias en base a una producción de 5000 kg de extracto por año. Asimismo, se calculó el costo de inversión y de operación de estos equipos en dos escenarios distintos: Secado con liofilizador y secado con spray dryer. En el primer caso el costo de inversión es de USD \$330.300, mientras que el costo de operación anual asciende a USD \$329.663. En el segundo caso, estos valores corresponden a USD \$180.300 y USD \$242.009 respectivamente.
- Al desarrollar el flujo de caja bajo las condiciones actuales, y en el escenario de secado con liofilizador, resulta que el proyecto es económicamente inviable ($VAN=-8.655.258$). Para mejorar estos indicadores económicos se recomiendan modificaciones al proceso, de manera de hacerlo más eficiente, con el fin de reducir la cantidad de materia prima necesaria de 550.000 kg maqui/año a 190.000 kg maqui/año ($VAN=472.116$, $TIR=25\%$). Principalmente se recomienda optimizar la extracción de antocianinas del fruto a través de un proceso a contracorriente, la clarificación post fermentación del jugo utilizando agentes coagulantes y/o filtros de tierra y el uso de un método de secado más económico (spray dryer).

6. Anexos

6.1 Curva de crecimiento de levadura EC1118

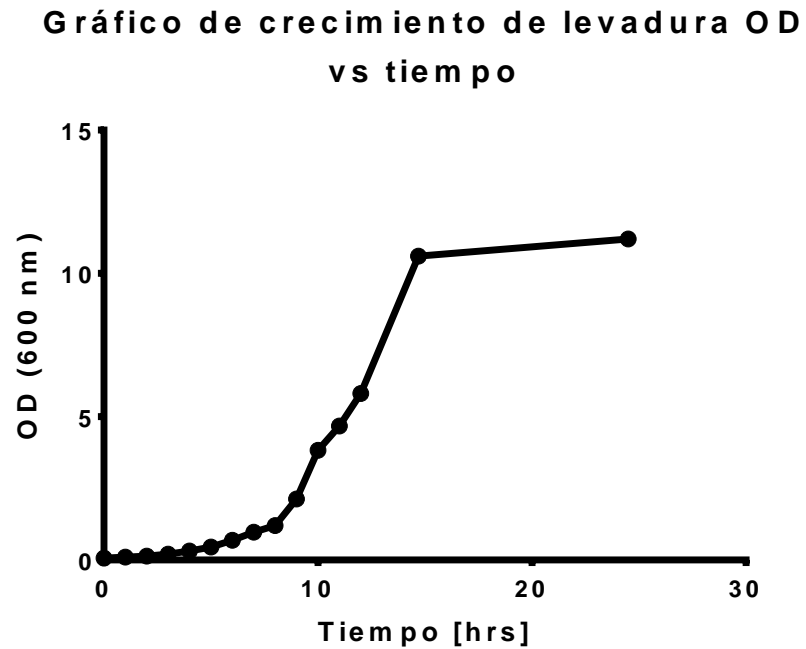


Gráfico 28. Curva de crecimiento de levadura EC1118 en medio YPD con fructosa a 28°C y 200 rpm.

6.2 Balance de masa del proceso

| Trituradora de maqui | | | | | | |
|----------------------|---------|-------|--------|-------|----------|--------------------------------|
| | Entrada | | Salida | | Factores | |
| Maqui | 110,2 | kg/hr | 110,2 | kg/hr | 1,000 | kg maqui berry/kg maqui molido |

| Tanque de Almacenamiento (tiempo de residencia = 30 minutos) | | | | | | |
|--|---------|-------|--------|-------|----------|----------------------------|
| | Entrada | | Salida | | Factores | |
| Agua | 275,4 | lt/hr | | | 0,400 | kg maqui/lt H2O |
| Maqui | 110,2 | kg/hr | | | 0,274 | kg maqui/lt jugo con pulpa |
| Jugo con pulpa | | | 401,8 | lt/hr | | |

| Filtro Continuo / Extractor industrial de Jugo | | | | | | |
|--|---------|-------|--------|-------|----------|-------------------------------------|
| | Entrada | | Salida | | Factores | |
| Jugo con pulpa | 401,8 | lt/hr | | | 1,467 | lt jugo con pulpa/lt jugo sin pulpa |
| Jugo sin pulpa | | | 273,9 | lt/hr | | |
| Maqui agotado | | | 8,4 | kg/hr | 0,031 | kg maqui agotado/lt jugo sin pulpa |

| Fermentación | | | | | | |
|-----------------|---------|-------|--------|-------|----------|--------------------------------------|
| | Entrada | | Salida | | Factores | |
| Jugo sin pulpa | 273,9 | lt/hr | | | 0,882 | lt jugo sin pulpa/lt jugo fermentado |
| EDTA | 1,6 | kg/hr | | | 0,006 | kg EDTA/lt jugo |
| Ácido ascórbico | 1,4 | kg/hr | | | 0,005 | kg AA/lt jugo |
| Inoculo 10% | 30,4 | lt/hr | | | 0,111 | lt inoculo/lt jugo |
| Jugo Fermentado | | | 310,5 | lt/hr | | |

| Centrifuga | | | | | | |
|------------------|---------|-------|--------|-------|----------|--|
| | Entrada | | Salida | | Factores | |
| Jugo Fermentado | 310,5 | lt/hr | | | 1,192 | lt jugo fermentado/lt jugo clarificado |
| Jugo Clarificado | | | 260,4 | lt/hr | | |
| Levadura | | | 36,4 | kg/hr | 0,140 | kg levadura/lt jugo clarificado |

| Filtraciones secuenciales | | | | | | |
|---------------------------|---------|-------|--------|-------|----------|--------------------------------------|
| | Entrada | | Salida | | Factores | |
| Jugo Clarificado | 260,4 | lt/hr | | | 10,400 | lt jugo clarificado/concentrado OR |
| Solución Salina | | | 75,1 | lt/hr | 3,000 | lt solución salina/lt concentrado OR |
| Concentrado de OR | | | 25,0 | lt/hr | | |
| Purgas | | | 160,3 | lt/hr | 6,400 | lt purgados/lt concentrado OR |

| Liofilizador/Spray Dry | | | | | | |
|------------------------|---------|-------|--------|-------|----------|---------------------|
| | Entrada | | Salida | | Factores | |
| Concentrado de OR | 25,0 | lt/hr | | | 1,000 | lt C de OR/lt agua |
| Producto Seco | | | 1,0 | kg/hr | | |
| Agua | | | 25,0 | lt/hr | 25,000 | lt agua/kg producto |

6.3 Listado de equipos y costos

| Listado de equipos preliminar | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|--|----------|------------------|--------|--------------------------|-----------------------|--------------------|---------------------------|---------------|----------------------|-----------------------|--------------------|------|
| Equipo | Nombre | Cantidad | Flujo a procesar | Unidad | Flujo máximo que procesa | Volumen unitario (lt) | Volumen total (lt) | Tiempo de residencia (hr) | Capacidad (%) | Tipo de Solución | Precio unitario (USD) | Precio total (USD) | kW |
| 1 | Estanque almacenamiento agua | 2 | 273,5 | lt/hr | | 1000,0 | 2000,0 | 6,0 | 82% | Agua | 200 | 400 | |
| 2 | Trituradora | 1 | 110 | kg/hr | 150,0 | | | | 73% | Maqui | 120 | 120 | 0,85 |
| 3 | Tanque Almacenamiento Jugo con pulpa | 2 | 401,2 | lt/hr | | 1000,0 | 2000,0 | 4,0 | 80% | Jugo con Pulpa | 200 | 400 | |
| 4 | Extractor jugo de maqui | 1 | 401,2 | kg/hr | 500,0 | | | | 80% | Jugo con Pulpa | 1300 | 1300 | 1,5 |
| 5 | Fermentador | 2 | 273,5 | lt/hr | | 3000,0 | 6000,0 | 14,0 | 64% | Jugo sin Pulpa | 5300 | 10600 | 3 |
| 6 | Mezclador preparación medio de cultivo | 3 | 30,4 | | | 200,0 | 600,0 | 14,0 | 71% | Agua y sales basales | 6000 | 18000 | 0,25 |
| 7 | Centrifuga | 1 | 310 | lt/h | 500,00 | | | | 62% | Jugo Fermentado | 4400 | 4400 | 1,5 |
| 8 | Liofilizador | 1 | 25 | lt/hr | | 1000,00 | 1000,00 | 36,00 | 90% | | 200000 | 200000 | 167 |
| 9 | Spray Dry | 1 | 25 | lt/hr | | | | | | | 50000 | 50000 | 60 |
| 10 | Bomba 1 | 1 | 273,5 | lt/hr | 2100,0 | | | | 13% | Agua | 10 | 10 | 0,37 |
| 11 | Bomba 2 | 1 | 401,2 | lt/hr | 2100,0 | | | | 19% | Jugo con Pulpa | 10 | 10 | 0,37 |
| 12 | Bomba 3 | 1 | 273,5 | lt/hr | 2100,0 | | | | 13% | Jugo sin Pulpa | 10 | 10 | 0,37 |
| 13 | Bomba 4 | 1 | 30,5 | lt/hr | 2100,0 | | | | 1% | Agua y sales basales | 10 | 10 | 0,37 |
| 14 | Bomba 5 | 1 | 310 | lt/hr | 2100,0 | | | | 15% | Jugo Fermentado | 10 | 10 | 0,37 |
| 15 | Bomba 6 | 1 | 260 | lt/hr | 2100,0 | | | | 12% | Jugo Clarificado | 10 | 10 | 0,37 |
| 16 | Bomba 7 | 1 | 25 | lt/hr | 2100,0 | | | | 1% | Concentrado de OR | 10 | 10 | 0,37 |
| 17 | Bomba 8 | 1 | 75 | lt/hr | 2100,0 | | | | 4% | Agua Salina | 10 | 10 | 0,37 |
| 18 | Equipo de filtración | 1 | | | | | | | | | 50000 | 50000 | 225 |
| 19 | Membranas | 30 | | | | | | | | | 1500 | 45000 | |

6.4 Flujo de caja del proyecto

| ITEM | Año 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Ingreso Moneda (US\$ / Pesos) miles (M) | | | | | | | | | | | |
| INGRESOS OPERACIONALES | | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 |
| Ventas Locales | | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 | 2.000.000 |
| Exportaciones | | | | | | | | | | | |
| COSTOS VARIABLES | | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 |
| Costo de Producción | | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 | 1.583.051 |
| Compra Maqui | | 1.253.388 | 1.253.388 | 1.253.388 | 1.253.388 | 1.253.388 | 1.253.388 | 1.253.388 | 1.253.388 | 1.253.388 | 1.253.388 |
| Costos operacionales | | 329.663 | 329.663 | 329.663 | 329.663 | 329.663 | 329.663 | 329.663 | 329.663 | 329.663 | 329.663 |
| Costo de Ventas y Distribución | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Comisión por venta | | | | | | | | | | | |
| Distribución | | | | | | | | | | | |
| MARGEN CONTRIBUCIÓN | | 416.949 | 416.949 | 416.949 | 416.949 | 416.949 | 416.949 | 416.949 | 416.949 | 416.949 | 416.949 |
| MARGEN CONTRIBUCIÓN % | | 21% | 21% | 21% | 21% | 21% | 21% | 21% | 21% | 21% | 21% |
| COSTOS FIJOS | | 104.615 | 104.615 | 104.615 | 104.615 | 104.615 | 104.615 | 104.615 | 104.615 | 104.615 | 104.615 |
| Salarios Producción | | 96.923 | 96.923 | 96.923 | 96.923 | 96.923 | 96.923 | 96.923 | 96.923 | 96.923 | 96.923 |
| Costos Administración y Gastos Generales | | 7.692 | 7.692 | 7.692 | 7.692 | 7.692 | 7.692 | 7.692 | 7.692 | 7.692 | 7.692 |
| Salarios Administración | | 7.692 | 7.692 | 7.692 | 7.692 | 7.692 | 7.692 | 7.692 | 7.692 | 7.692 | 7.692 |
| Costos Marketing y Ventas | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Salario Fijo vendedores | | | | | | | | | | | |
| Promoción y Publicidad | | | | | | | | | | | |
| Costos Desarrollo | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Salarios | | | | | | | | | | | |
| Materiales | | | | | | | | | | | |
| EBITDA | | 312.334 | 312.334 | 312.334 | 312.334 | 312.334 | 312.334 | 312.334 | 312.334 | 312.334 | 312.334 |
| EBITDA % | | 16% | 16% | 16% | 16% | 16% | 16% | 16% | 16% | 16% | 16% |
| Depreciación y Amortizaciones | | 22.020 | 22.020 | 22.020 | 22.020 | 22.020 | 22.020 | 22.020 | 22.020 | 22.020 | 22.020 |
| UTILIDAD ANTES DE IMPUESTOS | | 290.314 | 290.314 | 290.314 | 290.314 | 290.314 | 290.314 | 290.314 | 290.314 | 290.314 | 290.314 |
| Impuestos | | 27% | 27% | 27% | 27% | 27% | 27% | 27% | 27% | 27% | 27% |
| UTILIDAD DESPUÉS IMPUESTOS | | 211.929 | 211.929 | 211.929 | 211.929 | 211.929 | 211.929 | 211.929 | 211.929 | 211.929 | 211.929 |
| UTILIDAD DESPUÉS IMPUESTOS % | | 11% | 11% | 11% | 11% | 11% | 11% | 11% | 11% | 11% | 11% |
| Depreciación y Amortizaciones | | 22.020 | 22.020 | 22.020 | 22.020 | 22.020 | 22.020 | 22.020 | 22.020 | 22.020 | 22.020 |
| INVERSIONES | 1.174.133 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Inversión en Equipamiento / Maquinaria | 330.300 | | | | | | | | | | |
| Inversión en capital de trabajo (KT) | 843.833 | | | | | | | | | | |
| FLUJO DE CAJA NETO | -1.174.133 | 233.949 | 233.949 | 233.949 | 233.949 | 233.949 | 233.949 | 233.949 | 233.949 | 233.949 | 233.949 |
| Valor residual/terminal | | | | | | | | | | | 784.233 |
| FLUJO DE CAJA NETO TOTAL | -1.174.133 | 233.949 | 233.949 | 233.949 | 233.949 | 233.949 | 233.949 | 233.949 | 233.949 | 233.949 | 1.018.182 |
| FLUJO DE CAJA NETO ACUMULADO | -1.174.133 | -940.184 | -706.235 | -472.286 | -238.337 | -4.388 | 229.561 | 463.510 | 697.459 | 931.408 | 1.949.590 |

7. Bibliografía

- Aida. (2015). Hábitos de alimentación de pacientes con obesidad severa. *Nutrición Hospitalaria*, 672-681.
- Atalah. (2012). Epidemiología de la Obesidad en Chile. *Revista medica clinica las condes*, 117-123.
- Brauch, J. E. (2016). Detailed analyses of fresh and dried maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) berries and juice. *Food Chemistry* 190, 308-316.
- Burton-Freeman, B. (2016). *Nutraceuticals*. Ramesh C. Gupta.
- Cassidy, A. M. (2013). High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle-aged women. *Circulation* 127 (2), 188-196.
- Crawford, & Mellentin. (2008). *Successful superfruit strategy: how to build a superfruit business*. London.
- EEUU, B. d. (Mayo de 2010). *Delphinol*. Obtenido de <http://www.delphinol.com/maqui-berry/>
- FAO. (2017). *FAO*. Obtenido de <http://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/463396/>
- Fredes, C. (2012). POLYPHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MAQUI DURING FRUIT DEVELOPMENT AND MATURATION IN CENTRAL CHILE. *CHILEAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH*, 582-589.
- Genskowsky. (2016). Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 4235 - 4242.
- Girones-Vilaplana, A. (2014). Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *Journal of Functional Foods*, 599-608.
- INTA. (2010). *Delphinol*. Obtenido de <http://www.delphinol.com/maqui-berry/>
- Jara, E. (2012). Studies of a standardized extract of Maqui fruit rich in delphinidins in the maintenance of glucose balance. *Sociedad de farmacología chilena*, 27-34.
- Jennings, A. W. (2014). Intakes of Anthocyanins and Flavones Are Associated with Biomarkers of Insulin Resistance and Inflammation in Women. *The Journal of Nutrición* 144 (2), 202-208.

- Joseph, S. E.-F. (2014). Berries: Anti-inflammatory Effects in Humans. *J. Agric. Food Chem.* 62 (18) , 3886-3903.
- Li, D. Z. (2015). Purified Anthocyanin Supplementation Reduces Dyslipidemia, Enhances Antioxidant Capacity, and Prevents Insulin Resistance in Diabetic Patients. *Journal of Nutrition* 145 (4), 742-748.
- Mizon C., A. E. (2004). TRANSICION EPIDEMIOLOGICA EN CHILE: LECCIONES APRENDIDAS DEL PROYECTO NORTH KARELIA. *Revista chilena de nutrición*, 276-282.
- Moore, J. (2017). Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–2012. *Preventing Chronic Disease* 14 (24), 1-16.
- Mordor-Intelligence. (2016). *Mordor Intelligence*. Obtenido de <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/category/food-beverage/supplements>
- Muñoz O, M. M. (2004). *Plantas Medicinales de uso en Chile. Química y Farmacología*. Santiago: Universitaria.
- Naczka, M. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (5), 1523-1542.
- Novotny, J. B. (2015). Cranberry Juice Consumption Lowers Markers of Cardiometabolic Risk, Including Blood Pressure and Circulating C-Reactive Protein, Triglyceride, and Glucose Concentrations in Adults. *Journal of nutrition* 145 (6), 1185-1193.
- OECD. (2017). *Health Statistics*. Obtenido de <http://www.oecd.org/health/health-systems/Obesity-Update-2017.pdf>
- OMS. (2016). *10 Principales causas de defunción*. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Rojo. (2012). In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry . *Food Chemistry*, 387-396.
- Socarras M., B. M. (2010). Alimentación saludable y nutrición en las enfermedades cardiovasculares. . *Rev Cubana Invest Bioméd*, 353-363.
- Wedick, N. P. (2012). Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *The American journal of clinical nutrition* 95 (4), 925-933.