

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE  
ANTOCIANINAS Y POLIFENOLES TOTALES A PARTIR DE  
RESIDUOS DE ARÁNDANOS (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy)  
MEDIANTE EXTRACCIÓN CON CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO,  
SOLVENTES PRESURIZADOS, ULTRASONIDO Y EXTRACCIÓN  
CONVENCIONAL”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Alimentos con mención en Gestión, Calidad e Inocuidad  
Alimentaria:**

***YESSENIA VALERIA REINOSO ROJAS***

**Director de Tesis: Dr. Andrés Bustamante Pezoa**

**Codirector de Tesis: Dr. Jaime Ortiz Viedma**

**Santiago-CHILE**

**Diciembre 2022**

# **UNIVERSIDAD DE CHILE**

## **FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

### **INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER**

**Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster, presentada por el candidato:**

## **YESSENIA VALERIA REINOSO ROJAS**

**Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Alimentos, mención gestión, calidad e inocuidad de los alimentos en el examen público rendido el día 05 de diciembre de 2022.**

**Director de Tesis:**

**Andrés Bustamante Pezoa., Med. Vet. Dr.**

\_\_\_\_\_

**Co-Director de Tesis:**

**Jaime Ortiz Viedma., Ing. Aliment. Mag. Dr.**

\_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Cristina Vergara., Ing. Aliment. Dra.**

\_\_\_\_\_

**Alicia Rodríguez., Ing. Aliment. Mag. Dra.**

\_\_\_\_\_

**Carolina Fredes., Ing. Agr. Mag. Dra.**

\_\_\_\_\_

## **Dedicatoria**

Esta tesis se la dedico a mis padres, Matilde y Julio que han sido el pilar fundamental en mi vida, todo esto se los debo a ustedes, por haberme apoyado en mi sueño durante todo este camino, por nunca abandonarme en los momentos más difíciles que nos ha tocado atravesar en estos años velando siempre por mi bienestar y educación siendo mi consuelo y lugar seguro a pesar de la distancia, por todos los valores que me inculcaron, por haber depositado en mí su entera confianza sin dudar, de manera especial esta tesis se la dedico a mi hermana, Andrea por todos sus consejos, por la motivación constante que me brinda, por los momentos de alegría y paz que a mi vida le entrega desde el mismo momento de su nacimiento, por su ejemplo de serenidad y perseverancia que la caracteriza y sobre todo por su amor incondicional. Los quiero mucho, mi familia.

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por ser mi guía y protección, por darme sabiduría para seguir mi camino y por nunca abandonar mi alma fortaleciendo mi corazón e iluminando mi mente para sortear los obstáculos y dificultades a los que la vida me enfrenta.

A mis padres, hermana y mi enamorado Fabián que han sido mis confidentes, soporte y compañía durante todo mi periodo de estudios hasta culminar esta etapa de mi vida.

Al Dr. Andrés Bustamante, mi profesor y asesor de tesis, a quien le debo gran parte de mis conocimientos, por su apoyo, paciencia, valiosa enseñanza en el transcurso de mi posgrado y por compartir sus conocimientos para la realización de esta tesis.

Finalmente, agradezco a todas las personas que han formado parte de mi vida, agradeciéndoles su amistad, consejos y apoyo incondicional en los buenos y malos momentos, estoy segura de que todo el esfuerzo de hoy será el éxito de mañana.

A todos ustedes mi reconocimiento y gratitud.

## Tabla de contenido

Tabla de contenido .....	2
Índice de Tablas .....	5
Índice de Figuras .....	8
Resumen .....	13
Abstract .....	15
I. Introducción .....	17
1.4.1. Estructuras primarias y secundarias de las Antocianinas.....	24
1.4.2. Antocianinas glicosiladas.....	25
1.4.3. Antocianinas aciladas.....	26
1.5.1. Solubilidad .....	29
1.5.2. pH del medio .....	30
1.5.3. Propiedad quelante y antioxidante .....	30
1.5.4. Temperatura .....	31
1.5.5. Luz.....	31
1.5.6. Ácido ascórbico y oxígeno.....	31
1.7.1. Extracción con Solventes Convencionales.....	42
1.7.2. Extracción acelerada de solventes ASE .....	48
1.7.2.1. Efecto de la temperatura .....	49
1.7.2.2. Efectos de la presión .....	50
1.7.2.3. Efecto del tipo de solvente.....	50
1.7.3. Extracción asistida por presión .....	52
1.7.3.1. Extracción con CO2 Supercrítico (SFE- CO2).....	52
1.7.4. Extracción Asistida con Ultrasonido.....	57
II. Hipótesis .....	62
III. Objetivos .....	63
IV. Materiales y métodos .....	65
4.2.1. Arándanos .....	65
4.2.2. Procesamiento del arándano.....	65
4.2.3. Preparación de la pomasa de la fruta.....	66

4.3.1.	Extracción convencional .....	66
4.3.1.1.	Diseño experimental de extracción convencional .....	66
4.3.2.	Extracción acelerada de solventes ASE .....	68
4.3.2.1.	Diseño experimental de extracción ASE .....	69
4.3.3.	Extracción supercrítica con CO <sub>2</sub> (SC-CO <sub>2</sub> ): .....	70
4.3.3.1.	Diseño experimental con SC-CO <sub>2</sub> :.....	71
4.3.4.	Extracción Asistida con Ultrasonido:.....	72
4.3.4.1.	Diseño experimental con extracción asistida con ultrasonido: .....	72
4.4.1.	Materia prima inicial .....	74
4.4.1.1.	Humedad.....	74
4.4.1.2.	Actividad de agua ( <i>aw</i> ).....	74
4.4.1.3.	Determinación del contenido de proteína .....	74
4.4.1.4.	Determinación de fibra dietética total/soluble/insoluble .....	74
4.4.1.5.	Determinación del contenido de materia grasa.....	74
4.4.1.6.	Determinación del contenido de cenizas .....	74
4.4.2.	Extractos.....	75
4.4.2.1.	Sólidos solubles .....	75
4.4.2.2.	Contenido de antocianinas individuales .....	75
4.4.2.2.1.	Identificación y cuantificación de antocianinas por HPLC-DAD ...	75
4.4.2.2.2.	Identificación de antocianinas por UHPLC-DAD-MS .....	76
4.4.2.3.	Contenido de antocianinas totales.....	76
4.4.2.4.	Contenido de polifenoles totales.....	77
4.4.2.5.	Capacidad antioxidante:.....	78
4.4.2.5.1.	Ensayo de FRAP.....	78
4.4.2.5.2.	Ensayo DPPH:.....	78
V.	Análisis estadístico .....	80
VI.	Resultados y discusión .....	81
6.3.1.	Contenido de Polifenoles Totales.....	86
6.3.2.	Contenido de Antocianinas Totales .....	87
6.3.3.	Actividad Antioxidante: FRAP.....	89

6.3.4.	Actividad Antioxidante: DPPH.....	90
6.5.1.	Contenido de Polifenoles Totales.....	100
6.5.2.	Contenido de Antocianinas Totales .....	102
6.5.3.	Actividad Antioxidante: FRAP .....	103
6.5.4.	Actividad Antioxidante: DPPH.....	105
6.7.1.	Contenido de Polifenoles Totales.....	115
6.7.2.	Contenido de Antocianinas Totales .....	117
6.7.3.	Actividad Antioxidante: FRAP .....	118
6.7.4.	Actividad Antioxidante: DPPH.....	120
6.9.1.	Contenido de Polifenoles Totales.....	129
6.9.2.	Contenido de Antocianinas Totales .....	131
6.9.3.	Actividad Antioxidante: FRAP .....	132
6.9.4.	Actividad Antioxidante: DPPH.....	134
VII.	Conclusiones .....	158
VIII.	Bibliografía .....	160
IX.	Anexos .....	173

## Índice de Tablas

I.	Introducción .....	17
Tabla 1.	Superficie de frutales por región, según fecha del catastro frutícola por hectáreas. .	19
Tabla 2.	Composición nutricional de arándano por cada 100g de fruto fresco. ....	21
Tabla 3.	Contenido y presencia de antocianidinas en el arándano alto cv. Legacy como fruta entera y piel.....	23
Tabla 4.	Antocianinas presentes en arándano como fruto fresco y residuos.....	36
Tabla 5.	Ventajas y Desventajas de los diferentes métodos de extracción .....	41
Tabla 6.	Estudios con el Método Convencional.....	44
Tabla 7.	Estudios con el método ASE.....	51
Tabla 8.	Ventajas y Desventajas de Extracción por Fluidos Supercríticos .....	54
Tabla 9.	Estudios con el Método CO <sub>2</sub> Supercrítico .....	55
Tabla 10.	Estudios con el método EAU .....	59
IV.	Materiales y Métodos.....	65
Tabla 11.	Diseño Experimental-Método Convencional.....	67
Tabla 12.	Diseño Experimental-Método ASE.....	69
Tabla 13.	Diseño Experimental-Método SC-CO <sub>2</sub> .....	71
Tabla 14.	Diseño Experimental-Método Asistido con Ultrasonido .....	73
V.	Análisis Estadístico.....	80
VI.	Resultados y Discusión .....	81
Tabla 15.	Caracterización física y química del residuo de arándano ( <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy) .....	81
Tabla 16.	Análisis proximal del fruto entero y pomasa del arándano azul .....	83
Tabla 17.	Caracterización Química de los extractos obtenidos con Extracción Convencional	85
Tabla 18.	Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de polifenoles totales	86
Tabla 19.	Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de antocianinas totales	88
Tabla 20.	Optimización de la Variable Respuesta maximizando actividad antioxidante FRAP	90
Tabla 21.	Optimización de la Variable Respuesta maximizando la actividad antioxidante DPPH	91
Tabla 22.	Optimización de las cuatro Variables Respuesta maximizando la concentración de antocianinas totales, polifenoles totales, actividad antioxidante DPPH y FRAP.....	93

Tabla 23. Valores de las variables respuesta (polifenoles totales, antocianinas totales, FRAP, DPPH) en el Extracto Convencional Óptimo del modelo predicho y experimental de residuos de arándano liofilizado. ....	95
Tabla 24. Caracterización Química de los extractos obtenidos con Extracción Acelerada de Solvente .....	100
Tabla 25. Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de polifenoles totales .....	101
Tabla 26. Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de antocianinas totales .....	103
Tabla 27. Optimización de la Variable Respuesta maximizando actividad antioxidante FRAP .....	104
Tabla 28. Optimización de la Variable Respuesta maximizando la actividad antioxidante DPPH .....	106
Tabla 29. Optimización de las cuatro Variables Respuesta maximizando la concentración de antocianinas totales, polifenoles totales, actividad antioxidante DPPH y FRAP.....	109
Tabla 30. Valores de las variables respuesta (polifenoles totales, antocianinas totales, FRAP, DPPH) en el Extracto ASE Óptimo del modelo predicho y experimental de residuos de arándano liofilizado. ....	111
Tabla 31. Caracterización Química de los extractos obtenidos por Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU).....	114
Tabla 32. Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de polifenoles totales .....	116
Tabla 33. Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de antocianinas totales .....	118
Tabla 34. Optimización de la Variable Respuesta maximizando actividad antioxidante FRAP	119
Tabla 35. Optimización de la Variable Respuesta maximizando la actividad antioxidante DPPH .....	121
Tabla 36. Optimización de las cuatro Variables Respuesta maximizando la concentración de antocianinas totales, polifenoles totales, actividad antioxidante DPPH y FRAP.....	122
Tabla 37. Valores de las variables respuesta (polifenoles totales, antocianinas totales, FRAP, DPPH) en el Extracto EAU Óptimo del modelo predicho y experimental de residuos de arándano liofilizado. ....	124
Tabla 38. Caracterización Química de los extractos obtenidos con Extracción mediante CO <sub>2</sub> Supercrítico .....	129
Tabla 39. Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de polifenoles totales .....	130
Tabla 40. Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de antocianinas totales .....	132

Tabla 41. Optimización de la Variable Respuesta maximizando actividad antioxidante FRAP	133
Tabla 42. Optimización de la Variable Respuesta maximizando la actividad antioxidante DPPH .....	135
Tabla 43. Optimización de las cuatro Variables Respuesta maximizando la concentración de antocianinas totales, polifenoles totales, actividad antioxidante DPPH y FRAP.....	136
Tabla 44. Valores de las variables respuesta (polifenoles totales, antocianinas totales, FRAP, DPPH) en el Extracto CO <sub>2</sub> -SC Óptimo del modelo predicho y experimental de residuos de arándano liofilizado. ....	138
Tabla 45. Contenido óptimo y experimental de Polifenoles, Antocianinas totales, DPPH y FRAP recuperados por Extracción Convencional, ASE, EAU y CO <sub>2</sub> – SC a partir de residuos de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy.....	141
Tabla 46. Análisis de las antocianinas individuales presentes en residuos de arándano ( <i>Vaccinium Corymbosum</i> cv Legacy) a partir de los extractos óptimos obtenidos por el método Convencional, ASE, EAU y CO <sub>2</sub> -SC.....	147

## Índice de Figuras

Figura 1. Variedad de arándanos cultivadas en la zona central de Chile.....	18
Figura 2. (a) Cation flavilio: estructura general y numeración; (b) Pelargonidina (antocianidina); (c) Pelargonidina-3-O-glucósido (antocianina). ....	24
Figura 3. Estructura química de una antocianina acilada; Delfinidina-3-malonylglucósido-5-glucósido.....	25
Figura 4. Estructura química de los ácidos cinámicos más comunes presentes en las antocianinas aciladas.....	26
Figura 5. Estructura química de los ácidos alifáticos más comunes presentes en las antocianinas aciladas.....	27
Figura 6. Formas de equilibrio de la antocianina en función al pH.....	28
Figura 7. Difusión del soluto en el disolvente.....	42
Figura 8. Diagrama de Fases CO <sub>2</sub> . Presión-Temperatura.....	53
Figura 9. Esquema de la Extracción Acelerada de Solventes (ASE).....	68
Figura 10. Esquema Básico del equipo de SC-CO <sub>2</sub> .....	71
Figura 11. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Polifenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/ g de residuo de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con Extracción Convencional y variables independientes de Temperatura, tiempo y concentración de etanol.....	86
Figura 12. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Antocianinas Totales (mg equivalentes de cianidin-3 glucósido/ g de residuo de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con Extracción Convencional y variables independientes de Temperatura, tiempo y concentración de etanol.....	88
Figura 13. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para FRAP (μmol equivalentes de Trolox/ g) de residuo de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con Extracción Convencional y variables independientes de Temperatura, tiempo y concentración de etanol.....	89
Figura 14. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para DPPH (μmol equivalente de Trolox/ g de residuo) de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con Extracción	

Convencional y variables independientes de Temperatura, tiempo y concentración de etanol.....	91
Figura 15. Superficie respuesta del valor deseable de concentración de antocianinas y polifenoles totales en los extractos obtenidos por el método convencional a partir de residuos de arándano .....	92
Figura 16. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Polifenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/ g de residuo de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con ASE y variables independientes de Temperatura, ciclos de extracción y concentración de etanol.....	101
Figura 17 Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Antocianinas Totales (mg equivalentes de cianidin-3 glucósido/ g de residuo de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con ASE y variables independientes de Temperatura, ciclos estáticos de extracción y concentración de etanol .....	102
Figura 18. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para FRAP ( $\mu$ mol equivalentes de trolox/ g de residuo de arándano) <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con ASE y variables independientes de Temperatura, ciclos de extracción y concentración de etanol .....	104
Figura 19. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para DPPH ( $\mu$ mol equivalente de Trolox/ g de residuo) de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con ASE y variables independientes de Temperatura, ciclos de extracción y concentración de etanol .....	106
Figura 20. Superficie respuesta del valor deseable de concentración de antocianinas y polifenoles totales en los extractos obtenidos por el método ASE a partir de residuos de arándano.....	108
Figura 21. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Polifenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/ g de residuo de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con EAU y variables independientes de amplitud, tiempo y concentración de etanol.....	115

Figura 22. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Antocianinas Totales (mg equivalentes de cianidin-3 glucósido/ g de residuo de arándano) <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con EAU y variables independientes de amplitud de proceso, tiempo y concentración de etanol.....	117
Figura 23. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para FRAP ( $\mu\text{mol}$ equivalentes de trolox/ g de residuo de arándano) <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con EAU y variables independientes de amplitud del proceso, tiempo y concentración de etanol..	119
Figura 24. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para DPPH ( $\mu\text{mol}$ equivalente de Trolox/ g de residuo de arándano) <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con EAU y variables independientes del porcentaje de amplitud, tiempo y concentración de etanol .....	120
Figura 25. Superficie respuesta del valor deseable de concentración de antocianinas y polifenoles totales en los extractos obtenidos por el método de EAU a partir de residuos de arándano .....	122
Figura 26. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Polifenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/ g de residuo de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con Extracción $\text{CO}_2\text{-SC}$ y variables independientes de concentración de cosolvente, temperatura y presión.....	130
Figura 27. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Antocianinas Totales (mg equivalentes de cianidin-3 glucósido/ g de residuo de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con Extracción $\text{CO}_2\text{-SC}$ y variables independientes de concentración de cosolvente, temperatura y presión.....	131
Figura 28. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para FRAP $\mu\text{mol}$ equivalentes de trolox/ g de residuo de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy con con Extracción $\text{CO}_2\text{-SC}$ y variables independientes de concentración de cosolvente, temperatura y presión.....	133
Figura 29. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para DPPH ( $\mu\text{mol}$ equivalente de Trolox/ g de residuo de arándano <i>Vaccinium corymbosum</i> L. cv. Legacy) con Extracción	

CO <sub>2</sub> -SC y variables independientes de concentración de cosolvente, temperatura y presión.....	134
Figura 30. Superficie respuesta del valor deseable de concentración de antocianinas y polifenoles totales en los extractos obtenidos por el método con Extracción CO <sub>2</sub> -SC a partir de residuos de arándano.....	136
Figura 31. Perfiles de antocianinas mediante Cromatografía líquida de alta resolución equipada con un detector de fotodiodo (HPLC-DAD) a residuos de arándano cv Legacy, sobre el extracto óptimo obtenido por el método convencional. Los peaks de antocianinas fueron asignados de la siguiente manera en orden de su tiempo de retención: 1= delphinidina-3-glucósido, 2=petunidina-3-glucósido, 3= peonidina-3-glucósido, 4= cianidina-3-glucósido, 5= malvidina-3-glucósido. ....	152
Figura 32. Perfiles de antocianinas mediante Cromatografía líquida de alta resolución equipada con un detector de fotodiodo (HPLC-DAD) a residuos de arándano cv Legacy sobre el extracto óptimo obtenido por el método ASE. Los peaks de antocianinas detectadas a 520 nm fueron asignados de la siguiente manera en orden de su tiempo de retención: 1= delphinidina-3-glucósido, 2=peonidina-3-glucósido, 3= petunidina-3-glucósido, 4= cianidina-3-glucósido, 5= malvidina-3-glucósido. ....	153
Figura 33. Perfiles de antocianinas mediante Cromatografía líquida de alta resolución equipada con un detector de fotodiodo (HPLC-DAD) a residuos de arándano cv Legacy, sobre el extracto óptimo obtenido por el método EAU. Los peaks de antocianinas detectadas a 520 nm fueron asignados de la siguiente manera en orden de su tiempo de retención: 1= delphinidina-3-glucósido, 2=petunidina-3-glucósido, 3= peonidina-3-glucósido, 4= cianidina-3-glucósido, 5= malvidina-3-glucósido.....	153
Figura 34. Perfiles de antocianinas mediante Cromatografía líquida de alta resolución equipada con un detector de fotodiodo (HPLC-DAD) a residuos de arándano cv Legacy, sobre el extracto óptimo obtenido por el método CO <sub>2</sub> -SC. Los peaks de antocianinas detectadas a 520 nm fueron asignados de la siguiente manera en orden de su tiempo de retención: 1= delphinidina-3-glucósido, 2=petunidina-3-glucósido, 3= peonidina-3-glucósido, 4= cianidina-3-glucósido, 5= malvidina-3-glucósido.....	154

Figura 35. Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento equipada con un fotodiodo junto con espectrometría de masas de ionización por electrospray con detector de matriz de diodos (UPLC-DAD-MS) de antocianinas de residuos de arándano (*Vaccinium Corymbosum* cv Legacy). Cromatogramas de iones totales extraídos: a) Extracto óptimo Convencional, b) Extracto óptimo ASE, c) Extracto óptimo EAU, d) Extracto óptimo CO<sub>2</sub>-SC. Los peaks de antocianina fueron: Pelargonidina (m/z: 271,0601), Cianidina (m/z: 287;0545), Peonidina (m/z: 301;0705), Delfinidina (m/z: 303,0497), Petunidina (m/z: 317,0655), 6= Malvidina (m/z: 331,0809)..... 157

## Resumen

Como producto del procesamiento del arándano en la industria de jugo, se generan residuos que podrían causar impacto negativo al medioambiente. La revalorización de esta materia prima rica en compuestos polifenólicos permitiría la utilización de estos compuestos en la formulación de ingredientes funcionales. Por ello, este estudio tiene por objetivo optimizar la extracción convencional (EC), extracción asistida por ultrasonido (EAU), extracción acelerada de solventes (ASE) y extracción con CO<sub>2</sub>-supercrítico (CO<sub>2</sub>-SC) de residuos de arándanos cv. Legacy, utilizando como metodología un diseño Box-Behnken (15 experimentos) para cada uno de los métodos de extracción. Se evaluó para el caso de la extracción convencional el efecto de la concentración de solvente (etanol-agua 50-100% v/v), temperatura (20-60°C) y tiempo de extracción (60-120 min), para EAU: se empleó como variables; la amplitud del proceso (20-90 %), tiempo (10-60 min.) y concentración de solvente (etanol-agua 20-80% v/v), para ASE: concentración de solvente (etanol-agua 20-80% v/v), temperatura (40-60°C) y ciclos estáticos de extracción (1-5) y finalmente para la extracción CO<sub>2</sub>-SC se analizó como variables la presión (200-400 bar), temperatura (40-60°C) y cosolvente (etanol puro 0-10%). Se realizó optimización múltiple en base a polifenoles totales, antocianinas totales y actividad antioxidante, obteniendo resultados para EC: Antocianinas totales fluctuaron entre 7,33-12,75 miligramos equivalentes de cianidina-3-glicósido (mg EC3G) /g residuo y polifenoles totales entre 9,40-44,2 miligramos equivalentes de ácido gálico (mg EAG) /g residuo. La optimización indica que, a 60°C, 84,66 min de extracción y mezcla de etanol del 50,4% v/v permiten obtener mayor nivel de compuestos polifenólicos. En cuanto a la metodología ASE para antocianinas totales se recuperaron entre 8,24-18,46 mg EC3G/g residuo y polifenoles totales entre 16,6-46,2 mg EAG/g residuo. La optimización indica que, a 41,3 °C, 1 ciclo de extracción y mezcla de etanol-agua del 79,8% permiten obtener mayor nivel de compuestos polifenólicos. Una situación distinta ocurrió con el CO<sub>2</sub>-SC donde se obtuvo menor contenido de antocianinas totales (0,01-6,69 mg EC3G/g residuo) y polifenoles totales (0,10-7,50 mg EAG/g residuo), el cosolvente es un factor con influencia positiva para ambos parámetros. La condición óptima de extracción fue de 400

bar, 51,8 °C y 10 % de cosolvente. Finalmente, para la EAU se obtuvieron valores de antocianinas totales entre (6,83-13,11 mg EC3G/g residuo) y polifenoles totales (9,50-32,40 mg EAG/g residuo) con condiciones óptimas correspondientes a la combinación entre una amplitud del 90% durante 10 minutos con una mezcla de etanol-agua igual a 57,97 % v/v. Además, mediante HPLC se identificaron y cuantificaron 5 de las principales antocianinas individuales presentes en arándanos: delphinidina 3-O-glucósido, petunidina 3-O-glucósido, peonidina 3-O-glucósido, cianidina 3-O-glucósido y malvidina 3-O-glucósido. También con la ayuda de UPLC-DAD-MS se identificaron 32 antocianinas en los extractos óptimos de cada metodología utilizada para esta tesis.

Se concluye que es factible recuperar compuestos polifenólicos del residuo de arándanos cv Legacy. Se obtuvo una mayor extracción polifenólica en general mediante la extracción acelerada de solventes. Sin embargo, la extracción con ultrasonido y la extracción con CO<sub>2</sub>-SC podrían ser opciones viables por las ventajas que presenta especialmente por ser consideradas metodologías amigables con el ambiente y utilizar solventes adecuados para la industria alimentaria.

**Palabras clave:** Pomasa, Residuos de arándano (*Vaccinium Corymbosum* cv Legacy), extracción convencional, asistida por ultrasonido, acelerada de solventes, CO<sub>2</sub> supercrítico, optimización, antocianinas, polifenoles totales, capacidad antioxidante.

## Abstract

In the blueberry juice industry, high amounts of residues are generated after juice extraction, which negatively impacts the environment. The revalorization of this raw material rich in polyphenolic compounds would allow the use of these compounds in the formulation of functional ingredients. Therefore, this study aims to optimize conventional extraction (CE), ultrasound-assisted extraction (UAE), accelerated solvent extraction (ASE) and supercritical-CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>) extraction of blueberry cv. Legacy, using as methodology a Box-Behnken design (15 experiments) for each extraction technology. For conventional extraction the effect of solvent concentration (ethanol-water 50-100% v/v), temperature (20-60°C) and extraction time (60-120 min) was evaluated. In UAE process variables were the amplitude of the process (20-90%), time (10-60 min.) and solvent concentration (ethanol-water 20-80% v/v); for ASE: solvent concentration (ethanol-water 20-80% v/v), temperature (40-60°C) and static extraction cycles (1-5) and finally for CO<sub>2</sub>-SC extraction, pressure (200-400 bar), temperature (40-60°C) and cosolvent (0-10% pure ethanol). Multiple optimizations were performed based on total polyphenols, total anthocyanins, and antioxidant activity. The following results were found, for EC: Total anthocyanins ranged from 7.33 to 12.75 milligrams cyanidin-3-glycoside equivalent (mg EC3G) /g residue and total polyphenols between 9.40 to 44.2 milligrams gallic acid equivalent (mg GAE) /g residue. The optimization indicates that, at 60°C, 84.66 min of extraction and an ethanol mixture of 50.4% v/v, it is possible to obtain a higher level of polyphenolic compounds. Regarding the ASE methodology, total anthocyanins ranged from 8.24 to 18.46 mg EC3G/g residue and total polyphenols between 16.6-46.2 mg GAE/g residue. The optimization indicates that 41.3 °C, 1cycle of extraction and a 79.8% ethanol-water mixture allow a higher level of polyphenolic compounds to be obtained. A different situation occurred with CO<sub>2</sub>-SC which showed a lower content for total anthocyanins (0.01-6.69 mg EC3G/g residue) and total polyphenols (0.10-7.50 mg GAE/g residue). The co-solvent is a factor with a positive influence on both parameters. The optimal extraction condition was 400 bar, 51.8°C and 10% cosolvent. Finally, for the UAE, total anthocyanin values ranged from 6.83 to 13.11 mg EC3G/g residue and total

polyphenols fluctuated from 9.50 to 32.40 mg GAE/g residue. These values were obtained with the combination (optimal conditions) of 90% amplitude for 10 minutes and ethanol-water mixture 57.97% v/v. In addition, using HPLC, 5 of the main individual anthocyanins present in blueberries were identified and quantified: delphinidin 3-O-glucoside, petunidin 3-O-glucoside, peonidin 3-O-glucoside, cyanidin 3-O-glucoside and malvidin 3-O-glucoside. Also, by UPLC-DAD-MS analysis 32 anthocyanins were identified. It is concluded that it is feasible to recover polyphenolic compounds from blueberry residue cv Legacy. There was an overall higher yield by accelerated solvent extraction. However, ultrasound and CO<sub>2</sub>-SC extraction could be viable options for the advantages, especially since they are considered environmentally friendly methodologies and suitable solvents for the food industry.

**Keywords:** Pomace, blueberry by-products (*Vaccinium Corymbosum* cv Legacy), conventional extraction, ultrasound-assisted extraction, accelerated solvent extraction, supercritical CO<sub>2</sub>, optimization, anthocyanins, total polyphenols, antioxidant capacity.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Antecedentes generales

El arándano es un fruto silvestre originario de los Estados Unidos pertenecientes a un grupo de arbustos perennes del género *Vaccinium* familia *Ericaceae* y subgénero *Cyanococcus* cuyos frutos suelen ser considerados como pequeños (1-3 cm de diámetro aprox.), tienen una forma esférica, poseen un color azul oscuro, su peso varía entre los 0,5 g a 4,0 g y crecen principalmente en zonas con climas templados. Se cultivan en diversas zonas del planeta como Europa, Sudamérica, Australia, Sudáfrica, Nueva Zelanda, China y Japón. La producción de arándanos ha crecido cerca del 40% en los últimos años, expandiéndose al norte de Europa, España, sudeste de Canadá, costa este de Estados Unidos, Chile, Argentina y China (INIA, 2013). No obstante, el primer productor mundial de arándanos es Estados Unidos abarcando el 90% del área productiva total junto a Canadá, aunque su producción no satisface su demanda interna. Según cifras del Departamento de Agricultura (USDA FAS, 2021) de EE.UU, el arándano es la segunda baya más consumida de este país con un significativo crecimiento del consumo per cápita de casi 816,5 gramos (1,8 libras) en 2016 debido a los evidentes beneficios que proporcionan sus principios bioactivos (BAC) (Agrimundo, 2018; Skrovankova *et al.*, 2015); convirtiéndose en el principal consumidor, por lo que necesita de importaciones internacionales, siendo Chile uno de los principales proveedor en Sudamérica y el tercer productor a nivel global como pionero del cultivo de arándanos en el hemisferio sur creando una oportunidad de crecimiento año tras año (Agrimundo, 2018).

Actualmente existe una gran variedad de arándanos cultivados. Entre las especies más relevantes para el área comercial están *Vaccinium corymbosum* o arándano alto (Highbush), *Vaccinium ashei* o arándano ojo de conejo (Rabbiteye) y *Vaccinium angustifolium* o arándano bajo (Lowbush) representando respectivamente, el 80%, 15% y 5% de la superficie total plantada (Castagnini, 2014).

Las variedades de arándano fuera de la región de origen pueden convertirse en un producto de exportación, al diversificar y ampliar su genética a partir del desarrollo de un germoplasma en el cual confluyen dos de las especies bases en la industria del arándano;

el arándano alto (*Vaccinium corymbosum*) y arándano ojo de conejo (*V. ashei*) con la introgresión de otras especies del género *Vaccinium* (*V. constablaei*, *V. darrowii* Camp, *V. elliottii* Chapm., *V. pallidum* Aiton, *V. simulatum* Small, y *V. tenellum* Aiton) (Meléndez-Jácome *et al.*, 2021). De esta manera, aumentan su valor al cambiar las características de la fruta, mejorando su adaptación a nuevos ambientes, ampliando su época de cosecha, calidad, producción, incrementado su resistencia a enfermedades y plagas, mejorar su vida poscosecha y aumentar la resistencia al transporte. Estos factores son importantes especialmente para zonas productoras alejadas como Nueva Zelanda o Chile. Algunas de estas nuevas variedades son ‘Brigitta’ en Australia y ‘Reka’ en Nueva Zelanda (INIA, 2013) y dentro de las variedades híbridas que se cultivan libremente destacan; ‘O’Neal’, ‘Georgia’, ‘Gem’ y ‘Misty’, sobresalientes por su calidad y producción. Sin embargo, existen nuevas variedades cultivadas en condiciones de suelo ligeramente más alcalinos. Por lo cual, se adaptan a características de la zona centro norte y norte de Chile mejorando la calidad de fruto en cuanto al calibre, firmeza del fruto, mejora la vida de postcosecha y almacenamiento de la fruta, entre las que se encuentra la variedad ‘Star’, ‘Biloxi’, ‘Jewel’ de cosecha temprana y ‘Southmoon’, ‘Jubilee’, ‘Reveille’ y ‘Legacy’ de cosecha de media estación, siendo que el período de producción en Chile se extiende desde noviembre hasta abril (Meléndez-Jácome *et al.*, 2021) (**Figura 1**).



Figura 1. Variedad de arándanos cultivadas en la zona central de Chile (INIA, 2013)

Para efectos del presente estudio, se utilizará una de las variedades cultivadas en la zona central de Chile, “Legacy”, cuyos frutos tienen un calibre medio, son firmes, poseen un buen sabor y una cicatriz pequeña y seca que se adapta a la cosecha mecánica (INIA, 2013).

En Chile la industria del arándano según el informe Crop Report preparado por el Comité de Arándanos de la Asociación de Exportadores de Frutas de Chile-ASOEX para la temporada 2020/2021 se registra una cosecha récord de exportación con 117000 toneladas (Agrimundo, 2021). En tanto que el volumen de producción total para la temporada 2021/2022 se estimaron un aproximado de 178000 toneladas (Chilean Blueberry committee, 2021), concentrándose la producción en la zona sur del país en las regiones del Maule, Bío Bío, Araucanía, Los Ríos y al norte, en la región Bernardo O’Higgins como se muestra en la **Tabla 1** (Agrimundo, 2017; Odepa, 2021).

**Tabla 1. Superficie de frutales por región, según fecha del catastro frutícola por hectáreas.**

Año de catastro	2019	2019	2019	2019	2019	2019	2019
Zonas cultivadas	Los Lagos	Maule	Ñuble	Bio-bío	Araucanía	Los Ríos	Aysén
Arándano Americano	970,62	5,942.75	4.023,26	1.941,24	2.157,78	1.615,56	0,45
Año de catastro	2019	2020	2020	2021	2021	2019/2020/2021	
Zonas cultivadas	Arica-Parinacota	Metropolitana	Valparaíso	Coquimbo	O’Higgins	<b>Estimado</b>	
Arándano Americano	0,35	104,87	233,61	352,58	872,54	<b>18.215,61</b>	

Fuente: Odepa., 2021.

## 1.2. Residuos de arándanos

En Chile, aproximadamente entre el 85 y el 95% del volumen total de la producción de arándanos se destina a la exportación. No obstante, en la industria se generan los conocidos descartes de exportación que generalmente se comercializan hacia plantas de

congelados y exportadoras para ser aprovechados. El arándano chileno es demandado por compradores externos concentrados en tres países principales: EE. UU., Canadá y Australia que en 2011 recibieron un aproximado del 70% del volumen exportado, especialmente para el consumo del fruto en fresco. Sin embargo, también una parte se destina a la agroindustria de congelado que siempre ha sido la principal forma de arándano procesado, representando el 20%, seguidos por los jugos (5%) y deshidratados (1%) (Chilealimentos, 2018).

De esta manera, no es difícil pensar que durante el procesamiento de la fruta se generen cantidades considerables de cáscara, bagazo y semillas, las cuales la mayoría de las veces son descartadas, siendo que la mayor parte de compuestos bioactivos del arándano se concentran especialmente en la cáscara y el bagazo, no agregándose al producto final. Al comparar esta materia prima con otros residuos generados en la agroindustria, con aquellos que provienen del procesamiento de jugo de naranja, durazno y piña, se observa que su principal ventaja con respecto a la reutilización de los residuos de arándano radica en el alto contenido de compuestos bioactivos presentes en las cáscaras. (Aldaba Marquez *et al.*, 2016)

A nivel de la industria del jugo de arándano se describe que durante el procesamiento de 6.4 toneladas/hora de arándanos frescos se generan alrededor de 1.3 ton/h de residuos agroindustriales entre cáscaras, semillas, y tallos de la fruta. Cabe destacar que durante el procesamiento de jugo de arándano alrededor del 20% queda en forma de torta/pomasa representando un problema ambiental a pesar de que representa una fuente valiosa de fitoquímicos, pectina y fibra dietética (Castagnini, 2014) y especialmente dentro de los compuestos bioactivos que poseen para efectos del presente estudio es necesario resaltar la presencia de compuestos polifenólicos, en especial las denominadas antocianinas (Aldaba Marquez *et al.*, 2016).

Como se ha mencionado anteriormente el aprovechamiento de los desechos de la industria de alimentos procesados es una problemática a nivel mundial ya que esta situación contribuye en gran medida a la contaminación del medio ambiente. Actualmente en Chile el manejo de residuos se centra en el reciclaje destinado a los rellenos sanitarios,

mejoradores de suelo y alimentos para animales, más que el enfoque de generar nuevos productos que aportarían al desarrollo sustentable del sector agroindustrial además de generar un aumento en los ingresos a las empresas, enfatizándose por lo tanto que, el uso de residuos de la industria alimentaria es de gran importancia, tanto desde el punto de vista ambiental como del económico y social (Cury *et al.*, 2017).

Por otro lado, cabe destacar que el uso de estos compuestos bioactivos se encuentra estrechamente relacionado con el mercado de los alimentos funcionales y encapsulados, debido a que ambos campos están ligados a las industrias que incorporan ingredientes bioactivos en la formulación de sus productos. Siendo el comercio de los alimentos funcionales un segmento creciente en el mercado ya que en la última década se evidencia mayor conciencia de parte de los consumidores hacia la salud y al consumo de alimentos con mayor valor agregado (Aldaba Marquez *et al.*, 2016; Cury *et al.*, 2017).

De esta manera, se plantea la oportunidad de aprovechar y mejorar la gestión de los residuos agroindustriales de la región explorando un sector económicamente atractivo con oportunidad de negocio direccionado hacia el desarrollo de nuevas materias primas para productos con un valor agregado, aportando conocimientos relevantes sobre la transformación sustentable de dichos residuos, fomentando la innovación en el sector agroalimentario.

### 1.3. Composición química de los arándanos

Según la composición nutricional, los arándanos son frutas con un bajo contenido de sodio y grasa, rica en fibra y que representan una fuente de vitamina C como se muestra en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Composición nutricional de arándano por cada 100g de fruto fresco.**

Componente	Unidad	Cantidad	Elemento	Unidad	Cantidad
Agua	g	87,4	Ácido nicotínico	mg	0,2
Proteínas	g	0,3	Ácido pantoténico	mg	12
Fibras	g	1,7	Sodio	mg	2
Calorías	Kcal.	42	Potasio	mg	72
Grasas	g	0,37	Calcio	mg	14

<b>Carbohidratos</b>	g	14	Magnesio	mg	6
<b>Vitamina A</b>	UI	30	Manganeso	mg	0,5
<b>Vitamina B1</b>	mg	0,014	Hierro	mg	0,5
<b>Vitamina B2</b>	mg	0,0024	Cobre	mg	0,26
<b>Vitamina B6</b>	mg	0,012	Fósforo	mg	10
<b>Vitamina C</b>	mg	12	Cloro	mg	4

Además, son conocidos como una fruta rica en antioxidantes con un alto contenido de compuestos fenólicos tanto en la cáscara como en la pulpa, especialmente aquellos pertenecientes a la especie highbush *Vaccinium corymbosum L* (Paes *et al.*, 2014). Por lo mismo, es importante destacar las ventajas de reutilizar residuos agroindustriales de arándano generados en el procesamiento de jugo, principalmente por su alto contenido de compuestos bioactivos en la cáscara (Aldaba Marquez *et al.*, 2016).

Estos compuestos fenólicos se caracterizan por presentar un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo y si presenta uno o varios anillos aromáticos se conocen como polifenoles. Los compuestos fenólicos pueden presentarse en forma libre o conjugada con azúcares, ácidos y otras biomoléculas. En el grupo de aquellos compuestos fenólicos solubles en agua se encuentran los ácidos fenólicos, flavonoides (flavonoles, flavanoles, flavanonas, flavonas y antocianidinas) y quinonas mientras que aquellos compuestos insolubles en agua se conocen como taninos condensados (Hernández-Carlos, Santos-Sánchez, Salas-Coronado, Villanueva-Cañongo, y Guadarrama-Mendoza, 2006). Entre estos compuestos fenólicos, por su capacidad antioxidantes se destacan los flavonoles, seguidos de las antocianinas, proantocianidinas y el ácido clorogénico (Ribera *et al.*, 2010).

Los principales polifenoles presentes en los arándanos son las antocianinas. Este grupo contribuye a la actividad antioxidante que presenta el fruto de 2 a 11 veces mayor en relación a otras bayas y frutas como la manzana y el kiwi (Su y Chien, 2007). Sin embargo, también es necesario mencionar que esta capacidad antioxidante y la composición del fruto se puede ver afectada por algunos factores que incluyen; diferencias genéticas entre especies y dentro de las mismas, condiciones de postcosecha, de procesamiento y la

madurez del fruto en la cosecha. Por ejemplo, cultivares con un aumento de madurez poseen una mayor capacidad antioxidante y mayor contenido fenólico total tanto en la piel como en la pulpa del fruto (Ribera *et al.*, 2010).

En los arándanos se identifica, además, la presencia de compuestos antioxidantes en la piel y pulpa del fruto, existiendo una amplia variación en su contenido según el genotipo estudiado. Entre los compuestos que se han detectado se encuentran Delfinidina (Df) como principal antocianidina en los cultivares de arándano alto Brigitta, Bliegold y Legacy, diferenciándose en su concentración por cada 100 gramos de fruta de la siguiente manera: cultivar Legacy (576 mg) > Brigitta (405 mg) > Bluegold (376 mg). Además, los cultivares de arándanos también contienen cantidades menores y variables de malvidina (Mv), cianidina (Cd), petunidina (Pet) y peonidina (Peo), siendo la distribución de cada aglicona variada entre los genotipos en el orden Df > Mv > Cd > Pet para Bluegold; Dp > Cy > Mv para Brigitta; y Df > Mv > Pet > Cd para Legacy. También las cantidades totales de antocianidinas (Df + Cd + Mv + Pet) en los tres cultivares de arándanos son diferentes en el orden Bluegold > Legacy > Brigitta. Sin embargo, la antocianina principal de la piel está en forma de petunidina (petunidina-3-glucósido y petunidina-3-arabinósido) seguido de malvidina-3-galactósido (Ribera *et al.*, 2010).

En la **Tabla 3**, se puede apreciar las antocianidinas más importantes en arándanos altos cv. Legacy.

**Tabla 3. Contenido y presencia de antocianidinas en el arándano alto cv. Legacy como fruta entera y piel.**

<b>Tipo de Muestra</b>	<b>Antocianidinas</b>	<b>Contenido</b>
<b>Fruta Entera</b> (mg /100 g de fruta)	Delfinidina	576,36
	Cianidina	4,27
	Petunidina	18,48
	Malvidina	27,09
<b>Piel de la fruta</b> (mg /100 g de piel)	Delfinidina	3120,00
	Cianidina	20,40
	Petunidina	95,44

	Malvidina	131,57
<b>Piel de la fruta</b> <b>(mg /100 g de fruta)</b>	Delfinidina	561,60
	Cianidina	3,67
	Petunidina	17,17
	Malvidina	23,68

Fuente: Ribera *et al.*, 2010.

## 1.4. Estructura química de las antocianinas

### 1.4.1. Estructuras primarias y secundarias de las Antocianinas

Las antocianinas (griego *anthos*: flor y *kianos*: azul oscuro) son pigmentos vegetales solubles en agua y forman parte de compuestos fenólicos como subgrupo de flavonoides (Rein y Yliopistopaino, 2005).

Su estructura química está dada por el 2-fenilbenzopirilio de la sal de flavilio, el cual posee ocho dobles enlaces conjugados responsables de la absorción de la radiación a los 500 nanómetros. Están formadas por quince átomos de carbono (C6-C3-C6) dispuestos en dos anillos bencénicos: un anillo-A benzoil y un anillo-B hidroxicinamoil, unidos por un anillo pirano de tres carbonos y un oxígeno (**Figura 2**). Estos compuestos son conocidos por su capacidad de impartir colores rojo, azul, púrpura y se les pueden encontrar en las bayas otorgando características diferentes, es así que el color específico de cada antocianina va a depender del número y orientación de los grupos hidroxilos y metoxilos. Por lo tanto, un incremento en la hidroxilación produce un color azul, mientras que un incremento en la metoxilación produce un color rojo (Yonekura-Sakakibara K *et al.*, 2009).

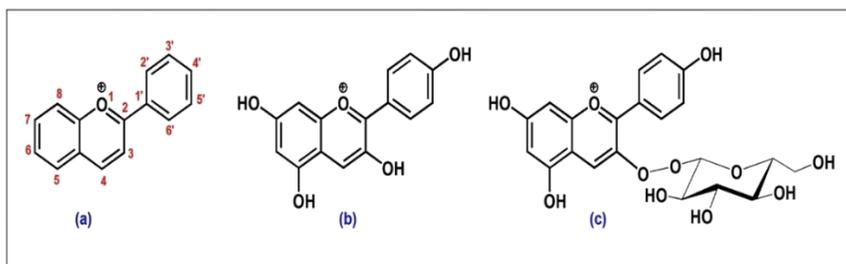


Figura 2. (a) Cation flavilio: estructura general y numeración; (b) Pelargonidina (antocianidina); (c) Pelargonidina-3-O-glucósido (antocianina).

### 1.4.2. Antocianinas glicosiladas

Las antocianinas además existen como derivados polihidroxi/polimetoxi glicosilados del catión flavilo (Prior y Wu, 2006).

Cuando el residuo de azúcar es hidrolizado se obtiene una aglicona, llamada antocianidina. De todas las antocianidinas que se conocen aproximadamente 20 se encuentran en la naturaleza, siendo sólo seis de ellas comunes en la mayoría de los alimentos, la cianidina, la delfinidina, la petunidina, la peonidina, y la malvidina cuyos nombres se derivan de la fuente vegetal de las cuales se extrajeron por primera vez. Los glicósidos más frecuentes son el: 3-monósido, 3-biósido y 3-triósido, además el 3,5-diglicósido y menos común el 3,7-diglicósido a través de enlaces o-glicosídicos con glucosa y ramnosa, galactosa, xilosa, arabinosa (uno de los más frecuentes), además de la rutinosa, gentiobiosa, soforosa, glicosilrutinosa y xilosilrutinosa. Las uniones a azúcar de las antocianinas se ubican en el anillo-B3' y 5'-hidroxilos confiriéndole a la molécula gran solubilidad y estabilidad. Además, como resultado de la combinación con los diferentes azúcares se generan aproximadamente un total de 150 antocianinas, cuya estabilidad se rige por el azúcar que se encuentre unido a la molécula, así por ejemplo, la glucosa es más estable que la galactosa y esta a su vez más estable que la arabinosa (Hidalgo y Almajano, 2017; Aguilera M, Reza M, Chew R y Meza J, 2011; Prior y Wu, 2006).

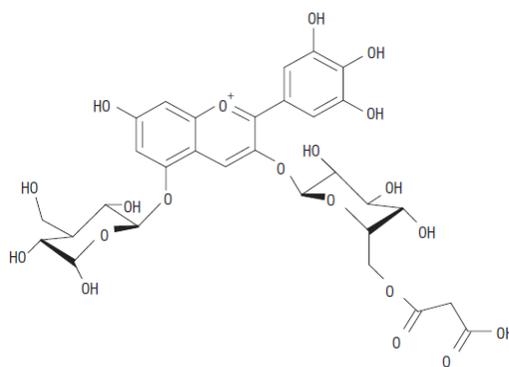


Figura 3. Estructura química de una antocianina acilada; Delfinidina-3- malonylglucósido-5-glucósido (Bakowska-Barczak, 2005)

### 1.4.3. Antocianinas aciladas

Por otro lado se pueden introducir moléculas aciladas siendo una de las modificaciones más comunes de los metabolitos secundarios de las plantas (Yonekura-Sakakibara K, Nakayama T, Ymazakik M y Saito Kazuki, 2009) cuyos azúcares se encuentran ligados a ácidos de tipo orgánico aromático o alifáticos mediante grupos éster en posición C3 o C6, siendo los grupos comunes de acilo, los ácidos aromáticos sustituidos frecuentemente en el anillo B del catión flavylum que en el anillo A, especialmente los ácidos hidroxicinámicos: p-coumárico, cafeico, sinápico, ferúlico y el hidroxibenzoico que son compuestos derivados del ácido hidroxicinámico como el ácido galénico también pueden estar ligados (**Figura 4**), mientras que los ácidos alifáticos más comunes son el ácido malónico, succínico, oxálico y málico (**Figura 5**), incrementando de esta manera la diversidad estructural de las antocianinas. Tanto los grupos acilo aromáticos como alifáticos están vinculados a las 6 posiciones de los grupos glucosados (**Figura 3**) (Prior y Wu, 2006; Rein y Yliopistopaino, 2005; Hidalgo y Almajano, 2017).

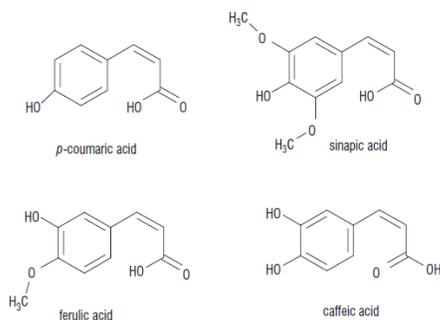


Figura 4. Estructura química de los ácidos cinámicos más comunes presentes en las antocianinas aciladas (Bakowska-Barczak, 2005)

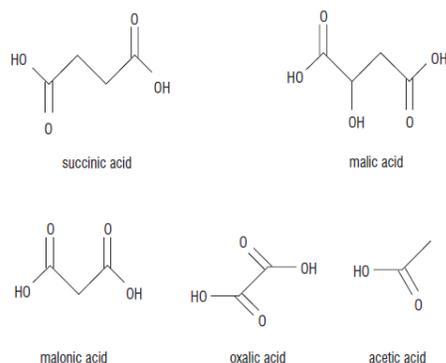


Figura 5. Estructura química de los ácidos alifáticos más comunes presentes en las antocianinas aciladas (Bakowska-Barczak, 2005)

Esta acilación permite que las antocianinas se encuentren disueltas de manera estable en soluciones ácidas vacuolares epidérmicas en diferentes órganos de las plantas, tales como frutas, flores, tallos, hojas y raíces de frutas rojas (bayas y uvas rojas) y en cereales (maíz morado). Además, en ciertas especies, las antocianinas pueden ser localizadas en regiones discretas de la vacuola celular, llamadas antocianoplastos (Aguilera M, Reza M, Chew R y Meza J, 2011; Mohamed *et al.*, 2016; Yonekura-Sakakibara K *et al.*, 2009). Esta modificación con grupos acilos aromáticos múltiples (poliacilación) constituye un pilar fundamental en el transporte selectivo de las antocianinas en las vacuolas siendo el grupo carboxilo terminal de los sustituyentes acilo dicarboxílicos el responsable de mantener la acidez de los contenidos vacuolares al actuar como buffer y contribuyendo de la misma manera a la estabilización de la coloración en las células vegetales (Cavalcanti *et al.*, 2011). Por otro lado, la acilación alifática no altera intrínsecamente los espectros de absorción de los antocianos, no obstante, se mejora la estabilidad de la coloración de antocianinas. Finalmente, la acilación confiere estabilidad catabólica en el tejido vegetal debido a que se previene la degradación por las glucosidasas, polifenoloxidasas y peroxidasas en el almacenamiento (Francis y Markakis, 1989), ya que la mayoría de estas no pueden actuar sobre los glucósidos acilados, confiriéndole a la molécula un carácter más apolar y mayor estabilidad ante condiciones extremas de pH y temperatura debido a su particular estructura química ya que con la acilación de los azúcares se genera una rotación libre de los grupos acilo sobre la molécula, generando un fenómeno de sandwich

(apilamiento o plegamiento intramolecular). Este fenómeno provoca un efecto protector sobre las antocianinas ya que las cadenas del sacárido pueden actuar como conectores que permiten dicho plegado de los anillos acilo aromáticos sobre el anillo pirilio de la molécula de antocianina, contribuyendo a la estabilización del color del sistema además de proteger al cromóforo del ataque nucleofílico del agua y posterior formación de una pseudobase o una chalcona, especialmente en medios neutros o ligeramente ácidos (Cavalcanti *et al.*, 2011; Kähkönen y Heinonen, 2003); sin embargo, existe mayor estabilización del color en las antocianinas aromáticas que las antocianinas alifáticas y dentro de este grupo aquellas antocianinas aciladas con ácido p-cumárico son menos estables que las aciladas con ácido caféico (Bakowska-Barczak, 2005; Mulinacci y Innocenti, 2012).

Además, las antocianidinas dan lugar a estructuras secundarias conocidas como formas de equilibrio en función al pH, estas son estructuras que poseen propiedades individuales exclusivas del color y estabilidad, entre las que se encuentran: cationes flavilio (FC) con un pH 0.5-color rojo-, carbinol (PB) a un pH de 4-5.5 –intensidad baja por la presencia de especies incoloras-, chalcona (CH)-color amarillo- y la base quinonoidal (QB) con un pH superior a 5-azules o violetas- (**Figura 6**) (Wrolstad, 2010).

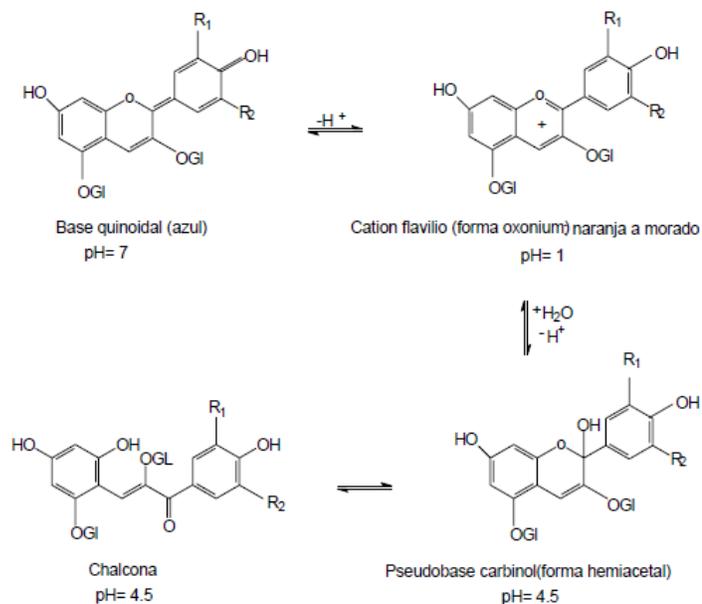


Figura 6. Formas de equilibrio de la antocianina en función al pH (Lee y Wrolstad, 2010).

## **1.5.Estabilidad de las antocianinas**

En la industria alimentaria se evidencia un creciente interés en el reemplazo de los colorantes artificiales o sintéticos por el desarrollo de colorantes extraídos de fuentes naturales debido a su posible asociación con diferentes condiciones de salud lo que posiciona a las antocianinas como candidatas ideales en la alimentación debido a los pigmentos atractivos que ofrecen en todo el reino vegetal (Zapata *et al.*, 2014).

Por lo tanto, es de importancia conocer los factores que afectan a la estabilidad y a la actividad radical de antocianinas, agliconas y glicósidos para su aplicación efectiva tanto para su extracción como en su almacenamiento, ya que bajo condiciones normales de procesamiento y almacenamiento se convierten en compuestos incoloros y posteriormente insolubles, por algunos mecanismos de degradación como la hidrólisis, oxidación y condensación con otros polifenoles (Dai *et al.*, 2009). En base a esto, los factores principales a considerar incluyen: la solubilidad, la inestabilidad a la luz, temperatura, susceptibilidad a reacciones degenerativas (ácido ascórbico), pH, capacidad quelante y antioxidante. (Van Acker *et al.*, 1996).

### **1.5.1. Solubilidad**

Las antocianinas son moléculas insolubles en disolventes orgánicos apolares, solubles en alcoholes, acetona y agua, debido a la presencia de azúcares ricos en grupos OH en su estructura lo cual le confiere a la molécula un carácter polar, por lo que un método usual de extracción es la sólido-líquido, sin embargo su estabilidad se afecta por la presencia de modificaciones estructurales con grupos hidroxilo, metoxilo, glicósidos y grupos acilos, disminuyendo su solubilidad en agua, por lo tanto la tasa hidrolítica de los glicósido de las antocianinas no depende de la estructura del aglicón sino del tipo de estructura del azúcar conjugado (Ichiyanagi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2017). Es importante mencionar que la glicosilación le confiere estabilidad a las antocianidinas al enlentecer el proceso de la velocidad de hidrólisis en condiciones ácidas, incrementar la energía de activación con lo cual se evita la formación de compuestos incoloros como efecto de una hidratación desequilibrada y mediante la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares (Yonekura-Sakakibara K *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2014).

### 1.5.2. pH del medio

En medios con un pH elevado (básico) las antocianinas sin grupos acilo son ionizables debido a la hidratación del núcleo de antocianidina flavilio en la posición C-2 (Zhao *et al.*, 2014), es así que, la inestabilidad y el cambio de color que se producen con valores superiores a un pH 4 (Wrolstad, 2010). La presencia de grupos acilo en la molécula de antocianidina le confiere estabilidad en condiciones extremas de pH y temperatura, además se aprecia un alto grado de reactividad química por la presencia del átomo de oxígeno del anillo pirano (Cavalcanti *et al.*, 2011). Se sabe también que la forma de catión flavilio de la antocianidina es inestable en un pH neutro, alcalino, alta temperatura y luminosidad (Ichyanagi *et al.*, 2002) y a pesar de que la base quinoidal es la única forma coloreada existente a pH superior a 5 se degrada fácilmente y existe en porcentajes mínimos (Francis y Markakis, 1989; Aguilera *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2014; Wrolstad, 2010).

### 1.5.3. Propiedad quelante y antioxidante

Las antocianinas debido a su estructura química se caracterizan por tener una deficiencia de electrones, lo cual les confiere reactividad frente a los radicales libres, por tanto son considerados como potentes antioxidantes naturales, estas propiedades son atribuidas a la capacidad que tienen para secuestrar radicales libres en sistemas biológicos, además pueden donar hidrógenos o electrones a los radicales libres, también los atrapan y desplazan en su estructura aromática, lo que las hace muy reactivas frente a los radicales libres presentes en el cuerpo, al donar  $H^+$  y  $e^-$  a los radicales libres nocivos en los sistemas biológicos contra peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales de tipo peróxido, ( $ROO\bullet$ ), superóxido ( $O_2\bullet$ ), hidroxilo ( $-OH$ ) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) (Zapata *et al.*, 2014). Adicionalmente, se ha demostrado que la acilación con ácidos cinámicos eleva la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) mientras que la sustitución glicosídica influye en la actividad de ORAC de manera impredecible (Wrolstad, 2010) reduciendo la capacidad donante de hidrógenos restringiendo la capacidad antioxidante de las antocianinas (Zhao *et al.*, 2014; Ichyanagi *et al.*, 2002). Asimismo, las antocianinas

reaccionan con los metales (estaño, cobre, hierro) formando complejos de un color azul estable mientras aquellos metales divalentes no formarán complejos coloreados. El pH es crítico (pH 3.0 a 3.5) en presencia de iones de hierro, aluminio y quelatos metálicos de estaño, titanio, cromo, uranio y plomo ya que cualquier variación cambiará de color al complejo formado (Francis y Markakis, 1989), además al reducirse la disponibilidad de grupos OH por glicosilación también se reducirá la capacidad quelante de las antocianinas (Zhao *et al.*, 2014; Cavalcanti *et al.*, 2011).

#### **1.5.4. Temperatura**

Existe una rápida disminución de los pigmentos a altas temperaturas debido a que en la degradación de las antocianidinas se favorece la formación de chalcona de color amarillo después de la apertura del anillo heterocíclico generando productos pardos provenientes de las antocianinas originales, igualmente la hidrólisis del azúcar puede ser parte de la degradación (Francis y Markakis, 1989) (Cavalcanti *et al.*, 2011).

#### **1.5.5. Luz**

La luz tiene efectos perjudiciales sobre las antocianinas en cuanto a su degradación, sin embargo, la fotoestabilidad de estos componentes pueden mejorar por el efecto que tiene la unión de un hidrógeno en la unión iónica entre los sulfonatos de ión negativo y la flavilio deficiente de electrones, es decir, mediante la adición de polihidroxi flavonoles sulfonados, poli (hidroxialquil) flavonoles, auronas sulfonadas, polihidroxi flavonas sulfonados y sulfatadas. (Francis y Markakis, 1989)

#### **1.5.6. Ácido ascórbico y oxígeno**

Al igual que la temperatura, el oxígeno acelera la degradación de las antocianinas, mientras que con la interacción del ácido ascórbico se genera una destrucción mutua. El ácido ascórbico activa el oxígeno mediante la presencia de peróxido de hidrógeno ya que uno de los mecanismos de oxidación del ácido ascórbico produce peróxido que actúa como blanqueador de antocianinas. Sin embargo, aquellas estructuras aciladas pueden

incrementar su estabilidad en presencia del ácido ascórbico. Los compuestos oxidados del medio pueden además reaccionar con las antocianinas y provocar la degradación hacia productos incoloros o marrones (Francis y Markakis, 1989; Rein y Yliopistopaino, 2005). Además existe evidencia de que los flavonoles retardan la oxidación del ácido ascórbico debido a que estos compuestos aceptan radicales libre y actúan como copigmentos reduciendo la formación de complejos entre las antocianinas y el ácido ascórbico teniendo un efecto estabilizador (Francis y Markakis, 1989; Rein y Yliopistopaino, 2005). Por otro lado, en los alimentos el oxígeno incrementa la tasa de degradación de los azúcares, siendo los productos de degradación los encargados de reaccionar con las antocianinas formando compuestos marrones degradando el pigmento (Wang *et al.*, 2016; Kelly *et al.*, 2002).

### **1.6. Propiedades funcionales de los arándanos y antocianinas**

Las antocianinas se caracterizan por poseer una amplia gama de efectos sobre la salud humana que incluyen:

- Beneficios para la salud ocular evitando la aparición de enfermedades degenerativas como las cataratas, tienen efecto positivo en la pigmentación de la retina y la visión nocturna y sobre la capacidad de regeneración, además actúan contra la inflamación retinal, la degeneración macular, retinitis pigmentaria y el glaucoma (Aguilera *et al.*, 2011).
- También tendrían un papel importante en el cerebro aumentando la capacidad cognitiva, reduciendo el riesgo de demencia y los efectos del Alzheimer, evitando la inflamación del cerebro, aumentando las células cerebrales en el hipocampo y en regiones cerebrales encargadas de la memoria y se vinculan a la prevención de enfermedades como la depresión (Skrovankova *et al.*, 2015).
- Mejoran la elasticidad y contractibilidad de los vasos sanguíneos, regulan los niveles de colesterol y glucosa en sangre, evitan la acumulación de grasa abdominal y reducirían la prevalencia de enfermedades coronarias, cerebrovasculares y cardiovasculares (Wrolstad, 2010).

- Poseen efectos antiinflamatorios ya que se ha demostrado su capacidad en la inhibición de óxido nítrico en macrófagos activados, además de eliminar el efecto provocado por prostaglandina EG2. Además, en estudios clínicos se ha demostrado que la cianidina conjugada con glucosa y ramnosa actúa en la suspensión de la actividad cancerígena de las células HCT-15 (inhibiendo las etapas de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis) que provienen del colon humano y de células gástricas cancerígenas, otorgándoles a las antocianinas un gran potencial anticancerígeno (AGS) (Kong *et al.*, 2003).
- Presenta efectos antioxidantes que, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas, se asocia a la prevención de algunas enfermedades (Stevenson y Scalzo, 2012). Esta capacidad antioxidante se atribuye a la particular estructura química que poseen los polifenoles siguiendo el orden de flavonoles > antocianinas > proantocianidinas > ácido clorogénico (Wang *et al.*, 2016).

Los compuestos bioactivos se relacionan con el mercado de los alimentos funcionales y encapsulados ya que se encuentran ligados a estas industrias por incorporar dichos ingredientes en la formulación de algunos productos. El comercio de estos alimentos funcionales ha tenido un aumento significativo en la última década, debido a la mayor conciencia de las personas por el cuidado de su salud. Los consumidores tienen interés en el arándano como fuente de compuestos fenólicos y fitoquímicos ya que también es una fruta con muchas características deseables desde el punto de vista nutricional, por lo que se han convertido en uno de los factores importantes para este crecimiento. Además, las propiedades de aquellos compuestos que se obtienen a partir de residuos de la industria satisfacen la demanda mundial de productos con propiedades funcionales, se puede decir entonces que, a partir de una materia prima de bajo valor, se pueden obtener productos de alto valor comercial (Agrimundo, 2013; Cervantes Ceja, 2009).

Además de las propiedades nutritivas y benéficas para la salud, las antocianinas son un grupo de pigmentos hidrosolubles, que gracias a esta propiedad se facilita su

incorporación en numerosos sistemas alimentarios acuosos (Ribera *et al.*, 2010; Heras *et al.*, 2013).

Generalmente, las antocianinas son usadas en alimentos de acidez intermedia ( $\text{pH} < 3$ ) debido a la transformación que se presentan en las formas de equilibrio de  $\text{pH}$ , ya que con esta acidez se asegura un predominio del catión flavilio dando como resultado una concentración adicional que tiene un efecto en la estabilización del sistema, de esta manera cuando la concentración de antocianinas alcanza valores altos se presentan fenómenos de auto asociación entre dos cationes flavilio protegiendo a la molécula de antocianina de un ataque nucleofílico. No obstante, se presenta una restricción en el uso de productos naturales debido a su estabilidad relativamente baja a diversas condiciones de procesamiento, formulación y almacenamiento, dando como resultado características indeseables de olor o sabor. Sin embargo, la capacidad de acilación de las antocianinas hace que la molécula resista la hidratación, presenta baja sensibilidad a los cambios de  $\text{pH}$ , una mayor estabilidad al calor y a la luz; y por esta razón, son adecuadas no solo para alimentos con  $\text{pH}$  bajo sino también para productos neutros y ligeramente alcalinos como; los lácteos, postres en polvo y listos para comer, por lo que son consideradas como las mejores candidatas para colorantes alimentarios para ser incorporados y desarrollados dentro de suplementos alimenticios dietéticos, bebidas y alimentos funcionales porque a mayor estabilidad y aumento en la vida útil, se pueden aumentar las aplicaciones en productos alimenticios comerciales, el consumo total del componente bioactivo y con esto incrementar el efecto beneficioso para la salud (Aguilera M, Reza M, Chew R y Meza J, 2011).

### **1.7.Extracción de antocianinas**

Para obtener los compuestos bioactivos presentes en la fruta o sus residuos es necesario extraerlos desde la materia prima. Diversos autores en sus estudios han encontrado resultados interesantes a partir del análisis de extractos de arándano y sus residuos utilizando diferentes técnicas y tecnologías de extracción como se muestra en la **Tabla 4**. Por ejemplo, Gao y Mazza (1994) identificaron 25 tipos de antocianinas tanto simples

como aciladas en arándanos highbush, encontrando concentraciones de aproximadamente 110 mg de antocianinas/ 100 g de fruto entero fresco con cinco tipos de antocianidinas (cianidina, delfinidina, malvidina, petunidina y peonidina) y sus combinaciones con glucosa, galactosa y arabinosa en posición C3, siendo la delfinidina 3-glucósido aquella antocianina con la concentración más alta. Por otra parte, el residuo de arándano fue estudiado por White *et al.* (2010, 2011), quien encontró medias entre 121,4 y 362,5 mg de antocianinas/ 100 g de fruto en seco e identificó 6 antocianinas con contenido más bajos que el contenido de antocianinas presentes en el orujo de arándanos. Por otro lado, con respecto al contenido total de antocianinas, el residuo de arándanos retuvo un alto porcentaje relativo a la fruta entera (aproximadamente 88%). Lee y Wrolstad (2004) encontraron que aproximadamente el 82% del total de antocianinas estaban contenidos en la cáscara de los arándanos highbush, lo que demuestra que los compuestos se concentran preferentemente en la cáscara de la fruta, como lo sugiere su intenso color azul en relación con la pulpa. El jugo, a su vez, tenía una baja concentración de antocianinas, con malvidina-3-glucósido como el principal compuesto (Reque *et al.*, 2015).

De igual manera en el estudio realizado por Paes *et al.*, 2014 se demuestra que los extractos de los residuos de arándanos poseen mayor concentración de antocianinas, lo que puede explicarse por el hecho de que estos compuestos están más concentrados en la cáscara que en la pulpa de la fruta, lo que demuestra la riqueza de los residuos de arándanos. Asimismo, Chunyang L *et al.*, 2013 al analizar extractos obtenidos por SFE y PLE en residuos de arándanos logró identificar 16 antocianinas, de las cuales, cianidina 3-O-glucósido fue la mayoritaria, lo que evidencia la gran complejidad de la composición de extractos de residuos de arándanos. Esto refuerza la importancia de usar este subproducto en nuevas formulaciones.

**Tabla 4. Antocianinas presentes en arándano como fruto fresco y residuos**

Referencia	Matriz Vegetal	Método de Extracción	Principales Antocianinas
			Antocianinas Glicosiladas (mg/100g de arándano)
			Delfinidina 3-galactósido (10,31)
			Delfinidina 3-glucósido (6,92)
			Cianidina 3-galactósido (1,97)
			Delfinidina 3-arabinósido (12,52)
			Cianidina 3-glucósido (0,70)
			Petunidina 3-galactósido (5,47)
			Cianidina 3-arabinósido (1,81)
			Petunidina 3-glucósido (5,26)
			Peonidina 3-galactósido (0,70)
			Petunidina 3-arabinósido (5,15)
			Peonidina 3-glucósido (0,50)
			Malvidina 3-galactósido (17,38)
			Malvidina 3 glucósido (12,58)
			Antocianinas Aciladas mg/100 g de arándano
			Delfinidina-3 galactósido (0,7)
			Delfinidina-3 glucósido (3,30)
			Cianidina-3 galactósido (0,12)
			Cianidina-3 glucósido (1,93)
			Cianidina-3 arabinósido (0,69)
			Petunidina-3 galactósido (1,93)
			Peonina-3 galactósido (0,07)
			Peonina-3 galactósido (0,04)
			Peonina-3 glucósido (0,35)
			Malvidina-3 galactósido (2,40)
			Malvidina-3 glucósido (4,00)
(Gao y Mazza, 1994)	<i>Vaccinium corymbosum</i> cv <i>Bluecorp</i> (Fruto fresco)	Extracción sólido-líquido	

<b>(L. Zapata, Heredia, et al., 2014)</b>	<i>Vaccinium corymbosum</i> (Fruto fresco)	Extracción sólido-líquido	Antocianinas (mg/100 g de arándano)	
			Delfinidina-3-galactósido	(1,1)
			Delfinidina-3-glucósido	(5,3)
			Cianidina-3-galactósido	(43,2)
			Cianidina-3-glucósido	(1,1)
			Cianidina-3-arabinósido	(1,1)
			Peonidina-3-glactósido	(29,5)
			Malvidinia-3-glucósido	(13,7)
<b>(Bener et al., 2013)</b>	<i>Vaccinium corymbosum</i> (Pomasa del fruto)	Hidrólisis Ácida	Antocianinas (µg/g de pomasa)	
			Delphinidin galactósido	(173,9±2,7)
			Delphinidin glucósido	(70,3±2,7)
			Cianidina galactósido	(314,4±77,3)
			Delphinidina arabinósido	(74,1±16,9)
			Petunidina galactósido	(211,1±11,2)
			Cianidina arabinósido	(442±13,8)
			Petunidina glucósido	(1408,9±88,3)
			Malvidina galactósido	(473,7±27,6)
Peonidina glucósido	(1192,2±75,5)			
<b>(Luchese, Garrido, et al., 2018)</b>	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Extracción sólido-líquido	mg antocianina/g de bagazo seco	
		Polvo de residuo (310,7 µm)	17,4 ±0,3	
		Extracción sólido-líquido	mg antocianina/g de bagazo seco	
		Polvo de residuo (87,23 µm)	31 ±1,04	
			mg antocianina/kg de peso en fresco	

<b>(Cho et al., 2004)</b>	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Extracción sólido-líquido	Delfinidina 3-galactósido	(188,5±22,1)
			Delfinidina 3-glucósido	(126,4±15,2)
			Cianidina 3-galactósido	(35,6±3,4)
			Delfinidina 3-arabinósido	(163,1±19,7)
			Cianidina 3-glucósido	(20,2±2,0)
			Petunidina 3-galactósido	(113,3±14,5)
			Cianidina 3-arabinósido	(26,1±2,6)
			Petunidina 3-glucósido	(111,4±14,2)
			Peonidina 3-galactósido	(13,8±0,9)
			Petunidina 3-arabinósido	(81,9±12,1)
			Malvidina 3-galactósido	(159,8±25,0)
			Malvidina 3-glucósido	(153,3±22,0)
			Malvidina 3-arabinósido	(144,0±22,0)
			Peonidina 3-arabinósido	(6,4±0,5)
			Delfinidina 3 acetil glucósido	(27,9±4,1)
			Petunidina 3 acetil glucósido	(15,8±3,3)
Malvidina 3 acetil glucósido	(36,1±4,6)			
			Antocianinas aciladas desconocidas	(11,6±2,2)
			mg antocianina/100 g de fruto fresco	
			282 ± 3,3	
<b>(Paes et al., 2014)</b>	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Extracción con solventes presurizados	mg antocianina /100 g de residuos frescos	
			21,8 ± 0,1	
			mg antocianina /100 g de liofilizado de residuos	
			14,2 ± 0,7	
			mg de antocianina/100 ml de extracto	

<b>(Avram et al., 2017)</b>	<i>Vaccinium corymbosum</i> (Pomasa del fruto)	Extracción Acelerada de Solventes (ASE)	Delfinidina 3-galactósido	(8,7)
			Delfinidina 3-glucósido	(5,0)
			Cianidina 3-galactósido	(0,8)
			Delfinidina 3-arabinósido	(7,2)
			Cianidina 3-glucósido	(0,4)
			Petunidina 3-galactósido	(4,7)
			Cianidina 3-arabinósido	(0,6)
			Petunidina 3-glucósido	(4,0)
			Peonidina 3-galactósido	(0,9)
			Petunidina 3-arabinósido	(3,3)
			Malvidina 3-galactósido	(9,4)
			Malvidina 3-glucósido	(7,8)
			Malvidina 3-arabinósido	(6,4)
			Delfinidina 3 acetil glucósido	(0,6)
			Petunidina 3 acetil glucósido	(0,3)
Malvidina 3 acetil glucósido	(0,9)			
mg antocianina/ g de residuo seco				
<b>De Fonseca et al., 2017</b>	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Extracción de Líquidos Presurizados (PLE)	Cianidina 3-galactósido	(0,19±0,04)
			Cianidina 3-glucósido	(0,10±0,05)
			Cianidina 3-arabinósido	(0,02±0,02)
			Delfinidina 3-galactósido	(0,01±0,01)
			Delfinidina 3-glucósido	(0,10±0,05)
			Petudinina 3-glucósido	(0,01±0,02)
			Petudinina 3-galactósido	(0,10±0,01)
			Petudinina 3-arabinósido	(0,01±0,01)
			Peonidina 3- glucósido	(0,10±0,01)
			Malvidina 3-galactósido	(0,18±0,03)
			Malvidina 3-glucósido	(0,15±0,02)
Malvidina 3-O-arabinósido	(0,06±0,01)			

En este contexto, la extracción sólido-líquido es el método usual para extraer antocianinas debido al carácter polar que presenta este tipo de molécula. Sin embargo, para garantizar la estabilidad del extracto y su concentración es importante tomar en cuenta la relación sólido-líquido, temperatura, tiempo, tipo de disolvente, concentración de disolvente, tamaño de partícula (Silva *et al.*, 2017) y modificación estructural de la molécula con grupos hidroxilo, metoxilo, glucósidos y grupos acilos, de esta manera se maximiza la extracción del pigmento minimizando la presencia de compuestos indeseables, así como también se limitan los mecanismos de degradación del extracto (Prior y Wu, 2006). No obstante, la extracción comúnmente se realiza con metanol o etanol y con la adición de ácido (15% HCl 1M, lo cual permite obtener la forma del catión flavilio (estable en un medio altamente ácido). Sin embargo, no se ha reportado diferencia significativa de absorbancia o eficiencia de extracción entre el etanol y el metanol. Cabe mencionar que, el ácido añadido puede causar hidrólisis parcial de las fracciones acilo en aquellas antocianinas aciladas, especialmente de ácidos como; el malónico, por lo que se debe escoger un ácido débil para la extracción para mantener los sustituyentes dicarboxílicos intactos (Aguilera *et al.*, 2011).

Además, para la extracción de antocianinas a partir de desechos sólidos se utilizan tecnologías convencionales y alternativas, entre los métodos convencionales destacan la extracción Soxhlet, la maceración, la extracción por infusión y la destilación de vapor especialmente a escala industrial, mientras que la extracción de fluidos supercríticos (SFE), la extracción de líquidos presurizados (PLE) y la asistencia con ultrasonido son técnicas alternativas amigables con el medio ambiente (**Tabla 5**) (Hidalgo y Almajano, 2017)

**Tabla 5. Ventajas y Desventajas de los diferentes métodos de extracción**

<b>Método de Extracción</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Maceración</b>	No necesita energía adicional	Tiempos muy largos de extracción
<b>Extracción con Solventes</b>	Utilizado a escala industrial y muy conocido	Tiempos largos de extracción, algunos solventes no son válidos para la industria alimenticia ni cosmética.
<b>Asistida por ultrasonido</b>	Alta eficiencia (disminuye el tiempo de extracción y el consumo del solvente). Extracción segura de compuestos termolábiles. Método simple y amigable con el ambiente.	Procedimiento costoso
<b>Asistida por microondas</b>	Calentamiento más rápido. Reducido tamaño del equipo y no se necesita solvente agregado. Adecuado para compuestos térmicamente inestables.	Riesgo de quemar la muestra y compuestos desnaturizantes.
<b>Extracciones con presiones asistidas</b>	SFE-CO <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub> no tóxico, extracción en ausencia de aire y extractos ligeros muy puros. Adecuado para ser combinado con otras técnicas. Método considerado como limpio.	Procedimiento costoso
<b>Campos eléctricos pulsados</b>	Adquirida por la industria alimentaria para su proceso de innovación.	Necesidad de equipos muy especializados.

Fuente: (Wang *et al.*, 2016; Diez-Sánchez *et al.*, 2021)

### 1.7.1. Extracción con Solventes Convencionales

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles, por lo cual para su extracción se utilizan generalmente solventes como agua, etanol, metanol y acetona de manera individual o en mezclas. Existen dos tipos: la maceración donde la extracción de sustancias antioxidantes es producto de la liberación de disolvente sin aplicación de calor durante largos periodos de tiempo y la extracción con solventes (SE) en un fenómeno de transferencia de masa que tiene por objetivo separar uno o más componentes contenidos en una fase sólida (solutos) utilizando una fase líquida (disolvente), que al aplicar calor y una variedad de solventes acorta el tiempo de extracción (**Figura 7**) (Hidalgo y Almajano, 2017).



Figura 7. Difusión del soluto en el disolvente

Para facilitar la liberación, solubilización y estabilización de antocianinas del tejido de la fruta (Dai *et al.*, 2009), el solvente puede ser acidulado en una cantidad del 1% de ácido clorhídrico o acético. Además para la extracción de compuestos fenólicos se utiliza una mezcla de agua y alcohol, especialmente etanol con una composición que varía del 40%-70% agua-EtOH debido a que los rendimientos de extracción presentan mayor efectividad comparada con la acetona, hexano, acetato de etilo y metanol (Silva *et al.*, 2017). Numerosos estudios sugieren que en los sistemas de extracción de polifenoles utilizando solventes con una variación del 0% a 50% de agua, la actividad oxidasa se retiene y contribuye a la condensación de antocianinas durante la extracción (Hidalgo y Almajano, 2017). Además, posee asequibilidad económica, es reconocido como seguro y tiene un enfoque en la química verde ya que proviene de una fuente renovable. Por otro lado, es importante estudiar la relación sólido-solvente considerando que al aumentar la relación se utilizará menos solvente con una mayor concentración de compuestos antioxidantes en

el extracto, aunque si se presenta escasez de solvente la transferencia de masa se obstaculiza (Zapata, Carcel, *et al.*, 2014). La temperatura juega un papel importante en la extracción ya que, al aumentar este parámetro disminuye el tiempo de extracción y viceversa. Los aumentos de temperatura de 25 ° C a 40 ° C en un tiempo de 15 minutos pueden aumentar el rendimiento de la extracción hasta en un 20% debido a la mayor solubilidad de los polifenoles en el solvente, mayor velocidad de difusión de las moléculas extraídas y el mejoramiento de la transferencia de masa (Hidalgo y Almajano, 2017; Patil *et al.*, 2009). Cabe destacar entonces, que con el aumento del contacto entre el disolvente y el tejido más completa será la difusión de partículas sólidas al líquido hasta alcanzar un equilibrio de partición (Silva *et al.*, 2017). La temperatura juega un papel importante en función de la acción cooperativa que tiene con el tiempo, es así que al aumentar la temperatura disminuye el tiempo de extracción y viceversa para obtener la misma cantidad de antioxidantes. Así, a una temperatura de 70 ° C disminuye la cantidad de antocianinas con el tiempo debido a su degradación térmica ya que las altas temperaturas en conjunto con la exposición al oxígeno molecular degradan estos compuestos bioactivos en los frutos rojos (Silva *et al.*, 2017). Por ejemplo, Wang y Xu, 2007 y Aurélio *et al.*, 2008 observaron que el calentamiento a una temperatura de 90° C sobre mora y pulpas de hibisco reduce el 80% de la vida media de antocianinas produciendo niveles bajos de antocianinas después de seis horas.

Es importante mencionar que la sensibilidad de las antocianinas aumenta cuando están presentes en los extractos, así se demuestra en el trabajo propuesto por Cacace y Mazza, 2002 en donde la mejor temperatura para extracción de antocianinas en las grosellas negras osciló entre los 30-35 ° C, observando que a temperaturas más altas existe degradación por el calor dando como resultado menores contenidos de estos compuestos (Silva *et al.*, 2017). Por otro lado, Gorriti Gutierrez *et al.*, 2009 describieron las condiciones de extracción de antocianinas a partir de corontas de maíz mora con soluciones etanólicas al 20 % y pH 2 obteniendo que las mejores condiciones de extracción están determinadas por una temperatura de 75°C a un tiempo de extracción de entre 120 y 240 minutos (Zapata *et al.*, 2014). Fan *et al.*, 2008 realizaron una investigación

sobre la extracción de antocianinas presentes en batata o camote morado con soluciones etanólicas acidificadas con ácido clorhídrico obteniendo las mejores condiciones de proceso a una temperatura de 80 °C, relación sólido- líquido 1:32 y tiempo de extracción 60 minutos. En cuanto al tipo de solvente, Metivier *et al.*, 2010 determinó que el metanol es un 20% más efectivo que el etanol y un 73% más eficiente que el agua en la extracción de antocianinas de la piel de uva (Barnes *et al.*, 2009). Sin embargo, Jing y Giusti afirman que el agua pura es más efectiva en la extracción de antocianinas en residuos de maíz que el agua acidificada y el etanol (Jing y Giusti, 2007).

También se sabe que el tipo de ácido utilizado afecta a cada solvente describiendo comportamientos diferentes, por ejemplo; el metanol combinado con ácido cítrico es mejor para extracción de antocianinas, la adición de ácido trifluoroacético conduce a un aumento del rendimiento para la mayoría de los solventes con excepción de la acetona (Barnes *et al.*, 2009), además el uso de ácidos fuertes causa hidrólisis del enlace glicosídico generando una antocianidina y un residuo de azúcar. Esto fue observado por Kapsakalidis *et al.*, 2006 en la extracción de fenoles en una muestra de grosella negra usando HCl 2 M encontrando como resultado únicamente antocianidinas.

De igual manera, Barnes *et al.*, 2009 observaron al estudiar la extracción de antocianinas en muestras de arándanos que existe un comportamiento diferente en las muestras no acidificadas, siendo el etanol y la acetona significativamente más efectivos que el metanol, el isopropanol y el acetonitrilo (**Tabla 6**) (Velioglu *et al.*, 1998; Zapata, Carcel, *et al.*, 2014).

**Tabla 6. Estudios con el Método Convencional**

Referencias	Matriz	Parámetros de Extracción de antocianinas	Resultados
Zapata <i>et al.</i> ,2014	Arándanos	Etanol/agua: 50/50 v/v Materia prima/solvente 1:3 kg/kg Tiempo: 2 horas Temperatura: 36 °C pH 3,5	Antocianinas Totales: 879,0±12.9 mg cianidina-3-glucósido/100 ml Fenoles totales: 1424±67 mg GAE/100 ml. DPPH: 4872±124 mg EAA/100 ml

<b>(Su y Chien, 2007)</b>	<i>Vaccinium ashei</i>	Metanol/agua: HCl 1% en MeOH Proporción sólido: solvente 1:30 (residuo/volumen) Tiempo: 60 min Temperatura ambiente	Antocianinas Totales: 11,9 ± 0,03 mg C3G /g jugo de pomasa Polifenoles Totales: 29,20 ± 58 mg EAG/g jugo de pomasa
<b>(Lee y Wrolstad, 2010)</b>	Residuo <i>Vaccinium corymbosum</i> cv Rubel	Solvente: Acetona (100%), re-extracción (70:30 acetona-agua, v/v) Proporción muestra-solventes (1:2) Temperatura: 50 o 80 °C pH:2,9-3,2	Antocianinas Totales: 194,5 mg EC3G/100 g residuo Polifenoles Totales: 424,1 mg EAG/100 g residuo Capacidad Antioxidante: 36,1 µmol ET/g residuo
	Residuo <i>Vaccinium corymbosum</i> L	Proporción de Solvente (MeOH: H <sub>2</sub> O): 1:20 Tiempo: 1–24 h Temperatura: 40 °C 120 rpm	Polifenoles Totales: 9,46 mg EC3G/100 g de pomasa
<b>(Laroze et al., 2010)</b>	Residuo ( <i>Vaccinium macrocarpon</i> L.)	Proporción de Solvente (MeOH: H <sub>2</sub> O): 1:20 Tiempo: 1–24 h. Temperatura: 40 °C 120 rpm	Polifenoles Totales: 17,3 mg EC3G/100 g de pomasa
<b>(Mayer-Miebach et al., 2012)</b>	Residuo Chokeberry ( <i>Aronia melanocarpa</i> )	Solvente: MeOH 60%: Agua:ácido fórmico (85:12:3)	Antocianinas: 11,9–19,5 g/kg base húmeda Polifenoles Totales: 31,00 – 63,00 g/kg base húmeda Capacidad antioxidante: 240–600 mmol/kg base húmeda
<b>(Vold et al., 2013)</b>	Residuo Chokeberry ( <i>Aronia melanocarpa</i> )	Solvente: MeOH 75% + ácido fórmico 0.1%	Antocianinas Totales: 10 ± 0,4 g C3G/kg muestra fresca Polifenoles Totales: 6310 ± 50 mg EAG/ 100 g muestra fresca Capacidad antioxidante: 25,2 ± 1,1 g ET/kg muestra fresca

<b>(Aaby et al., 2013)</b>	Residuo	Solvente: 15 ml H <sub>2</sub> O 5g. muestra Tiempo: 4 min. Temperatura: 100 °C	Antocianinas Totales: 234 ± 18 mg EC3G/100 g de residuo
	Bilberry ( <i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	Solvente: 15 ml H <sub>2</sub> O 5g. muestra Tiempo: 15 min. Temperatura: 80 °C	Polifenoles Totales: 1447 ± 33 mg EC3G/100 g de residuo
<b>(Deng et al., 2014)</b>	Residuo	Solvente: 15 ml H <sub>2</sub> O 5g. muestra Tiempo: 4 min. Temperatura: 100 °C	Polifenoles Totales: 349,17 mg EAG/g de materia seca.
	<i>Vaccinium corymbosum</i> L. (hojas)		
<b>(Salaheen et al., 2014)</b>	Residuo	Solvente: ETOH/H <sub>2</sub> O 10% v/v Proporción sólido- solvente: 2,5g/50 ml Tiempo: 24h Temperatura: 60 °C	Polifenoles Totales: 1,43 mg/ml EAG
	<i>Vaccinium corymbosum</i> L.		
<b>(Klavins et al., 2017)</b>	Residuos	Soxhlet	Antocianinas Totales: 0,065 ± 0,002 g/ 100 g polvo de residuo
		Solvente: 96% ETOH, 0,5% ácido trifluoroacético, v/v 1 g liofilizado/10 ml Tiempo: 12 h Temperatura: 80 °C 25 ciclos	Polifenoles Totales: 1,21 ± 0,05 g/ 100 g polvo de residuo
	American Cranberry ( <i>Vaccinium macrocarpon</i> L.)	Agitación	Antocianinas Totales: 0,098 ± 0,002 g/ 100 g polvo de residuo
		Solvente: 96% ETOH, 0,5%, v/v 50 ml Tiempo 24 h	Polifenoles Totales: 1,12 ± 0,06 g/ 100 g polvo de residuo
	Residuos	Solvente: MeOH 70%; sólido:solvente 1:10 Tiempo: 60 min	Antocianinas Totales: 17,41 ± 0,28 mg C3G/g muestra Polifenoles Totales: 31,13 ± 0,34 mg EAG/g muestra seca FRAP: 157,10 ± 9,82 μmol ET/g muestra
	<i>Vaccinium angustifolium</i>		

<b>(Ross et al., 2017)</b>	Residuos Cranberry ( <i>Vaccinium macrocarpon</i> )	Solvente: MeOH 70% Proporción sólido: solvente 1:10 Tiempo: 60 min	Antocianinas Totales: 4,46 ± 0,17 mg C3G/g muestra Polifenoles Totales: 24,87 ± 0,66 mg EAG/g muestra FRAP: 104,51 ± 3,52 µmol ET/g muestra
<b>(Waterhouse et al., 2017)</b>	Residuos <i>Vaccinium spp.</i>	Relación masa/volumen (1:3) Solvente: H <sub>2</sub> O acidificada con ácido cítrico pH 2 Tiempo: 1h Temperatura: 50 °C Incuba con agitación 200 rpm	Antocianinas Totales: 219–296 mg EC3G/ 100 g extracto seco Polifenoles Totales: 3655–4369 mg EAG/ 100 g extracto seco
<b>(Bittencourt et al., 2018)</b>	Residuo <i>Vaccinium spp.</i>	Solvente: MeOH/H <sub>2</sub> O (50:50% v/v) y acetona/agua (70:30% v/v) Tiempo: 60 min con cada mezcla de solventes. Centrifugación: 2500g por 15 min.	Antocianinas Totales: 44,26 ± 5,04 mg EC3G/ 100 g de residuo Polifenoles Totales: 420,0 ± 11,0 mg EAG/ 100 g de residuo FRAP: 1756,0 ± 8,9 ET/100 g de residuo
<b>(Luchese, Abdalla, et al., 2018)</b>	Residuo <i>Vaccinium Corymbosum</i> L.	Solvente: H <sub>2</sub> O destilada con ácido cítrico 1%, v/v Proporción: 4mg/ml Tiempo: 30 min	Diámetro partícula 310,7µm: 17,4 ± 0,3 mg antocianina/ g residuo seco.  Diámetro partícula 87,23µm: 31 ± 1,04 mg antocianina/ g residuo seco.
<b>(Ćujić-Nikolić et al., 2019)</b>	Residuo Chokeberry <i>Aronia melanocarpa</i>	Solvente (EtOH/H <sub>2</sub> O): 50% v/v Proporción solvente-sólido: 1:20 Tiempo: 60 min. Temperatura: 25 °C Agitación fija: 170 rpm.	Antocianinas Totales: 87,92 ± 7,65 mg EC3G/g de residuo Polifenoles Totales: 101,35 ± 8,46 mg EAG/ g de residuo

<b>(Oliveira et al., 2019)</b>	Residuo Bilberry ( <i>Vaccinium myrtillus</i> L)	Solvente: MeOH 70% + 1% ácido trifluoroacético Tiempo: 18 h Sonicación: 15 min Agitación 15s	Antocianinas Totales: 26,3 mg/g residuo Polifenoles Totales: 51,87±0,38 mg EAG/g residuo
<b>(Jara-Palacios et al., 2019)</b>	Residuo <i>Vaccinium corymbosum</i> L	Solvente: MeOH 75% (1% HCL 1 N) Proporción sólido: solvente 1:5 Tiempo: 12 h Temperatura: 25 °C	Antocianinas Totales: 1188,34±19,35 mg/100 g muestra seca Polifenoles Totales: 1954,54 ± 177,82 mg EAG/100 g muestra seca
<b>(Tagliani et al., 2019)</b>	Residuos <i>Vaccinium corymbosum</i>	Solvente: HCl/MeOH/H <sub>2</sub> O (1:80:10 v/v) Proporción sólido: solvente 1:20 Tiempo: 2 h Temperatura ambiente	Antocianinas Totales: 125,82 ± 5,89 mg C3G/ 100 g muestra seca Polifenoles Totales: 285,14 ± 4,48 mg EAG/100 g muestra seca Capacidad antioxidante: 339,09 ± 2.69 µmol ET/g muestra seca
<b>(Diez-Sánchez et al., 2021)</b>	Residuos <i>Vaccinium corymbosum</i> L	Solvente: MeOH 80% Proporción sólido: solvente 1:100 residuo/volumen	Polifenoles Totales: 3,02 ± 0,12 mg EAG/100 g muestra seca
<b>(Calabuig-Jiménez et al., 2022)</b>	Residuos <i>Vaccinium corymbosum</i> var. Duke	Solvente: metanol en agua al 80 % (v/v) Relación peso-volumen: 1:20 (p/v) para el orujo fresco Tiempo: 1 hora. Centrifugación a 10.000 rpm durante 5 min.	Antocianinas Totales: 4,4 ± 0,2 mg C3G/ 100 g de pomasa seca Polifenoles Totales: 74,5 ± 0,4 mg EAG/ 100 g de pomasa seca Capacidad antioxidante: 145,7 ± 0,6 mg ET/g de pomasa seca.

mg EC3G: miligramos equivalentes de Cianidina-3 glucósido; mg EAG: miligramos equivalentes de ácido gálico; mg ET: miligramos equivalentes de trolox; n/d: no definido; mg EAA: miligramos equivalentes de ácido ascórbico.

### 1.7.2. Extracción acelerada de solventes ASE

La extracción acelerada de solventes (ASE) es una técnica alternativa que combina temperaturas y presiones evacuadas con solventes líquidos, por lo tanto, considera parámetros operativos como, presión, temperatura y volumen de solvente sobre las

extracciones. Es decir, ASE utiliza tecnología limpia que ajusta parámetros del proceso, para extraer selectivamente componentes de diferentes matrices vegetales de interés para la industria en general (Avram *et al.*, 2017). Con la técnica ASE, una muestra sólida se encuentra encerrada en un cartucho de muestra que se llena con un fluido de extracción y se usa para extraer estáticamente la muestra bajo condiciones moderadas de temperatura (40-100 ° C), presión (500-3000 psi) y tiempo (5-10 min). Además, se usa un gas comprimido para purgar el extracto de muestra de la celda en un recipiente de recolección y se aplica a las muestras semisólidas que se quedan retenidas en la extracción celular durante la extracción (Bruce E. Jones B, Ezzell J y Porter N, 2015) (Heffels P, Weber F y Schieber A, 2008). El uso de disolventes líquidos y temperaturas debería dar un mejor rendimiento en comparación con extracciones a temperatura ambiente o cerca de ella y presión atmosférica debido a:

#### **1.7.2.1.Efecto de la temperatura**

La alta temperatura utilizada durante el proceso afecta las propiedades de un solvente, por lo tanto, es uno de los parámetros más importantes para este tipo de extracción debido a que produce (Bruce E. Jones B, Ezzell J y Porter N, 2015):

- Aumento en la solubilidad de los analitos debido a que la solubilidad del agua en solventes no polares aumenta a temperaturas más altas y permite a los analitos situados en los poros sellados por agua estar disponibles para que el solvente llegue facilitando de esta manera la extracción (Paes *et al.*, 2014).
- Debilitamiento e interrupción de interacciones fuertes entre analitos y componentes de la matriz, es decir, fuerzas de Van der Waals (dipolo-dipolo, dipolo inducido por dipolo y dispersivo) enlaces hidrógeno y atracciones dipolo de las moléculas del soluto y sitios activos de la matriz. Estas interacciones dependen de la estructura química de matriz y analito; cohesivo (soluto-soluto) y adhesivo (soluto-matriz), es así que la energía térmica puede reducir la energía de activación para el proceso de desorción (Feng *et al.*, 2022).

- Una disminución en la viscosidad y la tensión superficial del solvente. Esto permite una mejor penetración en los poros y entre las partículas de la matriz, lo que mejora la transferencia de masa. Ambos cambios facilitarán un mejor contacto de los analitos, con el disolvente y mejorar la extracción (Diez-Sánchez *et al.*, 2021).

#### **1.7.2.2.Efectos de la presión**

- Se usa alta presión durante el proceso de extracción para mantener el solvente en estado líquido a temperaturas elevadas por encima del punto de ebullición.
- Mejoran la eficiencia de extracción al arrastrar los analitos que han quedado atrapados en los poros de esta matriz haciéndolos disponibles. Sin embargo, no se han encontrado relaciones entre la presión y la extracción, por lo tanto, las presiones no necesitan ser excesivas (Heffels P, Weber F y Schieber A, 2008).

#### **1.7.2.3.Efecto del tipo de solvente**

Se puede utilizar una amplia gama de disolventes en el sistema ASE, excepto para aquellos con autoignición a temperaturas de 40 a 200 ° C (por ejemplo, disulfuro de carbono, éter dietílico y 1,4-dioxano). En general, deben evitarse las bases y los ácidos fuertes como disolventes. porque son corrosivos (Machado *et al.*, 2017). Las condiciones de extracción utilizadas en el método convencional generalmente para ASE no requieren el cambio del solvente. La técnica ASE proporciona una oportunidad para el uso de una variedad de solventes, incluso aquellos que no son efectivos en el método convencional, esto es debido a que intervienen parámetros como, la temperatura y ajuste de presión durante el proceso que aumentan el poder de la solubilización del solvente (Heffels P, Weber F y Schieber A, 2008; (Mesa *et al.*, 2021). Una gran ventaja de este procedimiento sobre los otros métodos de extracción a baja presión es que se mejora la solubilidad de los compuestos de destino en el solvente y la cinética de desorción de matrices sólidas (Avram *et al.*, 2017), es por lo anterior que existen diversos estudios que demuestran la capacidad de extracción de este método en una variedad de matrices, algunos se describen a continuación en la (**Tabla 7**).

**Tabla 7. Estudios con el método ASE**

Referencia	Materia Prima	Condición de proceso	Contenido analito
<b>Heffels, P., et al 2015</b>	Arándanos Lowbush	Solvente: metanol/agua (20-80%) Muestra: 0,2 g de polvo Volumen de la celda de extracción: 10 ml Tiempo estático: 5 min. Tiempo extracción: 25 min Nº ciclos: 3 Temperatura: 40 °C	Antocianinas: 1,51 a 2,20 mg/g de peso en seco.
<b>Paes et al., 2014</b>	<i>Vaccinium myrtillus L.</i>	Solvente: etanol (100%) / agua acidificada (ácido cítrico 1:1 pH 2) Muestra: 20 g para muestra fresca y 4 g para muestra liofilizada Volumen de la celda de extracción: 5 ml Tiempo estático: 5 minutos Tiempo de extracción: 10 min. Temperatura: 40 °C	Antocianinas (muestra fresca): 254±0,6 mg/100g Antocianinas (muestra liofilizada): 263±0,7 mg/100g
<b>(Avram et al., 2017)</b>	Residuo <i>Vaccinium corymbosum L.</i>	Disolvente: Agua Presión: 68 bar, Temperatura: 120 °C cinco ciclos de extracción, 70 % volumen de lavado 90 s de tiempo de purga de nitrógeno (sin tiempo estático y sin tiempo de precalentamiento). Ciclo de extracción: 5-6 minutos Tiempo de ejecución total de 25-30 min.	Antocianinas Totales: 61,0 mg/100 ml extracto Polifenoles Totales: 7,9 mg/ml extracto

<b>(Linards Klavins et al., 2018)</b>	<i>Vaccinium spp.</i>	<b>Solvente maximizar polifenoles totales:</b> MeOH acuoso (60-80%) 1% Trifluoroacético	Antocianinas Totales: Highbush blueberries
		ETOH acuoso (40-70%) 1% Trifluoroacético	84,12 ± 4,08 mg/g
		<b>Solvente maximizar antocianinas totales:</b> MeOH acuoso (40-60%) 1% Trifluoroacético	Cranberries 43,53 ± 0,70 mg/g
		ETOH acuoso (40-70%) 1% Trifluoroacético	American cranberries 7,08 ± 0,97 mg/g Lingonberries 7,58 ± 2,63 mg g

mg EC3G: miligramos equivalentes de Cianidina-3 glucósido; mg EAG: miligramos equivalentes de ácido gálico; mg ET: miligramos equivalentes de trolox; n/d: no definido.

### 1.7.3. Extracción asistida por presión

#### 1.7.3.1. Extracción con CO<sub>2</sub> Supercrítico (SFE- CO<sub>2</sub>)

Este proceso corresponde a un método no convencional de extracción que utiliza condiciones supercríticas tales como alta temperatura y presión permitiendo elevadas tasas de transferencia de masa, por lo que el tiempo de extracción es menor al conseguido con disolventes líquidos. En este tipo de extracción, el CO<sub>2</sub> se comporta como un fluido. Así, este fluido supercrítico puede ser un líquido o un gas a temperatura ambiente con una baja viscosidad y un mayor coeficiente de difusión pudiendo alcanzar gran compresibilidad térmica, implicando una separación simple que al cambiar la temperatura o presión genera un solvente con alta potencia que combina las ventajas de destilación y la extracción con líquidos (Paes *et al.*, 2014).

La molécula de dióxido de carbono es un solvente ideal para este tipo de extracción por presentar baja viscosidad y alta densidad permitiendo mejorar la transferencia de masa en condiciones supercríticas, esta condición supercrítica se alcanza con temperaturas de 31,06 °C, presiones mayores a 70 bar, y una densidad de 0,460 g/cm<sup>3</sup>, según su diagrama de fase el cual permite establecer las regiones presión-temperatura en las que son estables

las fases líquida, sólida y gaseosa del CO<sub>2</sub>. Entender estos mecanismos es de utilidad para comprender el control de estas variables y producir transiciones entre estas fases. En el diagrama se puede observar que entre la fase sólida y líquida existe un equilibrio de fusión, cuya línea inicia en el punto triple donde confluyen los tres estados de la materia, entre el líquido y el gas se encuentra la línea de vaporización que inicia en el punto triple y termina en el punto crítico y la línea de sublimación que divide el gas del sólido. Es entonces en el punto crítico donde el gas y la fase líquida están fusionados formando una fase única, fluida y homogénea conocida como la región supercrítica (**Figura 8**) (Garcia-Mendoza *et al.*, 2017; Lizcano *et al.*, 2019; Patil *et al.*, 2009).

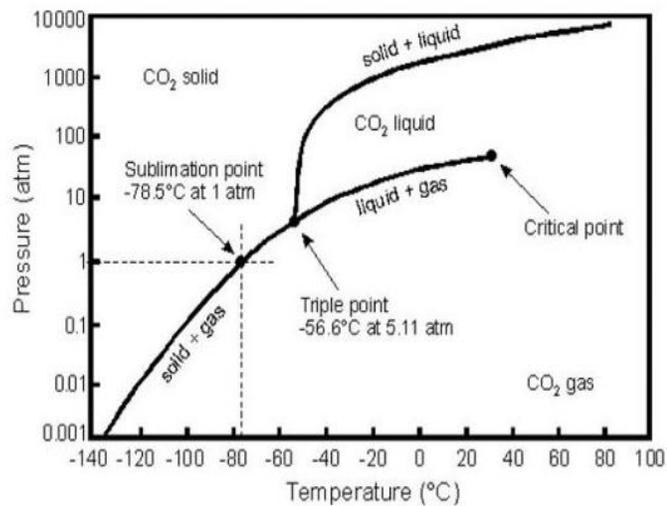


Figura 8. Diagrama de Fases CO<sub>2</sub>. Presión-Temperatura. (Garcia-Mendoza *et al.*, 2017; Lizcano *et al.*, 2019; Patil *et al.*, 2009)

El CO<sub>2</sub> extrae compuestos no polares, por lo que para extraer moléculas polares en este caso antocianinas se debe aumentar su solubilidad con un disolvente polar denominado cosolvente generalmente representado por etanol. Para el caso de la extracción de moléculas en

arándanos se aumenta el rendimiento y mejora el contenido de antocianinas en los extractos finales, así para la extracción de residuos de arándanos se recomiendan proporciones de hasta el 10% (López-Padilla *et al.*, 2016; Román Páez *et al.*, 2016).

Los fluidos supercríticos se utilizan para extraer los componentes de interés, así se pueden enumerar varias ventajas y desventajas respecto al uso de este método, como se muestra en la **Tabla 8**.

**Tabla 8. Ventajas y Desventajas de Extracción por Fluidos Supercríticos**

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Se evita el deterioro de aquellos componentes térmicamente lábiles de la matriz natural por el uso de temperaturas moderadas.	Lograr el equilibrio de fases entre soluto y solvente puede ser difícil.
Los fluidos poseen alta volatilidad, lo que se facilita su eliminación. Los niveles del solvente residual en el producto final son bajos, estos solventes utilizados no son nocivos, por esto, los extractos son reconocidos como seguros para su uso como aditivos alimentarios (GRAS). Es un método atractivo para el desarrollo de procesos sustentables, contribuyendo a la denominada “química verde”.	Cuando se utilizan cosolventes para cambiar la polaridad del fluido se requiere una operación de separación posterior para eliminarlos.
Reduce la cantidad de interferentes.	Las altas presiones complican la adición continua de sólidos al extracto
La extracción se hace sin cambios de fase	Los costos de operación son elevados
Pueden extraerse compuestos volátiles y no-volátiles, ajustando la densidad del fluido para variar su poder solvente.	Baja disponibilidad de equipos y reducido desarrollo de diseños
El agregado de un cosolvente también puede ayudar a mejorar la selectividad en la separación.	El cosolvente debe estar en proporciones que a presión y temperatura establecida sean solubles en el fluido y la mezcla pueda considerarse supercrítica

En la extracción de antocianinas el aumento del rendimiento con el aumento de presión es debido a que la potencia de solvatación del CO<sub>2</sub> con la densidad mejora, por lo que las presiones que se utilizan generalmente son superiores a 220 bar, inhibiendo enzimas que degradan las antocianinas, además que durante la extracción por la ausencia de O<sub>2</sub>

atmosférico y luz se genera una reducción de la oxidación de antocianinas (Hidalgo y Almajano, 2017; Silva *et al.*, 2017).

Como se ha mencionado la alta temperatura acelera la degradación de las antocianinas en el proceso de extracción. Sin embargo, las técnicas presurizadas permiten la extracción rápida de antocianinas y otros fenólicos a una temperatura > 50° C encontrándose resultados positivos al retardar la degradación de antocianinas durante el procesamiento (Dai *et al.*, 2009).

Se debe tomar en cuenta que la proporción de la fracción etanol/agua debe ser soluble en la mezcla supercrítica de presión y temperatura que se ha propuesto. Sin embargo, si se usan proporciones superiores se tendrán dos fases coexistiendo (líquida y supercrítica) afectando al rendimiento y la extracción de antocianinas (Hidalgo y Almajano, 2017).

Paes *et al.* (2014) realizaron estudios para residuos de arándanos estableciendo como condiciones óptimas una temperatura de 40 ° C y 200-210 bar utilizando etanol acuoso como cosolvente (Silva *et al.*, 2017; Paes *et al.*, 2014), mientras que Ghafoor *et al.*, 2010 determinaron las condiciones óptimas para la extracción de antocianinas de cáscara de uva utilizando SFE, informando que a una temperatura de 45 °C y 160 bar en presencia de 6-7% de etanol son las condiciones adecuadas en la extracción de antocianinas, al igual que otro estudio propuesto por Seabra *et al.*, 2010 el cual reporta condiciones similares para la extracción de antocianinas en piel de saúco (**Tabla 9**).

**Tabla 9. Estudios con el Método CO<sub>2</sub> Supercrítico**

<b>Referencias</b>	<b>Materia Prima</b>	<b>Parámetros de Extracción de Antocianinas</b>	<b>Información Relevante para este estudio</b>
<b>López-Padilla et al., 2016; Román Páez et al., 2016</b>	<i>Vaccinium meridionale</i>	Cosolvente: EtOH proporciones de hasta el 10% Presión: 30 MPa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El cosolvente aumenta el rendimiento y mejora el contenido de antocianinas en los extractos finales</li> <li>• Proporciones superiores al 10% de cosolvente causa la coexistencia de</li> </ul>

		Temperatura: 40 °C	dos fases coexistiendo (líquida y supercrítica) afectando al rendimiento y obtención de antocianinas.
<b>Hidalgo y Almajano, 2017; Silva et al., 2017</b>	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Cosolvente: EtOH (10%) Presiones mayores a 220 bar Tiempo: 30 min Temperatura: 45 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento del rendimiento debido a que a mayor presión aumenta el poder solvente del CO<sub>2</sub> por un aumento de su densidad. Inhibe enzimas que degradan las antocianinas.</li> <li>• Ausencia de O<sub>2</sub> atmosférico y luz generan una reducción de la oxidación de antocianinas.</li> <li>• Polifenoles Totales: 72,18 mg EAG/g de peso seco.</li> <li>• Antocianinas Totales: 0.62 mg EC3G/g de peso seco</li> <li>• DPPH: 102,66 ET/g de peso seco</li> <li>• FRAP: 10,30 ET/g de peso seco</li> </ul>
<b>Paes et al., 2014</b>	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Cosolvente: etanol 5% Presiones: 200-210 bar Temperatura 40 °C	<p>Las condiciones descritas anteriormente según el estudio citado fueron óptimas en el proceso</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Polifenoles Totales: 3,5 ± 4 mg EAG/g residuo liofilizado</li> <li>• DPPH: 35 ± 19 mg ET/ g residuo liofilizado</li> <li>• Antocianinas Totales: 16,5 ± 111 mg EC3G/g residuo liofilizado.</li> </ul>
<b>(Laroze et al., 2010)</b>	Residuo ( <i>Vaccinium macrocarpon</i> L.)	Cosolvente: EtOH Presión: 250 bar. Tiempo: 2 h Temperatura: 60 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polifenoles Totales: 84 mg EC3G/100 g de pomasa</li> <li>• Capacidad antioxidante: 50,4 µg DPPH eliminado/g EAG</li> </ul>
<b>(Tamkutė et al., 2020)</b>	Residuo Cranberry ( <i>Vaccinium macrocarpon</i> )	Cosolvente: 5% ETOH Presión: 42,4 MPa Temperatura: 53 °C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ORAC: 79,69 ± 3,74 mg ET/g de extracto</li> </ul>

mg EC3G: miligramos equivalentes de Cianidina-3 glucósido; mg EAG: miligramos equivalentes de ácido gálico; mg ET: miligramos equivalentes de trolox; n/d: no definido.

En los últimos años, la extracción por fluidos supercríticos (SFE), se ha convertido en un método de extracción conveniente por evitar reacciones de degradación de los compuestos fenólicos (Babova *et al.*, 2016). Además, este método está asociado a estrictas regulaciones amigables con el medio ambiente y a pesar de que los costos del equipo son elevados se debe hacer una comparación con los costos de gestión si se necesita obtener extractos puros ya que el SFE además de ofrecer la eliminación de solventes no polares también posibilita la obtención de extractos considerados como seguros para uso en aditivos alimentarios. (Silva *et al.*, 2017).

#### **1.7.4. Extracción Asistida con Ultrasonido**

La extracción asistida con ultrasonido favorece la penetración de disolventes y la transferencia de masa, reduciendo de esta manera el uso de productos químicos y temperatura de extracción, aumentando la tasa de extracción y aumentando el rendimiento del extracto, además de ahorrar el costo del proceso (Wang *et al.*, 2016). En este procedimiento, las frecuencias de ultrasonido facilitan la hidratación de la matriz vegetal permitiendo de esta manera la liberación de compuestos, ya que, conduce al agrandamiento de los poros de la pared celular, es decir, colapsa las paredes celulares de la planta debido a las burbujas de cavitación durante la extracción promoviendo la transferencia de masa (Garcia-Mendoza *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017).

La EAU presenta varias ventajas como su facilidad de uso, utilización de cantidades reducidas de solventes, bajo costo del proceso, bajo consumo energético, bajo nivel de mantención de los equipos, amplia disponibilidad, factibilidad de escalar y producción de un extracto seguro para la ingesta humana. Sin embargo, como desventaja presenta altos costos de su equipamiento (Machado *et al.*, 2017).

Las frecuencias del ultrasonido se dividen en dos bandas, una de baja potencia de ultrasonido que considera una baja amplitud y alta frecuencia (100-1000 kHz) o ultrasonido de alta potencia que por el contrario utiliza una alta amplitud y baja frecuencia (20-100 kHz) cuya aplicación se centra en el procesamiento y limpieza de alimentos

gracias a la formación de burbujas de cavitación, cuya vibración crea corrientes fluidas y fuerzas disruptivas en células y partículas cercanas. Sin embargo, los fenómenos cavitacionales provocan una elevación considerable de la temperatura (70 °C en reactores refrigerados) debido a la combinación que se genera con los microchorros de fluido más la destrucción de burbujas de aire en la superficie celular provocado por el ultrasonido (Silva *et al.*, 2017). Además, utiliza frecuencias iguales o por encima de 20 kHz. Y es ampliamente utilizada en la industria alimentaria. Es considerado un método simple y de mayor eficiencia en comparación con la extracción convencional, debido a la reducción de gasto de calor y solvente en beneficio del medio ambiente. Algunos autores mencionan que el efecto de sonicación a frecuencias bajas (20 kHz) son suficientes para extraer antocianinas ya que frecuencias más altas podrían causar degradación de estos compuestos. En este tipo de extracción el tiempo es considerado un parámetro de importancia ya que, se ha observado que existe una caída en la actividad antioxidante después de 30 minutos de sonicación probablemente debido al efecto del ultrasonido y al aumento de temperatura resultado de una alta frecuencia aplicada. Por otro lado, se ha reportado que el tamaño de partícula al someterse a tratamientos de sonicación resulta en una menor viscosidad aparente, especialmente en arándanos (Hidalgo y Almajano, 2017). Como desventaja de este método se menciona que puede promover la degradación de antocianinas por la presencia del radical hidroxilo en su estructura y por el peróxido de hidrógeno producido dentro de las burbujas de cavitación bajo condiciones de alta amplitud, baja temperatura y largo tiempo de proceso, esta situación media la apertura de los anillos en las moléculas de antocianina, formando chalcona y mejorando así la isomerización y producción de moléculas orgánicas más pequeñas. También esta degradación se ve favorecida por la presencia de ácidos orgánicos en los procesos ultrasónicos debido a la oxidación generada por los radicales libres formados a partir de estos ácidos en sonicación (Machado *et al.*, 2017).

Varios autores reportan estudios con este método aplicados a diferentes matrices vegetales obteniendo interesantes resultados en la obtención de compuestos de interés como se muestra en la **(Tabla 10)**.

**Tabla 10. Estudios con el método EAU**

Referencia	Materia Prima	Condición de proceso	Contenido analito
<b>Demirci M et al., 2021</b>	Berberis crataegina DC	Relación: sólido/líquido 150g/ml Tiempo: 13,86 min. Temperatura: 57,41 °C Amplitud 98%	Antocianinas: 2659.297 mg/L Polifenoles Totales: 62,95 mg/100g
<b>Hidalgo y Almajano et al., 2017</b>	<i>Vaccinium spp</i>	Relación: sólido/líquido 1:10 Concentración EtOH: H <sub>2</sub> O: HCl (70:29:1) Tiempo: 2 h Temperatura: 30 °C	Antocianinas Totales: 520 mg C3G/g fruto seco Polifenoles Totales: 600 mg GAE/g de fruto seco DPPH: 5500 mol TE/g de extracto
<b>Aliaño., et al 2020</b>	<i>Vaccinium corymbosum L</i>	Relación etanol-residuo de 8,66 ml/ g Concentración de metanol: 74,6%, Tiempo: 5-15 min. Temperatura: 34 °C Amplitud: 70% pH: 4 ciclo: 0,7	Antocianinas Totales: 10.18 mg/g Polifenoles Totales: 32,18 mg/ g
<b>Pingret D et al., 2012</b>	Residuo de manzana	Relación agua-residuo 150g/ ml Concentración de metanol: 0,764 W/cm <sup>2</sup> Tiempo: 40 min. Temperatura: 40 °C	Polifenoles totales: 555 mg equivalente catequina/ 100 g peso seco
<b>Anticono M., 2016</b>	Arándanos ( <i>Vaccinium Myrtilus L.</i> )	Relación agua-residuo 3g/40 ml Concentración de Acetona, agua, ácido acético: 70:29,5:0,5 v/v Tiempo: 60 min. Temperatura: 22 °C	Polifenoles Totales Arándano: 379 mg EAG/100 g pulpa de arándanos Arándano fresco:358,7 mg EAG/100 g Zumos de arándano: 234 mg EAG/100 g
	Residuos American	Relación etanol- residuo: 0,50 g liofilizado/50ml	Antocianinas Totales: 0,147 ±

<b>(Klavins et al., 2017)</b>	Cranberry ( <i>Vaccinium macrocarpon</i> L.)	Concentración de solvente: 96% ETOH, 0,5%, v/v Tiempo: Reemplazo de agua cada 20 min. Temperatura: 30 °C 360 W	0,004 g/ 100 g polvo de residuo Polifenoles Totales: 1,68 ± 0,07 g/ 100 g polvo de residuo
<b>(Zhang et al., 2017)</b>	Residuos <i>Vaccinium ashei</i> cv. Reade, Gardenblue	Tiempo: 1h Potencia: 50 W/L de agua (300 W/6L) Frecuencia: 28 KHz	Antocianinas Totales: 38, 44 ± 6,54 mg/ 100 g muestra polvo Polifenoles Totales: 55,07 ± 3,32 mg EAG/ 100 g muestra polvo
<b>(Hu et al., 2019)</b>	<i>Vaccinium spp.</i>	Solvente: metanol puro Tiempo: 30 min Temperatura: 25 °C	Polifenoles Totales: 12,49 mg C3G / g peso seco
<b>(Xue et al., 2020)</b>	<i>Vaccinium spp.</i>	Disolvente eutéctico profundo (1,4-butanediol 1:3) /agua 30% Tiempo: 30 min Temperatura: 50 °C Potencia: 300 W	Polifenoles Totales: 9,32 ± 0,08 mg/g

mg EC3G: miligramos equivalentes de Cianidina-3 glucósido; mg EAG: miligramos equivalentes de ácido gálico; mg ET: miligramos equivalentes de trolox; n/d: no definido.

De acuerdo a los antecedentes presentados se conoce que usualmente el contenido de antocianinas extraídas varía según la matriz que se esté analizando, además para el caso de berries como el arándano es importante considerar la variedad, estación de cosecha, estado de maduración, ubicación geográfica, clima, riego, exposición a luz solar de las bayas entre otras, siendo parámetros importantes y difíciles de controlar, ya que todos estos factores influyen en el contenido de compuestos bioactivos. Además, la literatura registra diferencias por el tipo de tecnología aplicada para la extracción tanto en los perfiles como en el contenido de antocianinas y polifenoles presentes en el fruto fresco y residuos, es así que, la optimización de las técnicas de extracción ocupa un lugar

protagónico en los últimos tiempos para conocer de manera cierta la presencia de bioactivos y sus respectivas concentraciones reduciendo la variabilidad en los resultados al analizar el tipo de cultivo de la matriz, el tipo de extracción y las condiciones de proceso que se utilicen para este fin. Cabe destacar que, existe información limitada en cuanto a la caracterización de pomasa de arándano, de ahí la importancia del presente estudio para el aprovechamiento de esta materia prima ya que, el arándano y sus residuos agroindustriales poseen un alto contenido de antocianinas, lo que hace relevante su estudio y aprovechamiento comercial.

## II. HIPÓTESIS

La extracción de antocianinas a partir de los residuos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) depende tanto de las propiedades del solvente como del método utilizado para su extracción.

Por lo tanto, se postula que los extractos obtenidos por las metodologías ASE, EAU y convencional que utilizan como solvente una mezcla hidroalcohólica, serán capaces de extraer compuestos polares, siendo estos extractos ricos en antocianinas y polifenoles en comparación con aquellos extractos obtenidos con el método de CO<sub>2</sub> Supercrítico que utiliza una mezcla de solvente apolar con baja proporción de solvente polar. Además, dentro de las metodologías ASE y EAU tanto la concentración de solvente como la amplitud, respectivamente; serán condiciones de proceso decisivas para la obtención de extractos enriquecidos en antocianinas y polifenoles.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1.OBJETIVO GENERAL

Estudiar la extracción de residuos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con CO<sub>2</sub> Supercrítico (SFE-CO<sub>2</sub>), Extracción Acelerada de Solvente (ASE), Extracción Asistida con Ultrasonido y solventes convencionales optimizando el contenido de antocianinas y polifenoles totales como primer paso para el desarrollo de un ingrediente funcional con potencial aplicación en la industria alimentaria.

#### 3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar física y químicamente la materia prima inicial (residuo obtenido del procesamiento de jugo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) en base a su análisis químico proximal, contenido de fibra, sólidos solubles (SST), actividad de agua y humedad.
- Evaluar el efecto de la temperatura, presión y concentración de co-solvente sobre la extracción de antocianinas y polifenoles con CO<sub>2</sub> supercrítico a partir de residuos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) y optimizar estas variables de proceso mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) para maximizar el contenido de compuestos fenólicos.
- Evaluar el efecto de la amplitud, tiempo y concentración de solvente sobre la extracción de antocianinas y polifenoles con ultrasonido a partir de residuos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) y optimizar estas variables de proceso mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) para maximizar el contenido de compuestos fenólicos.
- Evaluar el efecto de la temperatura, ciclos de extracción y solvente sobre la extracción de antocianinas y polifenoles a partir de residuos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con el método ASE y optimizar estas

variables mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) para maximizar el contenido de compuestos fenólicos.

- Evaluar el efecto de la temperatura, solvente y tiempo sobre la extracción de antocianinas y polifenoles a partir de residuos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con extracción convencional y optimizar estas variables mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) para maximizar el contenido de compuestos fenólicos.
- Caracterizar física y químicamente los extractos obtenidos por CO<sub>2</sub>-SC, ASE, EAU y por extracción convencional en base de su contenido de antocianinas individuales y totales, polifenoles totales y capacidad antioxidante.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

Los estándares utilizados para la cuantificación de antocianinas fueron: cloruro de peonidina 3-glucósido, cloruro de malvidina 3-glucósido, cloruro de petunidina 3-glucósido, cloruro de delfinidina 3-glucósido, cloruro de cianidina 3-glucósido (Merck, Darmstadt, Alemania).

Solventes y productos químicos: CO<sub>2</sub> anhidro (AGA, Santiago, Chile), alcohol, metanol, etanol de grado analítico, reactivo de Folin-Ciocalteu, trolox, estándar de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), cloruro férrico hexahidratado, reactivo TPTZ, ácido acético glacial, hidróxido de sodio, acetona, ácido fórmico, acetonitrilo, carbonato de sodio, acetato de sodio, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, célite 545, lana de vidrio xilanizada y perlas de vidrio todos adquiridos de la Merck, Darmstadt, Alemania.

### 4.2. Materia prima

#### 4.2.1. Arándanos

Este estudio se realizó con arándanos de la especie *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy comprados en mercados locales de la Región Metropolitana en Santiago de Chile. Después se transportaron y almacenaron en una cámara de refrigeración ubicado en el laboratorio del Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile a -70 °C en un equipo de frío Sanyo Electric Ultra-low temperatura freezer modelo MDF-U3086S, hasta su procesamiento.

#### 4.2.2. Procesamiento del arándano

Los arándanos frescos se lavaron con agua potable, se retiró el exceso de agua y luego se extrajo el jugo a nivel de laboratorio. Los RA (pomasa) se obtuvieron a partir de la fabricación del jugo simulando las condiciones de procesamiento industrial, con un extractor Ursus Trotter modelo Ut-Bronze 150 German Konzept, separando de esta

manera el jugo de arándano del residuo/pomasa constituida por semillas, cáscaras y pulpa de la fruta.

#### **4.2.3. Preparación de la pomasa de la fruta**

Se utilizó muestras de pomasa liofilizadas. La pomasa fue liofilizada en condiciones de:  $-50^{\circ}\text{C} \times 72\text{ h}$  a 5 mTorr en un liofilizador Freeze Dryer Operon Cientec modelo FDB-5502, posteriormente se trituraron en un molino de martillos en un solo paso (Polymix Px MFC 90d) y luego en un molinillo de café (20 x 3 m). La muestra alcanzó un tamaño de partícula de 30-40 mesh (425-600  $\mu\text{m}$ ) al pasar a través de una malla en acero inoxidable tela mesh, obteniendo homogeneidad de la muestra. El residuo liofilizado (actividad de agua=0,16; contenido de humedad= 3,44%) se almacenó en un equipo de frío de  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

Esta materia prima inicial, además fue sometida a un análisis químico proximal, contenido de fibra, sólidos solubles, actividad de agua y humedad de acuerdo a los procedimientos del apartado 4.3.

### **4.3.Extracción de residuos de arándanos**

#### **4.3.1. Extracción convencional**

Para la extracción sólido-líquido de antocianinas con el método convencional (EC), se colocó 2,5 gramos de RA liofilizado en un matraz cónico adicionando 40 ml de la mezcla de etanol/agua (% v/v). Posteriormente, se llevó a un baño de agua termostático durante períodos de tiempo en un rango de 60 y 120 minutos según el diseño experimental propuesto. La mezcla se centrifugó (Beckman Allegra™ 21R centrífuga) a 1500 rpm y el sobrenadante se recogió y se transfirió a un matraz aforado de 50 ml almacenándolo en tubos cerrados Falcon en un equipo de frío a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización en las determinaciones físicas y químicas descritas en el apartado 4.4.

##### **4.3.1.1.Diseño experimental de extracción convencional**

El diseño experimental en la extracción convencional se realizó de acuerdo con un diseño de Box-Behnken que considera un total de 15 experimentos de extracción descritos en la

**Tabla 11**, en los que se combinaron las siguientes variables independientes: porcentaje de etanol/agua entre el 50-100% v / v, temperatura entre el 20 y 60 ° C y el tiempo de extracción entre los 60 y 120 minutos, sobre el contenido de antocianinas totales, polifenoles totales y capacidad antioxidante como variables respuesta. Se utilizó la metodología de superficie respuesta (RSM) para optimizar procesos de extracción usando la función de deseabilidad (Coronado H. *et al.*, 2015; Mazza *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2017) El análisis del diseño experimental se realizó con la ayuda del software STATGRAPHICS Centurión XV. En base a la optimización múltiple se obtuvo posteriormente un extracto óptimo ECO.

**Tabla 11. Diseño Experimental-Método Convencional**

Experimento	Solvente	Temperatura	Tiempo
	Etanol/agua (% v/v)	(°C)	(min)
1	75	60	120
2	100	60	90
3	100	40	60
4	75	60	60
5	75	40	90
6	75	20	60
7	100	40	120
8	50	20	90
9	75	40	90
10	75	20	120
11	75	40	90
12	100	20	90
13	50	40	60
14	50	40	120
15	50	60	90

### 4.3.2. Extracción acelerada de solventes ASE

Para la extracción de antocianinas con este método se utilizó un mecanismo automatizado (**Figura 9**), en el ASE 300 Accelerated Solvent Extractor Dionex, colocando 4 gramos de RA liofilizado en tubos de acero inoxidable con un diámetro exterior de 1/16 de pulgada y de 0,02 pulgadas de diámetro interno (d.i) sin contrapresión. Las celdas de extracción son de acero inoxidable de 1500 psi, con volúmenes de 16,0 ml (14 mm d.i x 100 mm) y se calentaron en un bloque de calefacción construido internamente.

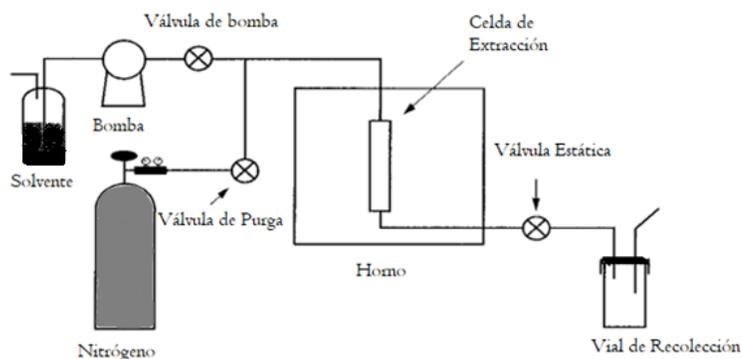


Figura 9. Esquema de la Extracción Acelerada de Solventes (ASE)

Para este estudio, todas las muestras fueron recogidas en viales de 40 ml y un sensor de gas de hidrocarburo fue utilizado para monitorear fugas de solvente. Las muestras se cargaron en las celdas de extracción con un volumen extra (1g) de Celite 545 (Merck, Darmstadt, Alemania) en el extremo de entrada de la celda. Cuando las celdas estaban cargadas y apretadas, se realizó el precalentando de la celda antes de llenar con solvente (método de precalentamiento). Se dejó equilibrar la célula durante un período estático de 5 minutos, tiempo en el cual la válvula estática y la bomba se abren, introduciendo el disolvente en la celda a 8 ml/min hasta que se acumule aproximadamente 1 ml en el vial de recolección, haciendo que la válvula estática se cierre y la celda continúe para presurizar al punto de ajuste (200-3000 psi). Después del período estático se introdujo disolvente nuevo para limpiar las líneas y la celda, y el extracto se recogió en el vial. A partir de aquí, se cierra la válvula de la bomba, se abre la válvula de purga y se presuriza el nitrógeno (125-150 psi) forzando al solvente a salir de la celda de extracción hacia el frasco reservorio, el extracto se trasvasó para su almacenamiento a tubos cerrados Falcon

en un equipo de frío a -70 °C hasta su posterior utilización en las determinaciones físicas y químicas descritas en el apartado 4.4.

#### 4.3.2.1. Diseño experimental de extracción ASE

El diseño experimental en la extracción mediante ASE se realizó de acuerdo con un diseño de Box-Behnken que considera un total de 15 experimentos de extracción descritos en la **Tabla 12**, en los que se combinaron las siguientes variables independientes, evaluando el efecto que presentan sobre el extracto: solvente etanol (20-80% v/v) con agua acidulada con ácido acético (0,5%), temperatura (40-60 ° C) y ciclos de extracción (1-5). El proceso de extracción además consideró un calentamiento de 5 min, un período estático de 5 min, flush del 30%, purga de 600 segundos. Las variables respuesta en la RSM correspondieron al contenido de antocianinas totales, polifenoles totales y capacidad antioxidante con optimización múltiple usando la función de deseabilidad. Se utilizó el software STATGRAPHICS Centurión XV. En base a la optimización múltiple se obtuvo posteriormente un extracto óptimo (EASE).

**Tabla 12. Diseño Experimental-Método ASE**

<b>Experimento</b>	<b>Solvente</b> <b>Etanol/agua acidulada</b> <b>(% v/v)</b>	<b>Temperatura</b> <b>(°C)</b>	<b>Nº de ciclos</b>
<b>1</b>	50	50	3
<b>2</b>	20	40	3
<b>3</b>	50	50	3
<b>4</b>	80	60	3
<b>5</b>	80	50	5
<b>6</b>	20	50	1
<b>7</b>	80	50	1
<b>8</b>	20	60	3
<b>9</b>	50	40	1
<b>10</b>	50	50	3

<b>11</b>	80	40	3
<b>12</b>	20	50	5
<b>13</b>	50	60	1
<b>14</b>	50	40	5
<b>15</b>	50	60	5

### 4.3.3. Extracción supercrítica con CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>):

Para la extracción a partir de residuos de arándano mediante CO<sub>2</sub>-SC se utilizó un extractor supercrítico de laboratorio acoplado a una bomba Knauer HPLC K-501, Berlín Alemania para agregar modificadores (Speed SFE, modelo 7071, Applied Separations, Allentown PA). Para preparar la muestra se mezclaron 3 g de RA liofilizado con 6 g de Celite 545 (Merck, Darmstadt, Alemania), que posteriormente se introdujo en una columna de acero inoxidable de un volumen de 50 mL. En esta columna se colocó la lana de vidrio xilanizada (Merck, Darmstadt, Alemania), seguido de Celite, perlas de vidrio, lana de vidrio xilanizada, Celite, RA liofilizado, Celite y lana de vidrio xilanizada. Una vez que se introdujo la muestra en la columna de extracción se procedió a conectarla al interior del horno del equipo de extracción supercrítico. Este equipo posee además un enfriador (Julabo F200 con refrigerante R134a. Seelbach, Alemania), una bomba de alta presión para CO<sub>2</sub> para lograr un flujo de 2,5 L/min, una bomba para ingresar cosolvente, horno, un regulador de presión, tubos de recolección del extracto y un medidor de flujo de salida de CO<sub>2</sub> (**Figura 10**) (Lizcano *et al.*, 2019). El extracto obtenido se almacenó en tubos herméticamente cerrados con atmósfera de nitrógeno y colocados en un equipo de frío a -70 °C hasta su posterior utilización en las determinaciones físicas y químicas descritas en el apartado 4.4.

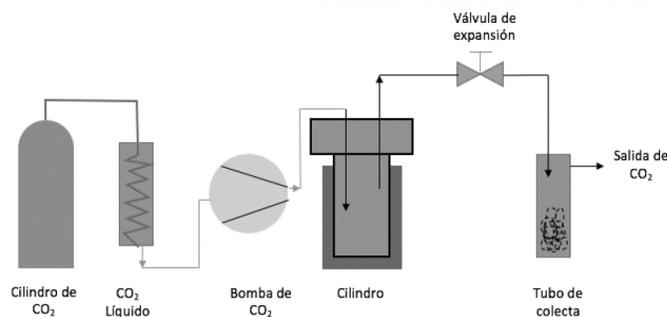


Figura 10. Esquema Básico del equipo de SC-CO2

#### 4.3.3.1. Diseño experimental con SC-CO<sub>2</sub>:

La extracción con SC-CO<sub>2</sub> se realizará de acuerdo con un diseño Box-Behnken que considera 15 experimentos de extracción descritos en **la Tabla 13**, para evaluar el efecto que tiene la presión (200-400 bar), temperatura (40-60 °C) y concentración de cosolvente (etanol) (0-10%) como variables independientes sobre el contenido de antocianinas totales, polifenoles totales y capacidad antioxidante del extracto, tomadas como variables de respuesta. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para optimizar las variables de respuesta mediante la aplicación de la función de deseabilidad. El extracto obtenido en condiciones óptimas se denominó ESC.

**Tabla 13. Diseño Experimental-Método SC-CO<sub>2</sub>**

Experimento	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Concentración de cosolvente (%)
1	300	50	5
2	400	40	5
3	200	50	0
4	300	50	5
5	300	40	10
6	200	40	5
7	300	60	10
8	400	50	0
9	400	60	5

<b>10</b>	300	40	0
<b>11</b>	200	50	10
<b>12</b>	400	50	10
<b>13</b>	200	60	5
<b>14</b>	300	50	5
<b>15</b>	300	60	0

#### **4.3.4. Extracción Asistida con Ultrasonido:**

Para la extracción a partir de residuos de arándano mediante la extracción asistida con ultrasonido se utilizó el equipo Ultrasonic processor VCX500 (Sonics y Materials, Inc. Newtown, USA) operando una frecuencia de 25 kHz. La extracción se llevó a cabo en un baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento de la mezcla y mantener esta variable entre los 35-40 °C durante el desarrollo del método, aplicando alta potencia (alta amplitud y baja frecuencia 20-100 kHz). Se pesó 5 gramos de la muestra de residuo liofilizado y un volumen específico de disolvente recomendada para la sonda de ½” utilizada con su operación según las concentraciones según las condiciones especificadas en el diseño experimental. Después del tiempo de extracción establecido con pulsaciones On (10 segundos) y Off (10 segundos), se realizó el proceso de centrifugación dos veces durante 5 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se filtró y trasladó a un matraz aforado de 50 ml. Se almacenó en tubos herméticamente cerrados en un equipo de frío a -70 °C hasta su posterior utilización en las determinaciones físicas y químicas descritas en el apartado 4.4.

##### **4.3.4.1. Diseño experimental con extracción asistida con ultrasonido:**

La extracción asistida con ultrasonido se realizará de acuerdo con un diseño Box-Behnken que considera 15 experimentos de extracción descritos en la **Tabla 14**, para evaluar el efecto que tiene la amplitud (20-90%), tiempo (10-60 minutos) y concentración del solvente (etanol-agua acidulada 0,5%) (20-80% v/v) como variables independientes sobre el contenido de antocianinas totales, polifenoles totales y capacidad antioxidante del extracto, tomadas como variables de respuesta. Se utilizó la metodología de superficie de

respuesta (RSM) para optimizar las variables de respuesta mediante la aplicación de la función de deseabilidad. El extracto obtenido en condiciones óptimas se denominó EAU.

**Tabla 14. Diseño Experimental-Método Asistido con Ultrasonido**

<b>Experimento</b>	<b>Concentración del solvente (% v/v)</b>	<b>Amplitud (%)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
<b>1</b>	50	55	35
<b>2</b>	80	55	60
<b>3</b>	50	20	10
<b>4</b>	50	55	35
<b>5</b>	50	20	60
<b>6</b>	80	20	35
<b>7</b>	50	90	60
<b>8</b>	80	55	10
<b>9</b>	20	55	10
<b>10</b>	20	20	35
<b>11</b>	50	55	35
<b>12</b>	80	90	35
<b>13</b>	50	90	10
<b>14</b>	20	90	35
<b>15</b>	20	55	60

En todos los extractos óptimos obtenidos mediante los distintos métodos en este estudio se determinaron antocianinas individuales por HPLC-DAD siguiendo la metodología de Li *et al.*, 2015. También para estos extractos se identificaron antocianinas individuales por UHPLC-DAD-MS, mientras que los extractos resultantes de los diseños Box- Behnken en todos los métodos de extracción fueron analizados para antocianinas totales por el método de pH diferencial según Vatai *et al.*, 2009, contenido fenólico total según Singleton y Rossi y actividad antioxidante del extracto (FRAP y DPPH) según Benzie y Strain.

#### **4.4. Caracterización de las propiedades físicas y químicas de la materia prima inicial y de los extractos obtenidos.**

##### **4.4.1. Materia prima inicial**

###### **4.4.1.1. Humedad**

Para determinar la humedad se empleó un equipo analizador de humedad modelo PMR 50/1.R de Radwag balances y scales, Poland (EU).

###### **4.4.1.2. Actividad de agua (*aw*)**

Se determinó la actividad de agua a 21,6 °C en un equipo Smart water activity meter modelo wam-1/2/3/4 de MRC, Israel.

###### **4.4.1.3. Determinación del contenido de proteína**

Para la determinación de proteína se empleó el método de Nitrógeno Total y Proteína Bruta de Kjeldahl AOAC 928.08, variante Steymark.

###### **4.4.1.4. Determinación de fibra dietética total/soluble/insoluble**

Está basado en el método AOAC 991.43 “Fibra Dietética Total, Soluble e Insoluble en Alimentos”, empleando el método enzimático gravimétrico.

###### **4.4.1.5. Determinación del contenido de materia grasa**

Para la determinación del porcentaje de materia grasa de los residuos de arándano, se utilizó el método de extracción directa Soxhlet y éter de petróleo como solvente para la obtención del extracto etéreo a partir de la muestra liofilizada y seca. El contenido en las muestras se expresó como porcentaje de materia grasa en base seca (%MG b.s.).

###### **4.4.1.6. Determinación del contenido de cenizas**

Se analizó el contenido de cenizas mediante el método AOAC 923.03 (AOAC, 2015)

## **4.4.2. Extractos**

### **4.4.2.1. Sólidos solubles**

El contenido de sólidos solubles se determinó mediante el método refractométrico descrito por la AOAC 932.12 (AOAC, 1990), utilizando un refractómetro digital para mediciones de sacarosa HI 96801 Hanna Instruments Inc., Woonsocket, Rhode Island, 02895, USA. Los resultados fueron expresados en °Brix.

### **4.4.2.2. Contenido de antocianinas individuales**

#### **4.4.2.2.1. Identificación y cuantificación de antocianinas por HPLC-DAD**

Se utilizó cromatografía líquida de fase inversa (RP-HPLC) (Waters Alliance e2695 Separation Module) acoplado a un arreglo de diodos 2998 PDA Detector (DAD) y ajustado a  $\lambda$  entre 280 y 600 nm. Para cuantificar las antocianinas presentes en los extractos, las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 9000 rpm se realizó y luego se analizaron en un sistema equipado con una columna analítica C-18 (Column- XBridge C18, 4.6 x 50 mm, 3.5). La temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C, el volumen de la inyección de cada muestra y la solución estándar fue de 20  $\mu$ L. Los disolventes utilizados fueron agua ultrapura (A), agua/ácido fórmico/acetonitrilo (87:10:3) (B), acetonitrilo de grado HPLC (C) y agua/ácido fórmico/acetonitrilo (40:10:50) (D) a un caudal de 0,8 ml/min. El programa de gradiente fue de la siguiente manera: comenzando con 90% B a 10% D (0-40 min), 86% B a 14% D (en minuto 40), 80% B a 20% D (40-44 min), 70% B a 30% D (44-50 min), 90% B a 10% D (50-55 min), 90% B a 10% D (55-60 min). La fase móvil de HPLC se preparó diariamente y fue desgasificada antes de inyectarse en la columna. El control del sistema y el análisis de datos se procesaron con el Software Empower de Waters.

Las antocianinas se detectaron a 520 nm. Cinco antocianinas como estándares: Delfinidina-3-O-glucósido, Cianidina-3-glucósido, Petunidina-3-O-glucósido, Peonidina-3-O-glucósido y Malvidina-3-glucósido fueron utilizado para la separación y

cuantificación de antocianinas. Los resultados del contenido de antocianinas fueron expresados en mg de antocianina/g de residuo liofilizado.

#### **4.4.2.2. Identificación de antocianinas por UHPLC-DAD-MS**

Las antocianinas de los extractos óptimos obtenidos por extracción convencional, ASE, EAU y SC-CO<sub>2</sub> se identificaron mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento en un equipo de UHPLC Dionex Ultimate 3000 con Detector MS Exactive plus, Thermo. El sistema está compuesto por una bomba cuaternaria modelo LPG-3400RS, un horno para columnas modelo TCC-3000RS, un automuestrador modelo WPS-3000TRS y un detector UV 3000 (Thermo Scientific, Bremen, Germany). El detector es un espectrómetro de masas Orbitrap Exactive Plus (Thermo Scientific, Bremen, Germany) equipado a un ionizador electrospray (ESI). Los datos son obtenidos con el software Xcalibur 2.8 (Thermo). El volumen de inyección fue ajustado a 5 µL. Se utilizó una columna Phenomenex Luna C18 (5 µm x 250 x 4.6 mm).

Para la identificación de antocianinas se utilizaron como fases móviles: agua con un 0,1% de ácido fórmico como disolvente A y Acetonitrilo con 0,1% ácido fórmico como solvente B, a un caudal de 0,50 mL/min. La determinación de los analitos se llevó a cabo mediante un electrospray fuente que funciona en modo de ionización positiva bajo las siguientes condiciones: resolución = 140000, temperatura del horno = 35 °C, escaneo 100-1000 m/z, flujo de gas auxiliar=11 (unidades arbitrarias), flujo de gas envolvente= 35 (unidades arbitrarias), voltaje de pulverización= 4 kV, temperatura del calentador de gas auxiliar= 150°C, temperatura capilar= 350°C. El gradiente empleado fue el siguiente: 0 minutos, 5% B; 4 minutos, 5% B; 25 minutos, 20% B; 32 minutos, 50% B; 38 minutos, 50% B; 45 minutos, 5% B, 50 minutos, 5% B. El tiempo total de ejecución fue de 50 minutos.

#### **4.4.2.3. Contenido de antocianinas totales**

El contenido de antocianinas totales se determinó por el método espectrofotométrico de pH diferencial (AOAC, 2005.02).

Para la determinación se mezcló una alícuota de extracto (100 µl) con un aforo de 10 ml de buffer de cloruro de potasio 0,025 M a pH 1,0 ajustado con ácido clorhídrico y otra alícuota (100 µl) con el mismo aforo de 10 ml de buffer de acetato de sodio 0,4 M a pH 4,5 ajustado con ácido clorhídrico y se midió la absorbancia tanto a 520 y 700 nm. Las porciones diluidas de prueba se leyeron frente a un blanco de agua destilada, esta absorbancia se midió entre 20 y 50 minutos después de la preparación. Posteriormente, se midió la absorbancia a 700 nm con el propósito de corregir la medida por la presencia de neblina debida a la presencia de compuestos degradados o sustancias interferentes.

La concentración molar de antocianinas se determinará según la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas totales (mg/L)} = \frac{A}{\epsilon \times L} \times MW \times DF \times 10^3$$

Donde;

C: concentración molar (mg/L)

A: (A520 nm - A700 nm) pH1,0 - (A520 nm - A700 nm) pH 4,50

MW: peso molecular de cianidina-3-glucosido (449,2 g/mol)

DF: factor de dilución establecido para la muestra

10<sup>3</sup>: factor de conversión de g a mg

ε: coeficiente de extinción molar de cianidina-3-glucosido (26900 L x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>)

L: longitud de recorrido en la cubeta del espectrofotómetro (1cm)

La diferencia en la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción (520 nm) es proporcional al contenido de antocianinas. Los resultados se expresaron en base a mg de equivalentes de cianidin-3-glucósido (EC3G) /g de RA liofilizado.

#### **4.4.2.4. Contenido de polifenoles totales**

La determinación del contenido fenólico total fue determinada según el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton VL y Rossi JA (1965). Para el análisis se agregaron 100 µl del extracto en un matraz de aforo de 10 ml y se adicionaron 4,9 ml de agua destilada. Seguidamente, se adicionaron 0,5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu y se esperó entre 3 y 8 minutos para luego agregar 1,7 ml de una solución de carbonato de sodio al 20%, se aforó con agua destilada, se agitó y se dejó reposar por 30 minutos en la oscuridad. Pasado ese

tiempo se midió la absorbancia en una cubeta de 10 mm a 765 nm en un espectrofotómetro de absorción UV Perkin Elmer lambda 25, contra un blanco de agua que se preparó en las mismas condiciones de la muestra. Además, para el análisis se elaboró una curva de calibración con concentraciones conocidas de ácido gálico (**Anexo 1**). Se midió la absorbancia de la muestra por duplicado en un espectrofotómetro de absorción UV Perkin Elmer lambda 25 a 765 nm en cubeta de paso óptico de 10 mm contra un blanco de agua, utilizando el software Lambda 25. Los resultados fueron expresados como mg de equivalentes de ácido gálico (mg EAG) / g de RA liofilizado.

#### **4.4.2.5. Capacidad antioxidante:**

Se determinó mediante el método de poder antioxidante de reducción férrica (FRAP) y mediante el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

##### **4.4.2.5.1. Ensayo de FRAP**

Se preparó una solución FRAP en proporción de 10:1:1 con un buffer de acetato 300 mmol/L a un pH 3,6, reactivo TPTZ, y solución acuosa de cloruro férrico hexahidratado 20 mmol/l. En ausencia de luz, la solución será incubada a 37 ° C por 10 min, y se preparará la muestra con 2700µl de solución FRAP, 270µl de agua mili Q y 30µl del extracto (diluido). Después del tiempo de incubación la absorbancia de la muestra se midió a 593 nm en una cubeta de paso óptico de 10 mm utilizando el software Lambda 25, cada 30 segundos durante 10 minutos. Las absorbancias finales de las muestras fueron comparadas con una curva de calibración de concentraciones conocidas de Trolox (**Anexo 2**) y los resultados fueron expresados como µmol equivalente de Trolox equivalente (µmol ET) / g de RA liofilizado (Benzie y Strain, 1996).

##### **4.4.2.5.2. Ensayo DPPH:**

Se preparó una solución stock del radical DPPH de concentración 10 mg aforados a 10 ml de metanol. Para las determinaciones analíticas se utilizó una solución de trabajo de DPPH

con una dilución 1/50 (v/v) de la solución madre con metanol. Para medir la capacidad antioxidante del extracto se utilizó una alícuota de 500 µl de la muestra en un matraz de aforo de 10 ml con metanol. Posteriormente, de esta solución anteriormente preparada se tomaron 0,1 ml y se mezclaron con 3,9 ml de la solución de trabajo de DPPH, esta operación se realizó para cada muestra por triplicado. Para el blanco se tomó 0,1 ml de la muestra diluida con 3,9 ml de metanol y para el control se mezclaron 3,9 ml de la solución de trabajo de DPPH con 0,1 ml de metanol, una vez agregada la solución de DPPH se incubaron las soluciones preparadas durante 30 min en la oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro de absorción UV Perkin Elmer lambda 25a 517 nm en una cubeta de paso óptico de 10 mm contra un blanco y el control. El porcentaje de degradación del DPPH (Bondet *et al.*, 1997) para las diferentes soluciones será calculado mediante la capacidad atrapadora de radicales libres, según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ decoloración} = 100 - \frac{(\text{Absorbancia de la muestra}) \times 100}{\text{Absorbancia control}}$$

Además, las absorbancias finales de las muestras fueron comparadas con una curva de calibración de concentraciones conocidas de Trolox aforado con metanol (**Anexo 3**) y los resultados fueron expresados como µmol ET/ g de RA liofilizado.

## V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La optimización se hizo mediante la correlación entre las variables independientes y las variables respuesta expresadas en función de un modelo de regresión polinomial cuadrático minimizando la variación de residuales, según la siguiente ecuación:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \varepsilon_i$$

Donde  $y$  es la respuesta esperada,  $X_i$  son las variables,  $\beta_0$  es el coeficiente constante,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$ , son los coeficientes de interacción, lineales y cuadráticos respectivamente, que evalúan dichos efectos (Jaramillo *et al.*, 2013; Yaguas, 2017).

Para optimizar simultáneamente las respuestas con una combinación deseable de valores que encuentre un punto factible donde converjan con una desviación mínima, se utilizó la herramienta de deseabilidad, la cual arrojó valores ideales u óptimo (Derringer y Suich, 1980). Cada respuesta en una función individual de deseabilidad varía entre 0 y 1 representando la cercanía de una respuesta al valor ideal. Para conocer si el modelo describe adecuadamente la superficie de respuesta real y si la ecuación polinómica es la adecuada, se utilizó el software STATGRAPHICS Centurión XV mediante el cual se estableció un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) a partir del análisis de la varianza ANOVA para evaluar la significancia estadística del modelo, así como también la significancia de las variables de este mediante un nivel de probabilidad del 5% ( $p < 0.05$ ).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Caracterización de las propiedades físicas y químicas de la materia prima inicial

La materia prima inicial (residuo/pomasa) proveniente de la elaboración de jugo de arándanos cv. Legacy muestra características físicas y químicas descritas en la **Tabla 15**; también se pueden apreciar los resultados obtenidos en el análisis proximal del mismo residuo, pero en este caso después de ser liofilizado.

**Tabla 15. Caracterización física y química del residuo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy)**

Parámetros	Residuo Fresco
pH	3,74±0,01
Sólidos Solubles (°Brix)	14,8±0,28
Humedad (%)	76,24±0,36
Actividad de Agua	0,958±0,05
	Residuo Liofilizado
Humedad (%)	3,44±0,12
Actividad de Agua	0,141±0,05
	Residuo Liofilizado ( $\bar{x} \pm D.E.$ g/100 g RA b.s.)
Carbohidratos	66,06±0,48
Fibra Total	46,79±0,37
Fibra insoluble	39,35±0,73
Fibra soluble	7,44±0,51
Proteínas	3,49±0,40
Lípidos	0,42±0,08
Cenizas	1,09±0,01

Según los resultados obtenidos en la caracterización física y química, el residuo fresco de arándano (**Tabla 15**) muestra un alto contenido de humedad (76,24±0,36%), valor similar a los reportados en la literatura, 81,45±0,46% con diferencias que se pueden explicar por la cantidad de agua disponible en el suelo durante la cosecha (Reque *et al.*, 2015). En cuanto a la fruta fresca se reportan valores de humedad de 85,78±0,62, por lo que se puede decir que, tanto la fruta fresca como la pomasa analizada en este estudio tienen un alto contenido de agua susceptible al deterioro por acción microbiana, factor importante a

tomar en cuenta cuando esta materia prima es sometida a procesos industriales y en la evaluación de pérdidas al formular productos. Por lo tanto, trabajar con residuos liofilizados contribuyó al control y conservación de la muestra al preservar sus atributos y compuestos bioactivos presentes.

Por otro lado, el residuo de arándano conserva una gran cantidad de compuestos con valor nutricional como se observa en la **Tabla 15**. Estos resultados pueden ser comparados con aquellos descritos por Reque *et al.*, 2015 en su estudio realizado a arándanos (*Vaccinium spp.*) en términos de fruta fresca, pomasa y fruta en base seca. En el cual, los carbohidratos del RA ( $51,39 \pm 1,37$ ), pH ( $4,67 \pm 0,19$ ) y sólidos solubles ( $10,50$  °Brix) son menores a los valores obtenidos en este estudio a excepción del pH donde ocurre que el valor es mayor a los presentados en el presente estudio ( $66,06 \pm 0,48\%$  para carbohidratos,  $3,74$  para el pH y  $14,8 \pm 0,28$  °Brix para sólidos solubles). De la misma forma en cuanto al contenido de proteínas ( $4,67 \pm 0,19\%$ ), lípidos ( $0,67 \pm 0,02\%$ ) y cenizas ( $1,59 \pm 0,06\%$ ); Reque *et al.*, 2015 presentan valores superiores a los descritos en el presente estudio ya que, para proteínas se obtuvieron valores de  $3,49 \pm 0,40\%$ ,  $0,42 \pm 0,08\%$  para lípidos y  $1,09 \pm 0,01\%$  para cenizas. En este estudio también se demostró que la pomasa de arándano cv Legacy contiene un alto nivel de fibra dietética total, soluble e insoluble obteniendo valores iguales a  $46,79 \pm 0,37\%$ ,  $7,44 \pm 0,51\%$  y  $39,35 \pm 0,73$ , respectivamente. Igualmente, en un estudio realizado a polvos deshidratados obtenidos a partir de bagazo de arándano llevado a cabo por Mediana (2017) se registraron porcentajes similares de  $13 \pm 0,2\%$  para fibra dietética soluble,  $26,1 \pm 0,2\%$  de fibra dietética insoluble y  $39,1 \pm 0,2\%$  de fibra dietética total, lo que sigiere que la pomasa de arándano es además una buena fuente de fibra abriéndose la posibilidad de obtenerla como suplemento alimenticio.

Las diferencias obtenidas en cuanto a la composición física y química con relación a los estudios tomados como referentes puede deberse especialmente al tipo de cultivo de arándano analizado, ya que la composición del fruto va a depender de su estación de cosecha, condiciones y ubicación geográfica del suelo de sembrío, el estado de maduración del fruto incluso las condiciones climáticas y condiciones de riego pueden afectar los resultados obtenidos. Sin embargo, se coincide en que la pomasa de arándano

comparada con el fruto entero fresco según datos entregados por la USDA (Departamento de Agricultura de Estados Unidos, 2013) y Vasco *et al.*, 2009, posee un contenido destacable de nutrientes como se muestra en la **Tabla 16**. De esta manera analizando y comparando los resultados se tiene que en promedio en la pomasa se obtienen aproximadamente un 50% de carbohidratos del total reportados para el fruto entero, en cambio para proteínas, lípidos, cenizas, pH, sólidos solubles y humedad la diferencia entre el fruto entero y la pomasa son mínimas (0,3% aproximadamente). Al contrario, la fibra dietética total, soluble e insoluble resulta superior en el análisis de la pomasa de arándano con relación al fruto entero en un 16% aproximadamente, esto puede deberse a que la pomasa está constituida de restos de piel, pulpa y semillas del fruto ricas en polisacáridos, hemicelulosa, lignina y celulosa.

**Tabla 16. Análisis proximal del fruto entero y pomasa del arándano azul**

Parámetro	Fruto entero (% b.s)			Pomasa (% b.s)	
	Reque <i>et al.</i> ,2015	Vasco <i>et al.</i> ,2009	USDA	Reque <i>et al.</i> ,2015 Medina, 2017	Análisis propio
<b>Carbohidratos</b>	93,37	88,95	91,77	51,39±1,37	66,06±0,48
<b>Proteínas</b>	4,10±0,08	3,68	4,31	4,67±0,19	3,49±0,40
<b>Lípidos</b>	0,73±0,06	5,26	0,33	0,67±0,02	0,42±0,08
<b>Cenizas</b>	1,80±0,01	2,11	1,52	1,59±0,06	1,09±0,01
<b>pH</b>	2,92±0,00	2,56-3,15	-	2,94±0,00	3,74±0,01
<b>Sólidos Solubles (°Brix)</b>	10,67±0,29	-	-	10,50±0,00	14,8±0,28
<b>Humedad</b>	85,78±0,62	81±2,00	84,21	81,45±0,46	76,24±0,36
<b>Fibra soluble</b>	-	6.0±1,0	-	13.0±0,2	7,44±0,51
<b>Fibra insoluble</b>	-	32,5±2,5	-	26,1±0,2	39,35±0,73
<b>Fibra Total</b>	-	38±2,2	-	39,1±0,2	46,79±0,37

Resultados presentados como promedio ± desviación estándar y expresados en g/100 g de residuo (base seca) (Reque *et al.*, 2015; Vasco *et al.*, 2009)

## **6.2. Experimentos de extracción convencional de antocianinas a partir de residuos de arándanos.**

En el presente estudio, utilizando el método de extracción convencional se pretende maximizar la extracción de antocianinas a partir de residuos de arándano mediante la combinación de múltiples factores que afectan este proceso, en específico, temperatura, tiempo y la concentración del disolvente. Los resultados del diseño experimental Box-Behnken se observan en la **Tabla 17**. Se aprecia en general una tendencia al aumento en la extracción de antocianinas totales, polifenoles totales y de la actividad antioxidante al aplicar valores intermedios o altos de etanol, temperatura y tiempo determinados. Por ejemplo, el incremento de etanol (50:50 – 75:25 % v/v), temperatura (aprox. 60 °C) y tiempo (aprox. 90-120 min) causan un aumento de las cuatro variables respuestas estudiadas con el valor más alto en relación con los otros experimentos. Una situación distinta se observa al combinar el nivel superior de etanol (100%) con un nivel inferior de temperatura (20 °C) e intermedio de tiempo (90 min), donde las mismas variables respuesta disminuyeron en comparación a los valores anteriores. Desglosando los resultados, en cuanto al contenido total de antocianinas para la misma temperatura de 20 °C, un tiempo de 60 minutos y una concentración de 75% v/v (etanol) se obtuvieron valores más altos, mientras que, con una concentración de disolvente del 100% de etanol, una constante de 90 minutos y una temperatura de 20 °C disminuyó el contenido de antocianinas totales. Con respecto al contenido de polifenoles totales, se muestra que a una temperatura de 60 °C, a una concentración constante de 50% v/v (etanol) y en un tiempo de 90 minutos se obtuvieron los valores más elevados con respecto a los demás experimentos, al contrario, con temperaturas de 20 °C, tiempo de 90 minutos y una concentración del 100% etanol, los valores que se obtuvieron en el diseño fueron los más bajos. Para la actividad antioxidante, en cuanto a la metodología de FRAP se observaron valores superiores en los experimentos con una combinación de temperatura de 60 °C, una constante de concentración de etanol del 50 %v/v y un tiempo de 90 min, al igual que en el caso del contenido de antocianinas y polifenoles totales los valores inferiores entre los experimentos resultaron de una combinación entre una temperatura de 20 °C, una

concentración de etanol al 100% y un tiempo de 90 minutos. Finalmente, para DPPH, los valores más altos también se observaron a un nivel intermedio del disolvente (50% etanol), una constante de 60 min y una temperatura de 120 °C, en contraste, los valores más bajos en el grupo de experimentos se obtuvieron con la combinación de una constante en la concentración de disolvente (100% etanol), tiempo de entre 40 minutos y una temperatura aproximada de 60 °C.

Por lo tanto, estos resultados muestran la relevancia de una correcta elección de solventes o de sus mezclas y de la temperatura en la extracción de este grupo de compuestos.

**Tabla 17. Caracterización química de los extractos obtenidos con extracción convencional**

Exp.	Tiempo (min)	Etanol (% v/v)	Temperatura (°C)	Antocianinas Totales	Polifenoles Totales	FRAP	DPPH
1	120	75	60	11,83 ± 0,38	30,30 ± 0,42	177,43 ± 1,78	255,95 ± 7,17
2	90	100	60	12,54 ± 0,19	19,70 ± 0,32	123,40 ± 2,07	171,66 ± 0,35
3	60	100	40	9,58 ± 0,76	12,5 ± 0,17	85,32 ± 2,38	125,96 ± 4,66
4	60	75	60	11,08 ± 0,12	31,2 ± 0,32	183,80 ± 1,50	231,72 ± 7,62
5	90	75	40	11,72 ± 0,47	26,20 ± 0,39	174,81 ± 1,91	231,01 ± 4,07
6	60	75	20	12,75 ± 0,40	24,70 ± 0,35	141,29 ± 1,36	215,64 ± 9,75
7	120	100	40	9,37 ± 0,33	13,00 ± 0,35	96,83 ± 0,94	132,11 ± 9,68
8	90	50	20	12,28 ± 0,75	30,00 ± 0,39	186,52 ± 1,66	262,60 ± 0,92
9	90	75	40	11,66 ± 0,30	26,50 ± 0,38	158,28 ± 0,21	229,36 ± 9,14
10	120	75	20	12,70 ± 0,40	25,90 ± 0,59	174,07 ± 1,34	190,93 ± 4,05
11	90	75	40	12,43 ± 0,46	28,00 ± 0,45	177,44 ± 2,02	262,99 ± 8,15
12	90	100	20	7,33 ± 0,33	9,40 ± 0,35	71,75 ± 2,51	177,22 ± 1,33
13	60	50	40	11,71 ± 0,45	33,6 ± 0,28	200,22 ± 1,65	279,70 ± 2,67
14	120	50	40	10,77 ± 0,09	34,3 ± 0,10	194,67 ± 1,87	320,06 ± 1,80
15	90	50	60	12,26 ± 0,05	44,2 ± 0,59	231,71 ± 1,21	310,93 ± 4,23

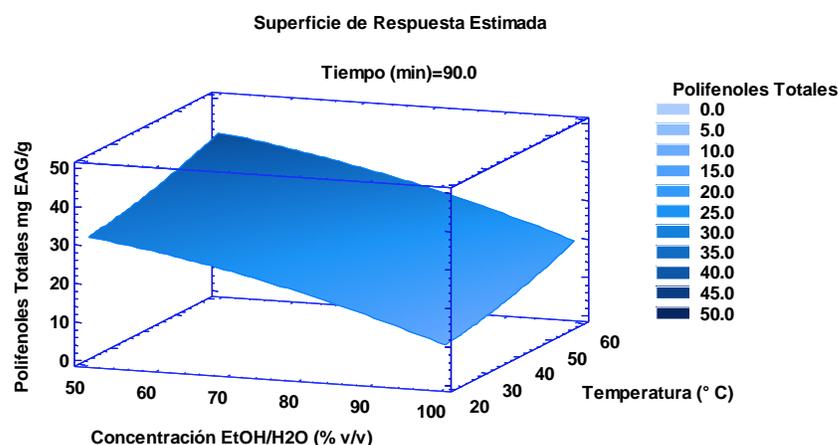
Resultados presentados como promedio ± desviación estándar. Antocianinas totales: mg equivalentes de Cianidina 3-glucósido/g RA liofilizado. Polifenoles totales: mg equivalentes de ácido gálico/g RA liofilizado. FRAP: μmol equivalentes de Trolox/g RA liofilizado. DPPH: μmol equivalentes de Trolox/g RA liofilizado.

### 6.3. Caracterización de las propiedades físicas y químicas de los extractos obtenidos con la extracción convencional

#### 6.3.1. Contenido de Polifenoles Totales

En la **Tabla 17** se presenta el contenido de polifenoles totales obtenidos en las diferentes experiencias del diseño propuesto. La concentración de polifenoles totales fluctuó entre un mínimo de 9,4 y un máximo de 44,2 mg EAG/g residuo liofilizado.

El valor superior del coeficiente de determinación ( $R^2=98,66$ ) del modelo seleccionado para predecir la concentración de polifenoles totales de los extractos permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (**Figura 11**).



*Figura 11.* Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Polifenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con extracción convencional y variables independientes de Temperatura, tiempo y concentración de etanol

En la **Figura 11**, la región azul intenso del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación temperaturas moderadas (60 °C), un aumento de tiempo (95 min) y concentraciones intermedias de disolvente (50% v/v) como condiciones de proceso mediante el método convencional se puede obtener la mayor concentración de polifenoles totales (44,9 mg EAG/g RA) a partir de residuos de arándanos cv Legacy como se muestra en la **Tabla 18**.

**Tabla 18.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de polifenoles totales

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	50,0	100,0	50,0

Temperatura (° C)	20,0	60,0	59,9
Tiempo (min)	60,0	120,0	95,1

Valor óptimo = 42,99 mg EAG/g RA

Por otra parte, al realizar el análisis de varianza (**Anexo 4.1**) para la cantidad de polifenoles totales y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que la influencia de la concentración de etanol y la temperatura tuvieron efectos significativos ( $p < 0.05$ ). Esto se puede corroborar en el diagrama de Pareto (**Anexo 4.1**), donde se puede apreciar que tanto la concentración de etanol (mayor incidencia) y la temperatura fueron significativas. Sin embargo, se puede asumir también que el efecto lineal de la concentración del disolvente tiene una influencia negativa al llegar a cierto punto debido a que un aumento en la concentración de etanol (100%) y una disminución de temperatura (20 °C) puede influir de manera negativa en el proceso y dar como resultado un menor contenido de polifenoles totales en el extracto, mientras que el efecto lineal de la temperatura por sí sola resulta ser positiva demostrando de esta manera que al aumentar la temperatura a valores moderados (60 °C), se obtienen mayores rendimientos de polifenoles totales en los extractos.

### 6.3.2. Contenido de Antocianinas Totales

La **Tabla 17** muestra el contenido de antocianinas totales resultantes de los diferentes tratamientos aplicados en el diseño experimental. La concentración de antocianinas totales fluctuó entre un mínimo de 7,33 y un máximo de 12,75 mg EC3G/ g de residuo de arándano liofilizado.

El valor del coeficiente de determinación ( $R^2=73,5$ ) del modelo seleccionado para predecir la concentración de polifenoles totales de los extractos permitió interpretar los resultados mediante el gráfico de superficies de respuesta (**Figura 12**).

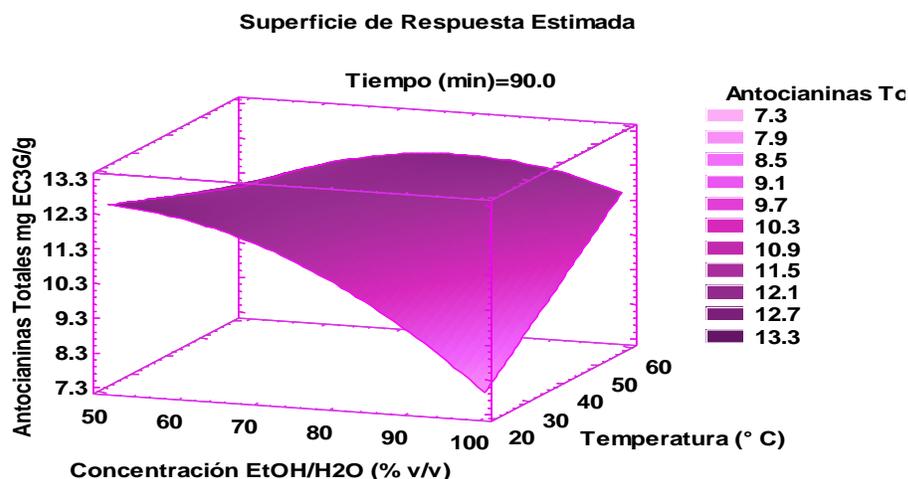


Figura 12. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Antocianinas Totales (mg equivalentes de cianidin-3 glucósido/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con extracción convencional y variables independientes de Temperatura, tiempo y concentración de etanol

En la **Figura 12**, la región de color púrpura intenso del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación temperaturas iguales a 60 °C, un aumento de tiempo (60 min) y concentraciones intermedias de disolvente (78,4 % v/v) se puede obtener la mayor concentración de antocianinas totales (12,75 mg EC3G/g residuo liofilizado). Siendo estas las condiciones óptimas para la maximización del contenido de antocianinas totales en los extractos del método convencional a partir de residuos de arándanos como se observa en la **Tabla 19**.

**Tabla 19.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de antocianinas totales

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	50,0	100,0	78,45
Temperatura (°C)	20,0	60,0	60,0
Tiempo (min)	60,0	120,0	60,0

Valor óptimo = 12,61 mg EC3G/g RA

Según el análisis de varianza (**Anexo 4.2**) para la cantidad de antocianinas totales y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que el efecto lineal de la concentración de etanol tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ), de igual manera la interacción entre la concentración de etanol y la temperatura. Esto se puede corroborar en el diagrama de

Pareto (**Anexo 4.2**), donde se puede apreciar que la concentración de etanol (mayor incidencia) tiene una influencia negativa en el modelo, es decir que, un aumento en la concentración de etanol (100%) disminuye el contenido de antocianinas totales en el extracto, mientras que la interacción entre la concentración de etanol y la temperatura resulta ser positiva demostrando de esta manera que al aplicar una temperatura de 60 °C y al mantener la concentración de etanol a valores intermedios (78,4 %v/v), se obtienen mayores rendimientos de antocianinas totales en los extractos.

### 6.3.3. Actividad Antioxidante: FRAP

La **Tabla 17** muestra la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por el método convencional aplicando las diferentes experiencias en términos de FRAP. Los valores que se observaron fluctúan entre un mínimo de 71,75 y un máximo de 231,71  $\mu\text{mol ET/g}$  de residuo de arándano liofilizado. El valor del coeficiente de determinación ( $R^2=98,9$ ) del modelo seleccionado para predecir la capacidad antioxidante (FRAP) de los extractos permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (**Figura 13**).

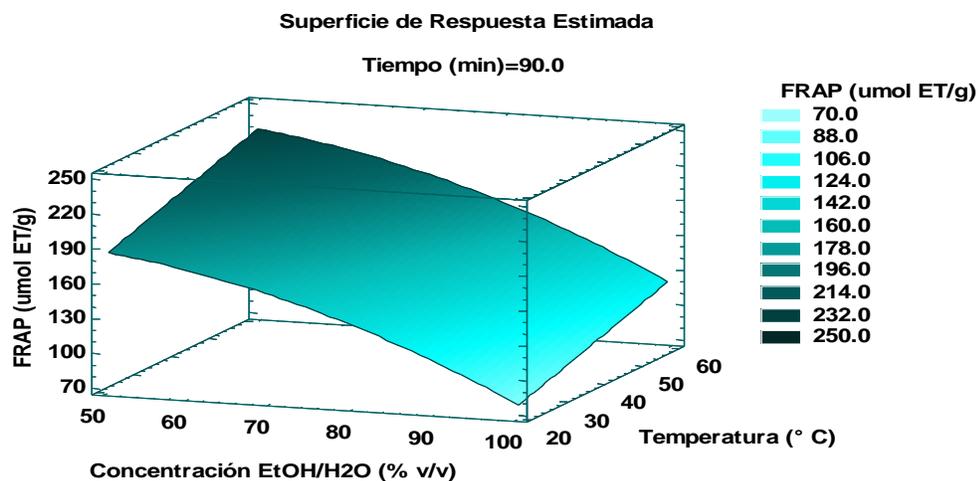


Figura 13. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para FRAP ( $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/g) de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con extracción convencional y variables independientes de Temperatura, tiempo y concentración de etanol

En la **Figura 13** la región de color celeste intenso del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación temperaturas moderadas (60 °C), un aumento de

tiempo (82,6 min) y concentraciones intermedias de disolvente (50 % v/v) se pueden obtener valores elevados de capacidad antioxidante del extracto obtenido (231,71  $\mu\text{mol ET/g}$  residuo liofilizado). A estas condiciones óptimas se pueden maximizar los valores de FRAP en los extractos del método convencional a partir de residuos de arándanos como se observa en la **Tabla 20**.

**Tabla 20.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando actividad antioxidante FRAP

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	50,0	100,0	50,0
Temperatura (° C)	20,0	60,0	60,0
Tiempo (min)	60,0	120,0	82,69

Valor óptimo = 231,13  $\mu\text{mol ET/g RA}$ .

Por otra parte, al realizar el análisis de varianza (**Anexo 4.3**) para FRAP y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que la influencia de la concentración de etanol y la temperatura además de sus efectos cuadráticos tuvieron efectos significativos ( $p < 0.05$ ). Esto se puede corroborar en el diagrama de Pareto (**Anexo 4.3**), donde se puede apreciar que el efecto lineal de la concentración del disolvente tienen una influencia negativa, al llegar a cierto punto debido a que un aumento en la concentración de etanol (100%) puede influir de manera negativa en el proceso y dar como resultado valores inferiores de FRAP en el extracto ya que esta variable es la de mayor incidencia, mientras que el efecto lineal de la temperatura por sí sola resulta ser positiva demostrando de esta manera que al aumentar la temperatura a valores moderados (60 °C), se obtienen mayores de FRAP en los extractos.

#### **6.3.4. Actividad Antioxidante: DPPH**

La Tabla 17 muestra la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por el método convencional aplicando las diferentes experiencias mediante DPPH. Los valores que se observaron fluctúan entre un mínimo de 125,96 y un máximo de 320,06  $\mu\text{mol ET/g}$  de residuo de arándano liofilizado. El valor del coeficiente de determinación ( $R^2=93,9$ ) del modelo seleccionado para predecir la capacidad antioxidante (DPPH) de los extractos

permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (**Figura 14**).

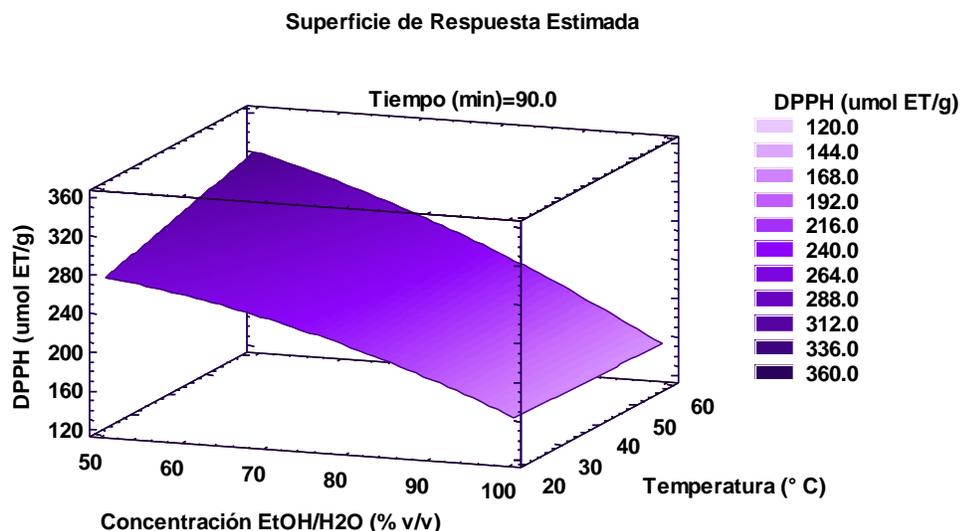


Figura 14. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para DPPH ( $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/ g de residuo) de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con extracción convencional y variables independientes de Temperatura, tiempo y concentración de etanol

En la **Figura 14** la región violeta intensa del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación temperaturas moderadas ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), un aumento de tiempo ( $103,6\text{ min}$ ) y concentraciones intermedias de disolvente ( $50\% \text{ v/v}$ ) se puede obtener la mayor actividad antioxidante en términos de DPPH ( $325,5\text{ }\mu\text{mol ET/ g}$  de residuo) describiendo de esta manera el mejor modelo de selección para predecir dicha actividad, a estas condiciones óptimas se puede obtener una maximización de la actividad antioxidante (DPPH) en los extractos del método convencional a partir de residuos de arándanos cv Legacy como se observa en la **Tabla 21**.

**Tabla 21.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando la actividad antioxidante DPPH

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	50,0	100,0	50,0
Temperatura (° C)	20,0	60,0	60,0
Tiempo (min)	60,0	120,0	103,6

Valor óptimo =  $325,57\text{ }\mu\text{mol ET/ g RA}$

Según el análisis de varianza (**Anexo 4.4**) para la actividad antioxidante (DPPH) y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que únicamente la influencia de la concentración de etanol tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ). Esto se puede corroborar en el diagrama de Pareto (**Anexo 4.4**), donde se puede apreciar que si bien concentración de etanol tiene influencia en el diseño dicho efecto es negativo en el proceso, es decir que a mayor concentración de etanol menores serán los valores de capacidad antioxidante que se obtengan en términos de DPPH.

### 6.3.5. Optimización del tiempo, temperatura y concentración de disolvente para la metodología de extracción convencional sobre el contenido de antocianinas totales, polifenoles totales, FRAP y DPPH

Para determinar el tiempo, temperatura y concentración de disolvente (etanol) óptimos para la extracción convencional se procedió a transformar las variables respuesta (contenido total de antocianinas, polifenoles totales, FRAP y DPPH) en una variable llamada “Desirability” o “Deseable”, por lo cual se requiere determinar cuál es la combinación de tiempo, temperatura y concentración del disolvente en el proceso de extracción para determinar el valor máximo de las cuatro variables respuesta en los residuos de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy.

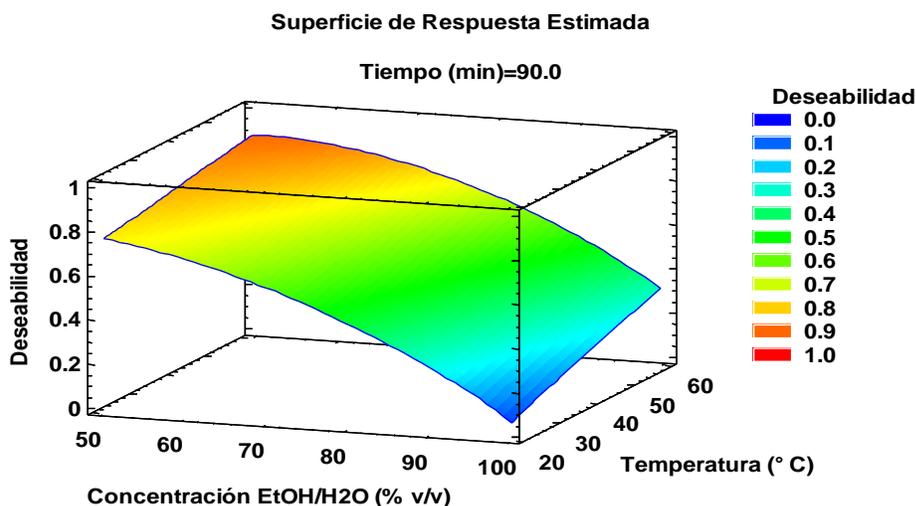


Figura 15. Superficie respuesta del valor deseable de concentración de antocianinas y polifenoles totales en los extractos obtenidos por el método convencional a partir de residuos de arándano

Como se puede apreciar en la **Figura 15** de superficie respuesta, el valor deseable máximo de antocianinas, polifenoles totales, DPPH y FRAP se encuentran en la zona más oscura del gráfico (naranja), en la cual se obtuvieron valores para una combinación óptima de temperatura (60 °C), a un tiempo (84,6 minutos) y concentración de etanol (50,4 % v/v) en el proceso de extracción convencional como se muestra en la **Tabla 22**. Resultados similares para optimizar la extracción y mejorar los rendimientos de polifenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidantes (DPPH) a partir de arándanos enteros por el método convencional se obtuvieron en el trabajo realizado por Wang *et al.*, 2016 estableciendo como parámetros óptimos una concentración de disolvente 60% metanol, 50 °C y 1 hora de extracción. Se puede notar que la concentración utilizada tanto con metanol como etanol son bajas esto puede deberse a que existe una disociación de antocianinas poliméricas en menos mezcla de solventes polares, lo cual se comprueba con la literatura que menciona que en la extracción convencional se usan concentraciones del 60 al 80% de metanol, etanol y acetona para extraer estructuras complejas de antocianinas con diferentes polaridades. Por otro lado, referente al tipo de solvente diversos estudios han comprobado que la utilización de acetona resulta en la mejora del contenido de polifenoles totales recuperados en el extracto debido a que las antocianinas poliméricas menos polares son más fáciles de extraer en solventes menos polares por ejemplo en una mezcla de metanol-acetona puede mejorar la extracción. Según el estudio realizado por Deng *et al.*, 2014 muestra que en la extracción convencional de arándanos, los mejores resultados en la obtención del contenido de polifenoles totales y antocianinas totales se obtuvieron cuando la extracción se hizo con metanol como disolvente en comparación con etanol y acetona. Otro estudio realizado por Cheok *et al.*, 2012 igualmente demostró que el metanol es el mejor disolvente en la extracción convencional para la obtención de polifenoles de cáscaras de mangostán comparada con etanol, acetona, isopropanol, acetato de etilo y agua destilada (Wang *et al.*, 2016).

**Tabla 22.** Optimización de las cuatro Variables Respuesta maximizando la concentración de antocianinas totales, polifenoles totales, actividad antioxidante DPPH y FRAP

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
--------	------	------	--------

Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	50,0	100,0	50,40
Temperatura (° C)	20,0	60,0	60,0
Tiempo (min)	60,0	120,0	84,66

Valor deseabilidad= 0,893

Por otro lado, Zapata, Heredia, *et al.*, 2014 en su trabajo para la optimización de extracción de arándanos obtuvo los siguientes parámetros para una mejor extracción de compuestos fenólicos: temperatura 45 °C, tiempo de extracción 2 horas y etanol acidificado con 1% de ácido cítrico como solvente en la extracción, obteniendo resultados favorables para el contenido de antocianinas en arándanos frescos.

Con relación a estudios realizados a residuos de arándano (*Vaccinium spp.*) aplicando metodología convencional destacan los realizados por Li *et al.*, 2013 sobre residuos de arándano *Vaccinium ashei* cuyos parámetros de extracción reportados corresponden a una concentración de solvente EtOH 70%+ ácido acético 0,5%, tiempo: 24 h y temperatura: 4 °C en la oscuridad con la obtención de 2694 ± 29 mg EAG/100 g pomasa liofilizada para polifenoles totales, otro realizado por Flores *et al.*, 2014 sobre residuos de arándano (*Vaccinium corymbosum*) cuyos parámetros aplicados en relación a la concentración de solvente ETOH acuoso (80% v/v), temperatura: 22 °C y tiempo: 24 h resultan en una obtención de 1,88 mg C3G/g muestra para antocianinas totales y 4,04 mg EAG/ g muestra para polifenoles totales. Machado *et al.*, 2017 analizando residuos de arándanos (*Vaccinium myrtillus*) mediante la extracción convencional aplicando una temperatura de 80 °C, concentración de solvente (EtOH): 100%, en un tiempo de 5 horas obtuvieron 2,58 ± 0,13 mg EC3G/g residuo seco de antocianinas totales, 6,83 ± 0,86 mg EAG/g residuo seco de antocianinas totales y DPPH: 40,38 ± 1,42 µmol ET/g residuo seco. Kityté *et al.*, 2020 por otro lado reporta para residuos de *Vaccinium vitis-idaea* L con extracción convencional aplicando una concentración de solvente (ETOH: H<sub>2</sub>O): 70/30 v/v, temperatura: 20 °C por 720 minutos con resultados para polifenoles totales igual a 19 mg EAG/g pomasa. Con estos datos registrados en la bibliografía se puede notar que la mayoría de autores coinciden en que la concentración de solvente adecuada para la extracción de antocianinas y polifenoles a partir de residuos de arándano oscila entre un 70-100% v/v EtOH-H<sub>2</sub>O con una temperatura que va desde los 4 a los 80 °C y tiempos de

5 a 24 horas obteniendo valores de antocianinas totales de 1,88-2,58 mg EC3G/g residuo, de polifenoles totales de 4,04-26,94 mg EAG/g pomasa y DPPH de  $40,38 \pm 1,42$   $\mu\text{mol}$  ET/g residuo seco. Se puede notar el amplio rango de las condiciones de extracción, así como también la variación en sus rendimientos. Sin embargo, un trabajo recientemente realizado por Mesa *et al.*, 2021 sobre residuos de *Vaccinium corymbosum* cuya optimización de parámetros resulta en una concentración de solvente: etanol-agua: 45% (pH: 2), tiempo: 108 min y temperatura: 50 °C obteniendo antocianinas totales=2,72 mg EC3G/g residuo, polifenoles totales=3,35 mg EAG/g residuo y DPPH= 5,28 mg ET/g residuo siendo estos parámetros comparables con el presente estudio porque según la aplicación de las condiciones óptimas reportadas para el proceso experimental bajo una concentración de EtOH-H<sub>2</sub>O de 50,40 %v/v, temperatura de 60 °C en un tiempo de 84,66 min se lograron obtener rendimientos de antocianinas totales igual a 25,61 mg EC3G/ g residuo, polifenoles totales igual a 53 mg EAG/ g residuo, FRAP igual a 381,29  $\mu\text{mol}$  ET/g residuo seco y DPPH igual a 197,48  $\mu\text{mol}$  ET/g residuo seco, **Tabla 23**; lo que indicaría que a pesar de aplicar similares condiciones de proceso se consiguieron valores superiores, es así que la optimización se puede considerar necesaria para cada cultivo de arándano. Las diferencias entre los valores predichos y experimentales obtenidos se pueden explicar debido a que, en el modelo un porcentaje no es explicado por los parámetros analizados así se demuestra con los valores de regresión utilizados para el estudio de cada variable respuesta y de esta manera sobre o subestimando estas variables.

**Tabla 23.** Valores de las variables respuesta (polifenoles totales, antocianinas totales, FRAP, DPPH) en el Extracto Convencional Óptimo del modelo predicho y experimental de residuos de arándano liofilizado.

<i>Respuesta</i>	<i>Óptimo predicho</i>	<i>Óptimo experimental</i>
<b>Antocianinas Totales</b>	11,08	25,61± 1,31
<b>Polifenoles Totales</b>	41,6	53 ± 6,65
<b>FRAP</b>	230,72	381,29 ± 13,54
<b>DPPH</b>	319,86	197,48 ± 8,25

Resultados presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Antocianinas totales: mg equivalentes de cianidina 3-glucósido/g de residuos de arándanos liofilizados. Polifenoles totales: mg equivalentes de ácido gálico/g de residuo de arándanos liofilizados. FRAP:  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/g de residuo de arándano liofilizado. DPPH:  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/g de residuo de arándano liofilizado

La extracción de residuos de arándano mediante el método convencional con solventes es utilizada tradicionalmente para la obtención de polifenoles totales y antocianinas, en este estudio igualmente fue eficiente. En los análisis los resultados indican que, de las variables con significancia escogidas para este estudio capaces de mejorar la extracción del contenido de polifenoles totales, antocianinas totales, FRAP y DPPH en general fueron: la concentración del disolvente (-) (Etanol: agua acidulada con ácido acético al 0,5%) y la temperatura (+), mientras que el tiempo no mostró ninguna significancia en el modelo.

A partir de lo anterior, se nota la diferencia de criterios a la hora de escoger las condiciones de proceso para la extracción partiendo desde el tipo de solvente y su concentración para la obtención de compuestos fenólicos. Para este parámetro la polaridad de los compuestos es el factor que debe tomarse en cuenta a la hora de realizar una extracción por el método convencional tomando en cuenta la polaridad de los solventes que pueden utilizarse (polaridad: acetona < etanol < metanol < agua) (Wang *et al.*, 2016).

De esta manera, para esta tesis la extracción convencional de antocianinas, polifenoles y análisis de capacidad antioxidante (FRAP y DPPH) a partir de residuos de arándano cv Legacy se escogió al etanol como solvente debido a que, la estructura polifenólica de las antocianinas contienen grupos hidroxilo y oxígeno cargado en el anillo de pirano por lo que son compuestos polares, así la mezcla hidroalcohólica proporciona máxima eficiencia de extracción además de la mayor desorción de la materia vegetal. Con este tipo de solvente se obtuvieron resultados comparables con otros estudios que utilizan metanol en sus modelos, además el etanol presenta la ventaja de ser un solvente seguro para su utilización en la industria alimentaria. En estas mezclas el agua ayuda a detener el complejo que se forma entre la matriz y el soluto por su alta polaridad (Garcia-Mendoza *et al.*, 2017; Paes *et al.*, 2014). Además de que reduce la constante dieléctrica del disolvente acuosos mejorando la difusión de moléculas (Bamba *et al.*, 2018). También cabe destacar que, la adición de un ácido débil como el ácido acético genera un entorno ligeramente ácido, favorable para el catión flavilo evitando la rotura de enlaces de ácido acílico aromático o grupos acilo dicarboxilo alifático en antocianinas actuando

positivamente sobre los valores altos en el contenido recuperado (Wang *et al.*, 2016). Los disolventes acidificados desnaturalizan las membranas de la células, mejorando la solubilización de las antocianinas que en principio se encuentran en las vacuolas de las células vegetales pigmentadas (Paes *et al.*, 2014).

Analizando la influencia que tiene la temperatura en el método de extracción la literatura menciona que la temperatura generalmente acelera los procesos de reacción, es así que si se llega a los 50 °C se puede aumentar la solubilidad de las antocianinas y el coeficiente de difusión por ello el método se favorece. Sin embargo, las temperaturas superiores podrían degradar las antocianinas extraídas por efecto del calor debido a que la antocianina pierde el azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y hay apertura del anillo polifenólico (Luchese, Abdalla, *et al.*, 2018) con la posterior producción de chalconas (compuestos incoloros) por una disociación de las antocianinas poliméricas a estructuras más pequeñas (Ichiyanagi *et al.*, 2002), es decir se produce una degradación inducida por el calor (Silva *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016).

Junto con la utilización de disolventes con pH bajo y temperaturas altas se liberan fenoles de bajo peso molecular en la extracción maximizando el contenido de antocianinas en el extracto, las mismas que son más estables en medio ácido ya que encuentran condiciones favorables para la formación de iones flavílicos que dan como resultado coloraciones rojas de las antocianinas monoméricas (García-Mendoza *et al.*, 2017). Por ello son lógicos los resultados obtenidos en este estudio ya que tanto la concentración del disolvente como la temperatura son importantes en este tipo de extracción, mientras que el tiempo es uno de los factores alternativos para mejorar potencialmente el método, lo cual queda comprobado ya que en este caso el tiempo no fue significativo ni para la extracción del contenido de polifenoles totales, antocianinas totales, FRAP ni DPPH.

En base a lo expuesto, cuando hubo una combinación entre la concentración de etanol (50% v/v) y temperaturas intermedias (60 °C) se obtuvieron mayores contenidos de antocianinas y polifenoles totales. Además, se observó que a medida que se aumenta la concentración del disolvente y cuando se disminuye la temperatura, menores fueron las

concentraciones obtenidas. Esto puede ser debido a que la temperatura hace que se incremente la solubilidad de las antocianinas de esta manera, el coeficiente de difusión del disolvente líquido (etanol) en la matriz sólida favorece la cinética de desorción de los compuestos de la matriz (Heras *et al.*, 2013).

Por otro lado, se transformaron los valores del residuo seco a fresco utilizando la humedad del residuo (n=24). En cuanto al valor más alto recuperado que se obtuvo para el contenido de polifenoles totales (10,60 mg EAG/g RA fresco) se puede comparar con los valores obtenidos en el trabajo realizado por Luchase *et al.*, 2018 al analizar residuos de arándano (16,81mg de ácido gálico/g de fruta fresca).

Para el contenido de antocianinas mediante extracción convencional se obtuvieron valores máximos de 12,75 mg EC3G/ g de residuo de arándano liofilizado similares a los obtenidos en el trabajo realizado por Luchase *et al.*, 2018 a residuos de arándano 17,4 mg antocianina / g bagazo seco.

Se puede decir que los valores obtenidos son similares a los resultados mostrados en otros trabajos donde igualmente se analizan residuos de arándano atribuyéndose estas diferencias a las condiciones climáticas durante el cultivo o por las diferentes regiones donde se plantaron los arándanos (Skrovankova *et al.*, 2015). Sin embargo, también hay que señalar que como indica Luchese., 2018, los valores obtenidos con FRAP como método evaluador de la capacidad reductora por transferencia de electrones y con DPPH como método evaluador de la capacidad de la muestra para neutralizar radicales libres, no justificarían el alto contenido de antocianinas totales y menos aún el contenido de polifenoles totales obtenidos por el mismo método de extracción, ya que de otra manera si el valor hubiera sido superior probablemente indicaría que los valores obtenidos para la capacidad antioxidante, además de corresponder al contenido de antocianinas totales también los extractos posee otros compuestos, lo que bien se indican al comparar las respectivas obtenciones máximas aplicando las condiciones óptimos (25,61 mg EC3G/g RA liofilizado para antocianinas y 53 mg EAG/ g RA liofilizado para polifenoles totales), estos compuestos fenólicos pueden ser ácidos fenólicos, flavonoides-flavonoles, taninos

y ácido ascórbico (Luchese, Abdalla, *et al.*, 2018), ya que son compuestos que se encuentran contenidos en gran cantidad en las bayas y actúan como fuentes antioxidantes. El trabajo realizado por Silva *et al.*, 2017 muestra que el residuo de arándano (orujo) analizado, contiene aproximadamente el 52% de la actividad antioxidante de la fruta entera demostrando que los compuestos presentes en la piel contribuyen a las propiedades antioxidantes del arándano debido a la mayor presencia de antocianinas en esta estructura. El jugo de arándano tiene baja capacidad antioxidante (11,14  $\mu\text{mol ET/ ml}$ ), aunque es más alto que la capacidad antioxidante del arándano como fruto entero (0,77 a 2,17 g ET / L) (Silva *et al.*, 2017).

#### **6.4. Experimentos de extracción asistida con solventes (ASE) a partir de residuos de arándanos.**

En el presente estudio, según el método de extracción con ASE, se pretende maximizar la extracción de antocianinas y polifenoles totales a partir de residuos de arándano mediante la combinación de múltiples factores que afectan este proceso, específicamente: Ciclos estáticos de extracción, temperatura y concentración del disolvente. Los resultados del diseño experimental Box-Behnken se observan en la **Tabla 24**. Se aprecia en general una tendencia al aumento en la extracción de antocianinas totales, polifenoles totales y de la actividad antioxidante al aplicar valores altos de etanol, temperaturas moderadas y ciclos de extracción mínimos. En general, el incremento de etanol (80:20 % v/v), temperatura (50 °C) y ciclos estáticos (1) causan un aumento de las cuatro variables respuestas estudiadas con el valor más alto en relación con los otros experimentos realizados en el diseño. Una situación distinta se observa al combinar el nivel bajo de etanol: agua (20:80% v/v) con un nivel inferior de temperatura (40 °C) y un aumento en los ciclos estáticos (3), donde las mismas variables respuesta disminuyeron en comparación a los valores anteriores.

**Tabla 24. Caracterización Química de los extractos obtenidos con extracción acelerada de solvente**

Exp.	Etanol (% v/v)	Temperatura (°C)	Ciclos estáticos	Antocianinas Totales	Polifenoles Totales	FRAP	DPPH
1	50	40	1	14,91 ± 0,31	37,70 ± 0,51	331,00 ± 4,15	232,15 ± 5,08
2	20	40	3	8,24 ± 0,13	16,60 ± 0,61	150,00 ± 3,20	108,47 ± 1,88
3	80	40	3	14,16 ± 0,44	38,20 ± 0,63	296,91 ± 1,58	235,59 ± 3,96
4	50	40	5	9,08 ± 0,04	17,80 ± 0,05	151,33 ± 3,16	111,87 ± 1,15
5	50	50	3	11,79 ± 0,08	25,70 ± 0,22	223,51 ± 3,56	150,76 ± 1,57
6	50	50	3	9,05 ± 0,02	20,40 ± 0,49	179,50 ± 0,86	138,80 ± 3,97
7	50	50	3	17,11 ± 0,06	44,50 ± 1,32	157,89 ± 1,29	136,25 ± 2,68
8	20	50	1	11,92 ± 0,27	27,20 ± 0,01	252,01 ± 4,69	213,85 ± 0,59
9	80	50	1	18,46 ± 0,29	46,20 ± 0,40	377,16 ± 5,34	273,42 ± 6,53
10	20	50	5	9,05 ± 0,26	18,30 ± 0,13	171,99 ± 4,04	196,68 ± 1,46
11	80	50	5	16,68 ± 0,04	34,80 ± 0,45	236,88 ± 0,00	138,24 ± 3,78
12	50	60	1	11,75 ± 0,18	33,70 ± 0,31	198,90 ± 1,19	157,35 ± 0,99
13	20	60	3	13,39 ± 0,19	31,60 ± 0,54	198,45 ± 2,31	136,06 ± 2,67
14	80	60	3	14,04 ± 0,48	28,90 ± 0,19	170,87 ± 4,69	120,51 ± 3,04
15	50	60	5	14,41 ± 0,32	37,70 ± 0,25	190,01 ± 4,90	156,35 ± 3,21

Resultados presentados como promedio ± desviación estándar. Antocianinas totales: mg equivalentes de Cianidina 3-glucósido/g RA liofilizado. Polifenoles totales: mg equivalentes de ácido gálico/g RA liofilizado. FRAP:  $\mu$ mol equivalentes de Trolox/g RA liofilizado. DPPH:  $\mu$ mol equivalentes de Trolox/g RA liofilizado.

## 6.5. Caracterización de las propiedades físicas y químicas de los extractos obtenidos con la Extracción Acelerada con Solventes.

### 6.5.1. Contenido de Polifenoles Totales

En la **Tabla 24**, se presenta el contenido de polifenoles totales obtenidos en las diferentes experiencias del diseño propuesto. La concentración de polifenoles totales fluctuó entre un mínimo de 16,6 y un máximo de 42,2 mg EAG/g residuo liofilizado.

El valor del coeficiente de determinación ( $R^2=69,1$ ) que refleja una menor calidad de ajuste; sin embargo, el modelo se ha seleccionado para predecir la concentración de polifenoles totales de los extractos permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (**Figura 16**).

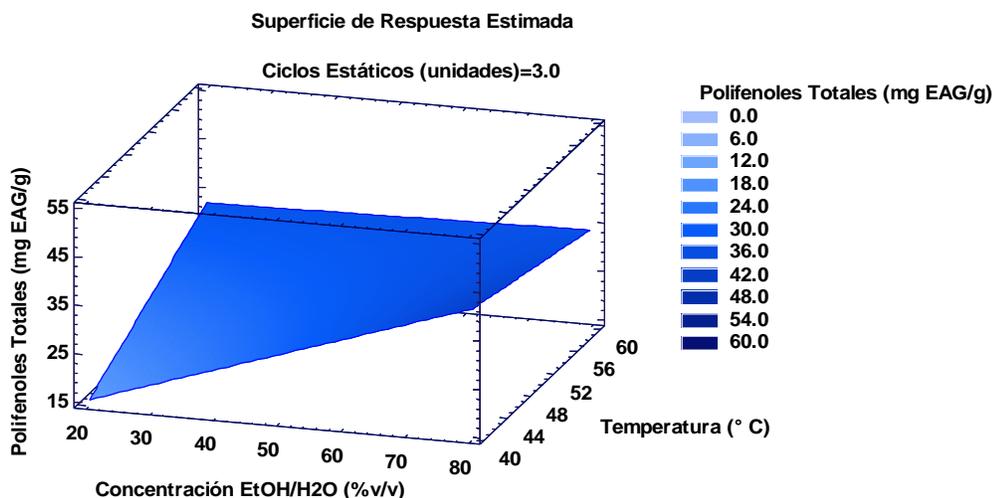


Figura 16. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Polifenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con ASE y variables independientes de Temperatura, ciclos de extracción y concentración de etanol.

En la **Figura 16**, la región azul intenso del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación temperaturas igual a 40 °C, ciclos estáticos de extracción (1) y concentraciones altas de disolvente (Etanol-agua acidulada 79 % v/v) se puede obtener la mayor concentración de polifenoles totales (50,93 mg EAG/g RA), siendo estas las condiciones de proceso favorables para la maximización del contenido de polifenoles totales en los extractos del método ASE a partir de residuos de arándanos como se observa en la **Tabla 25**. Como dato adicional, en promedio las extracciones del diseño experimental con 1 ciclo de extracción se extraen aproximadamente en 25 minutos, aquellas en las que se extrajeron con 3 ciclos se demoraron un aproximado de 45 minutos y finalmente aquellas en las que se utilizaron 5 ciclos estáticos de extracción, el proceso duró un aproximado de 1 hora 15 minutos.

**Tabla 25.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de polifenoles totales

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración Et-OH/H <sub>2</sub> O	20,0	80,0	79,15
Temperatura (°C)	40,0	60,0	40,0
Ciclos de Extracción (unidades)	1,0	5,0	1,0

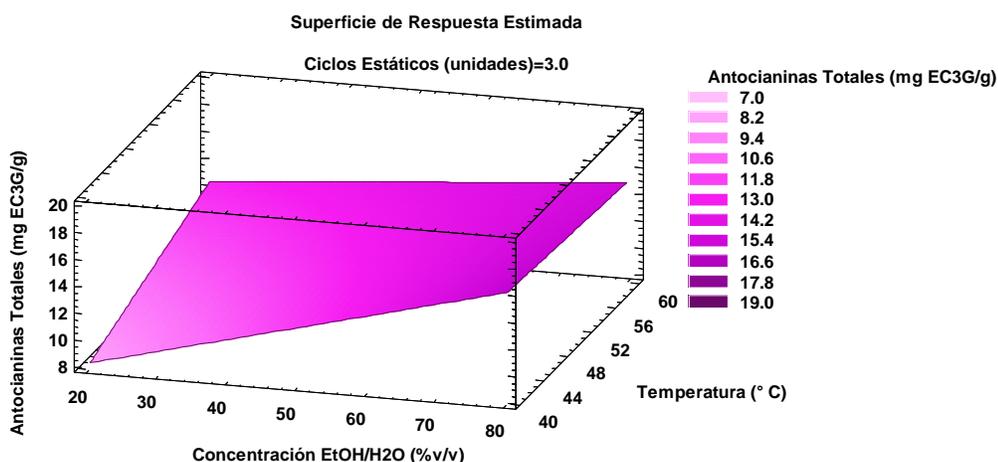
Valor óptimo = 50,93 mg EAG/g RA

Por otra parte, al realizar el análisis de varianza (**Anexo 5.1**) para la cantidad de polifenoles totales y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que únicamente la influencia de la concentración de etanol tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ). Esto se puede corroborar en el diagrama de Pareto (**Anexo 5.1**). Donde se puede apreciar que la concentración de etanol fue significativa en el modelo. Sin embargo, se puede asumir también que el efecto lineal de la concentración del disolvente tiene una influencia positiva, es decir que, mientras más se aumente la concentración de etanol (79%) mayor será el contenido de polifenoles totales recuperados presentes en el extracto.

### 6.5.2. Contenido de Antocianinas Totales

La **Tabla 24** muestra el contenido de antocianinas totales resultantes de los diferentes tratamientos aplicados en el diseño experimental. La concentración de antocianinas totales fluctuó entre un mínimo de 8,24 y un máximo de 18,46 mg EC3G/ g de residuo de arándano liofilizado.

El valor del coeficiente de determinación ( $R^2 = 65,4 \%$ ) del modelo seleccionado para predecir la concentración de antocianinas totales de los extractos permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (**Figura 17**), a pesar de que se presenta un modelo de menor calidad de ajuste.



*Figura 17* Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Antocianinas Totales (mg equivalentes de cianidin-3 glucósido/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con ASE y variables independientes de Temperatura, ciclos estáticos de extracción y concentración de etanol

En la **Figura 17**, la región de color rosa intenso del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación temperaturas de 40 °C, ciclos estáticos de extracción igual a 1 y concentraciones altas de disolvente (77 % v/v) se puede obtener la mayor concentración de antocianinas totales (18,67 mg EC3G/g residuo liofilizado), considerándose a éstas como condiciones óptimas para la maximización del contenido de antocianinas totales en los extractos del método ASE a partir de residuos de arándanos como se observa en la **Tabla 26**.

**Tabla 26. Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de antocianinas totales**

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Concentración Et-OH/H <sub>2</sub> O	20,0	80,0	77,1
Temperatura (°C)	40,0	60,0	40,0
Ciclos de Extracción (unidades)	1,0	5,0	1,0

Valor óptimo = 18,67 mg EC3G/g RA

Según el análisis de varianza (**Anexo 5.2**) para la cantidad de antocianinas totales y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que el efecto lineal de la concentración de etanol tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ). Esto se puede corroborar en el diagrama de Pareto (**Anexo 5.2**), donde se puede apreciar que la concentración de etanol (mayor incidencia) tiene una influencia positiva en el modelo, es decir que, un aumento en la concentración de etanol (77,1%) aumentando el contenido de antocianinas totales en el extracto.

### **6.5.3. Actividad Antioxidante: FRAP**

La **Tabla 24** muestra la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por el método ASE aplicando las diferentes experiencias en términos de FRAP. Los valores que se observaron fluctúan entre un mínimo de 150 y un máximo de 377,16  $\mu\text{mol ET/g}$  de residuo de arándano liofilizado. El valor superior del coeficiente de determinación ( $R^2=94,5\%$ ) del modelo seleccionado para predecir la capacidad antioxidante (FRAP) de los extractos permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta, **Figura 18**.

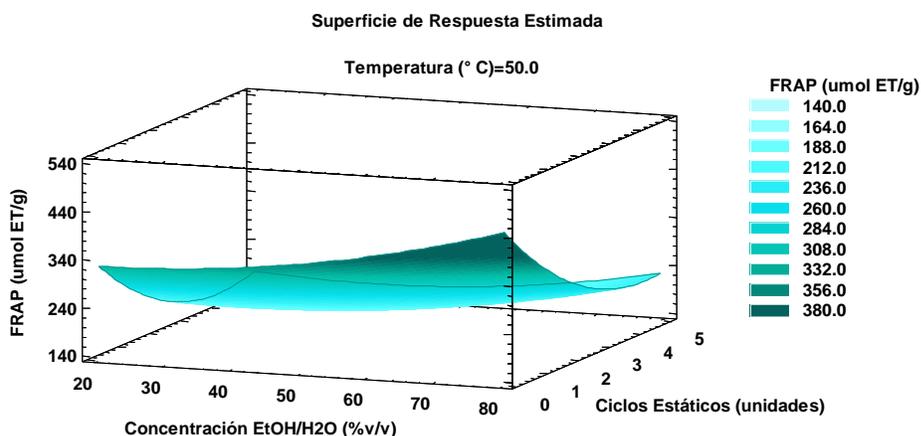


Figura 18. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para FRAP ( $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/ g de residuo de arándano) *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con ASE y variables independientes de Temperatura, ciclos de extracción y concentración de etanol

En la **Figura 18**, la región de color celeste intenso del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación temperaturas intermedias ( $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), un solo ciclo de extracción y concentraciones elevadas de disolvente (80:20 % v/v) se pueden obtener valores elevados de capacidad antioxidante del extracto obtenido ( $437,98\ \mu\text{mol ET/g}$  residuo liofilizado). Éstas se toman como las condiciones óptimas para maximizar FRAP en los extractos del método ASE a partir de residuos de arándanos como se observa en la **Tabla 27**.

**Tabla 27.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando actividad antioxidante FRAP

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración Et-OH/H <sub>2</sub> O	20,0	80,0	80,0
Temperatura (°C)	40,0	60,0	40,0
Ciclos de Extracción (unidades)	1,0	5,0	1,29

Valor óptimo =  $437,98\ \mu\text{mol ET/g RA}$ .

Por otra parte, al realizar el análisis de varianza (**Anexo 5.3**) para FRAP y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que el efecto lineal de la concentración de etanol, ciclos de extracción y la temperatura, además la interacción entre la concentración de etanol-temperatura, temperatura-ciclos de extracción y el efecto cuadrático de la variable ciclos de extracción tuvieron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ). Esto se puede corroborar en el diagrama de Pareto (**Anexo 5.3**), donde se puede apreciar que el efecto de la concentración

de disolvente como la interacción temperatura-ciclos de extracción tienen una influencia positiva mientras que la variable referente a los ciclos de extracción (mayor incidencia) y la interacción entre concentración de etanol y temperatura tienen una influencia negativa, es decir que mientras más elevada sea la concentración de etanol mayor será la obtención en cuanto a la capacidad antioxidante. Lo mismo sucede con la interacción entre temperatura y ciclos de extracción que muestra una mayor extracción cuando se utilizan temperaturas bajas y menores ciclos de extracción. Además, en el caso de las variables que presentan una influencia negativa, se indica que mientras mayor sea la cantidad de ciclos de extracción menores valores de FRAP se obtuvieron, lo mismo sucedió en cuanto a la interacción entre concentración de etanol y temperatura ya que aplicándose una combinación inversamente proporcional entre ellas se obtienen valores de FRAP inferiores con relación a los demás experimentos.

#### **6.5.4. Actividad Antioxidante: DPPH**

La **Tabla 24** muestra la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por el método ASE a través del análisis DPPH. Los valores que se observaron fluctúan entre un mínimo de 108,47 y un máximo de 273,42  $\mu\text{mol ET/g}$  de residuo de arándano liofilizado. El valor del coeficiente de determinación ( $R^2=93,9$ ) del modelo seleccionado para predecir la capacidad antioxidante (DPPH) de los extractos permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (**Figura 19**).

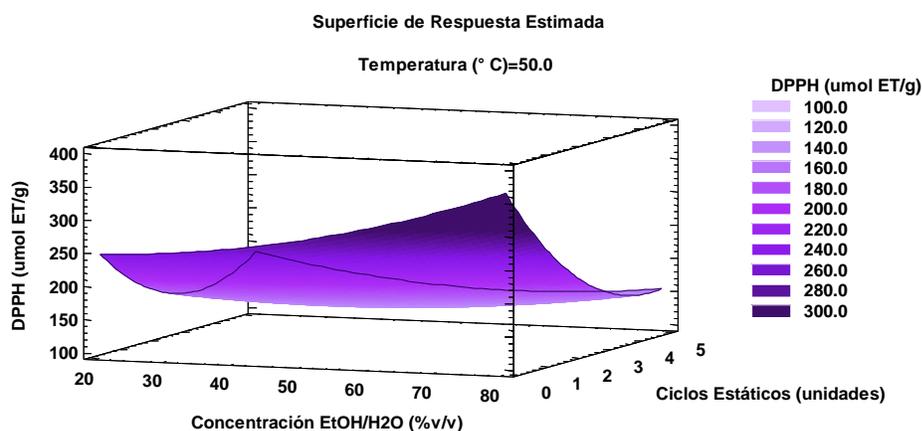


Figura 19. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para DPPH ( $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/ g de residuo) de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con ASE y variables independientes de Temperatura, ciclos de extracción y concentración de etanol

En la **Figura 19**, la región violeta intensa del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación temperaturas moderadas ( $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), ciclos de extracción (1) y concentraciones elevadas de disolvente ( $74,7\text{ }\% \text{ v/v}$ ) se pudo obtener la mayor actividad antioxidante en términos de DPPH ( $273,42\text{ }\mu\text{mol ET/ g}$  de residuo) describiendo de esta manera el mejor modelo de selección para predecir dicha actividad, considerando estas condiciones como óptimas para la maximización de la actividad antioxidante (DPPH) en los extractos del método ASE a partir de residuos de arándanos cv Legacy como se observa en la **Tabla 28**.

**Tabla 28.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando la actividad antioxidante DPPH

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración Et-OH/H <sub>2</sub> O	20,0	80,0	74,72
Temperatura (° C)	40,0	60,0	40,0
Ciclos de extracción (unidades)	1,0	5,0	1,0

Valor óptimo =  $325,245\text{ }\mu\text{mol ET/ g RA}$

Según el análisis de varianza (**Anexo 5.4**) para la actividad antioxidante (DPPH) y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que el efecto lineal de la variable ciclos de extracción, la interacción entre la concentración de etanol-temperatura, temperatura-ciclos de extracción y la interacción de la concentración de etanol-ciclos de extracción y el efecto

cuadrático de la variable correspondiente a los ciclos de extracción tuvieron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ), corroborado por el diagrama de Pareto, el cual se muestra en el **(Anexo 5.4)**, donde se puede apreciar que tanto el efecto cuadrático de los ciclos de extracción como la interacción entre temperatura-ciclos de extracción resultan tener un efecto positivo sobre los tratamientos ya que, a mayor temperatura de extracción y menores ciclos de extracción se obtuvieron valores elevados de la capacidad antioxidante de los extractos en términos de DPPH. Por otro lado, la variable que corresponde a los ciclos de extracción (mayor incidencia), la interacción entre la concentración de etanol-temperatura y la interacción concentración de etanol-ciclos de extracción tiene influencia en el diseño de manera negativa en el proceso, es decir que, a mayor concentración de etanol, mayor temperatura y cantidad de ciclos de extracción se obtuvieron menores valores de capacidad antioxidante en términos de DPPH.

#### **6.5.5. Optimización de temperatura, concentración de disolvente y ciclos estáticos para la metodología de ASE sobre el contenido de antocianinas totales, polifenoles totales, FRAP y DPPH**

Para determinar la temperatura, concentración de disolvente (etanol) y ciclos estáticos óptimos para la extracción con ASE se procedió a transformar las variables respuesta (contenido total de antocianinas, polifenoles totales, FRAP y DPPH) en una variable llamada “Desirability” o “Deseable”, por lo cual se requiere determinar cuál es la combinación la temperatura, concentración de disolvente (etanol) y ciclos estáticos en el proceso de extracción para determinar el valor máximo de las cuatro variables respuesta en los residuos de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy.

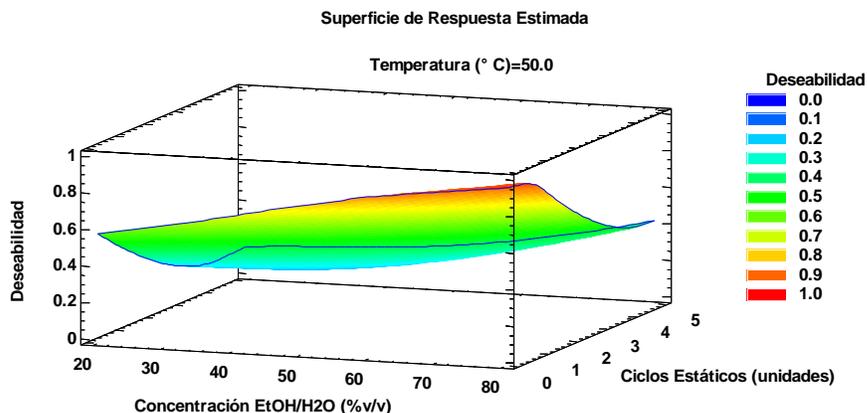


Figura 20. Superficie respuesta del valor deseable de concentración de antocianinas y polifenoles totales en los extractos obtenidos por el método ASE a partir de residuos de arándano.

Como se puede apreciar en la **Figura 20** de superficie respuesta del valor deseable, donde el valor máximo de antocianinas, polifenoles totales, DPPH y FRAP se encuentran en la zona más oscura del gráfico (naranja), en la cual se obtuvieron valores máximos de las variables respuesta para una combinación de temperaturas iguales a 41,3 ° C, ciclos de extracción estática (1) y concentración de etanol (79,8 % v/v) en el proceso de extracción ASE como se muestra en la **Tabla 29**. Parámetros similares son reportados por Garcia-Mendoza *et al.*, 2017; donde la temperatura ideal se encuentra a los 40 ° C para el solvente utilizado, etanol-agua acidulada (50% v/v). En el mismo estudio se mostraron los resultados del contenido de polifenoles totales de arándano obteniendo 23,55 mg EAG / g de fruto seco, comparando estos valores con los obtenidos a partir de los residuos de arándano en el presente estudio (47,80 mg EAG/g de RA liofilizado). Es interesante notar que el residuo constituido por pulpa, piel y semillas del arándano (pomasa) tiene una extracción del doble de los polifenoles encontrados en el fruto fresco. Por otro lado, el estudio realizado por Paes *et al.*, 2013 reportó una mayor concentración de polifenoles totales (99,5 mg EAG/g) a 40 ° C usando agua acidificada y mezclas hidroetanólicas (50% v/v) como solventes en ASE a partir de residuos de arándanos liofilizados (*Vaccinium myrtillus* L.) representando un 50% más del obtenido en este estudio (47,8 mg EAG/g de residuo); además reporta resultados de antocianinas totales (2,34 mg/g) y DPPH (1809  $\mu$ mol ET/g), notándose a partir de estos datos que, en comparación con el presente estudio los valores para antocianinas totales (15,77 mg EC3G/g de residuo) son superiores en un

87%, mientras que el análisis de capacidad antioxidante con DPPH (230,35  $\mu\text{mol ET/g}$  de residuo), aproximadamente los valores reportados por Paes *et al.*, 2013 son superiores en un 84% con respecto al presente estudio. Estos trabajos demuestran que, los cambios radicaría tanto por el tipo, especies y cultivo de arándanos, ya que el género *Vaccinium* posee características cariotípicas y filogenéticas determinadas para cada cultivar; además, de que existe una diferencia en el solvente utilizado para cada estudio siendo mayor la concentración de la mezcla hidroalcohólica utilizada como solvente en la extracción arrojando mejores resultados para el caso de la extracción de antocianinas totales.

**Tabla 29.** Optimización de las cuatro Variables Respuesta maximizando la concentración de antocianinas totales, polifenoles totales, actividad antioxidante DPPH y FRAP

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Concentración Et-OH/H <sub>2</sub> O	20,0	80,0	79,8
Temperatura (°C)	40,0	60,0	41,3
Ciclos de Extracción (unidades)	1,0	5,0	1,13

Valor deseabilidad= 1,0

Al igual que en la extracción convencional, la metodología ASE se realizó con disolventes orgánicos en mezclas con agua dando buenos resultados. Según la literatura, las condiciones del parámetro temperatura se vuelven severas y contraproducentes por encima de los 70 °C y valores inferiores del contenido de polifenoles totales a temperaturas de 40 °C. Similares resultados se obtuvieron en el presente estudio diferenciándose de la literatura únicamente en la concentración de etanol ya que en el estudio de Mendoza *et al.*, 2017 los valores inferiores se obtuvieron cuando se utilizaron concentraciones al 100% de etanol puro mientras que en el presente estudio esos valores inferiores se obtuvieron con concentraciones de etanol bajas (20/80% v/v) (Dai *et al.*, 2009; Garcia-Mendoza *et al.*, 2017). También se menciona que hubo un aumento del 51% en el contenido total de polifenoles cuando se aplican temperaturas de 40 °C a 60 °C mientras que el aumento de temperatura de 60 °C a 80 °C elevó el contenido de polifenoles totales en un 53%, lo cual se corrobora con este estudio ya que, en la optimización del método la temperatura adecuada resulta ser un aproximado de 40 °C. Asimismo, el disolvente acidulado con pH bajo cercano a 2; favoreció a la extracción debido a que se produce una rotura de las

membranas de la célula de la matriz vegetal en especial cuando la temperatura aumenta y se liberan fenoles de bajo peso molecular (Garcia-Mendoza *et al.*, 2017), además de favorecer a una mayor estabilidad de las antocianinas (Heffels *et al.*, 2015). Del mismo modo en un estudio realizado por Heffels *et al.*, 2015 al aplicar concentraciones de metanol como solvente al 80% v/v obtuvo valores de antocianinas totales presentes en arándano Lowbush que varían entre 1,51 a 2,20 mg/g de fruto seco, los mismos que son superiores a los conseguidos con una concentración de solvente del 20%v/v. Se puede notar la diferencia en la extracción de antocianinas entre Heffels y el presente estudio a pesar de que se utilizan muestras liofilizadas de arándano, las variaciones se pueden atribuir al tipo y cultivo analizado ya que según los resultados (15,77 mg EC3G/ g de RA liofilizado) obtenidos con etanol al 80% v/v son a partir de residuos de arándano Highbush y no Lowbush como en el trabajo mencionado.

Otros trabajos han utilizado esta metodología de extracción en residuos de arándanos, así se puede mencionar el realizado por Machado *et al.*, 2017 sobre residuos de arándano *Vaccinium myrtillus* bajo condiciones de 80 °C de temperatura durante un tiempo de 30 min y utilizando como solvente (EtOH/H<sub>2</sub>O): 70 %v/v obtuvieron valores de 1,69 ± 0,01 mg EC3G/g residuo seco para antocianinas totales, 6,92 ± 0,21 mg EAG/g residuo seco para polifenoles totales y para capacidad antioxidante los valore de DPPH fueron 38,22 ± 3,53 µmol ET/g residuo seco y FRAP 73,65 ± 3,2 µmol ET/g residuo seco. Según lo expuesto, los autores coinciden en que las mejores condiciones para extraer fenólicos de los residuos de arándano apuntan a una temperatura oscilante entre 40 y 80 °C de temperatura con concentraciones de etanol-acuoso que oscilan entre los 50-100% v/v de 30 a 45 minutos observándose discrepancia en las condiciones de procesos reflejando igualmente extracciones de fenólicos diferentes. Sin embargo, este estudio presenta similitudes con un trabajo recientemente realizado por Kitrytė *et al.*, 2020 sobre residuos de *Vaccinium vitis-idaea* L que utilizaron como parámetros para la extracción fenólica una mezcla de solvente EtOH:H<sub>2</sub>O bajo 70 °C de temperatura y 3 ciclos estáticos de extracción obteniendo antocianinas totales iguales a 2,31 mg EC3G/g pomasa seca y 42,98 mg EAG/g pomasa seca de polifenoles totales. Comparando los parámetros utilizados para

la extracción y los resultados descritos en la **Tabla 29** y **30** del presente estudio con la literatura se coincide en la utilización del tipo de solvente y analizando resulta favorable la utilización de una mezcla de ETOH: H<sub>2</sub>O al 79,8 % v/v a 41 °C y únicamente sometida a 1 ciclo estático de extracción obteniendo de esta manera altos rendimientos de fenólicos comparables o incluso superiores a los reportados en los estudios antes mencionados (antocianinas totales= 15, 77 ± 0,16 mg EC3G/g pomasa, polifenoles totales= 47,8 ± 0,51 mg EAG/g pomasa, FRAP= 378,68 ± 15,32 µmol ET/g pomasa y DPPH= 230,35 ± 0,98 µmol ET/g pomasa). Este análisis sirve para reforzar nuevamente la hipótesis de que los perfiles de compuestos son diferentes no únicamente si se aplican diferentes métodos de extracción sino también depende del tipo de matriz vegetal utilizada para el estudio.

**Tabla 30.** Valores de las variables respuesta (polifenoles totales, antocianinas totales, FRAP, DPPH) en el Extracto ASE Óptimo del modelo predicho y experimental de residuos de arándano liofilizado.

<i>Respuesta</i>	<i>Óptimo predicho</i>	<i>Óptimo experimental</i>
<b>Antocianinas Totales</b>	18,49	15, 76 ± 0,16
<b>Polifenoles Totales</b>	49,31	47,8 ± 0,51
<b>FRAP</b>	438,29	378,68 ± 15,32
<b>DPPH</b>	328,59	230,35 ± 0,98

Resultados presentados como promedio ± desviación estándar. Antocianinas totales: mg equivalentes de cianidina 3-glucósido/g de residuos de arándanos liofilizados. Polifenoles totales: mg equivalentes de ácido gálico/g de residuo de arándanos liofilizados. FRAP: µmol equivalentes de Trolox/g de residuo de arándano liofilizado. DPPH: µmol equivalente de Trolox/g de residuo de arándano liofilizado

La extracción acelerada por solvente (ASE) también conocida como extracción líquida presurizada (PLE) permite la extracción rápida de compuestos con un bajo consumo de disolventes. En el proceso se utilizan valores altos de presión que mantiene los solventes líquidos a temperaturas más altas generalmente por encima del punto de ebullición del disolvente, lo cual permite que la solubilidad de los compuestos, la penetración a la matriz vegetal y el mojado de la muestra por el solvente mejoren (Silva *et al.*, 2017).

Analizando los resultados obtenidos en la extracción con ASE, se puede notar que la concentración del disolvente (+), los ciclos de extracción (-), temperatura (-), la

interacción entre la concentración del disolvente-temperatura (-), la interacción temperatura-ciclos de extracción (+), concentración de etanol-ciclos de extracción (-) y el efecto cuadrático de los ciclos de extracción (+) son los parámetros que influye en el método para la extracción del contenido de polifenoles totales, antocianinas totales, DPPH y FRAP. Explicando de esta manera que, en el modelo mientras mayor fue la concentración de etanol mayores extracciones se obtuvieron. Por otra parte, mientras mayores fueron los ciclos extracción combinados con concentraciones de etanol bajas menores resultados se obtuvieron y siguiendo esta línea mientras mayores fueron los ciclos en la obtención del extracto combinados con temperaturas mayores a la óptima de igual manera se obtuvieron extracciones bajas en comparación a los resultados máximos. Finalmente, es interesante analizar uno de los parámetros que en general no están descrito en la literatura para este método; el número de ciclos estáticos en el extracto, resultó que tiene efecto significativo en el modelo y si bien teóricamente, el uso de varias extracciones secuenciales debería permitir un proceso más completo no necesariamente significan mayores rendimientos de extracción (Silva *et al.*, 2017). En este estudio se demuestra que por el contrario las mejores extracciones se obtienen aplicando un solo ciclo de extracción debido a que el método ASE presenta como principal desventaja el hecho de que en la extracción la degradación de las antocianinas comienza casi cuando comienza la extracción. Es por ello que, entre menos ciclos se apliquen mejores resultados se obtuvieron en cuanto a antocianinas totales, polifenoles totales, FRAP y DPPH.

Al ser un método automatizado esta técnica es de interés y atractiva para aplicaciones en el rubro industrial ya que ha sido aplicada en diversas matrices vegetales como arándanos, cebolla morada y batata (Silva *et al.*, 2017). A pesar de que el tiempo en este modelo no fue considerado como factor manipulable en la extracción de compuestos por el tipo de equipo usado (ASE 300 Accelerated Solvent Extractor Dionex), hay que mencionar que el tiempo total de los métodos fue de aproximadamente 25 minutos para aquellos sometidos a un solo ciclo de extracción y para aquellos sometidos a 3 o a 5 ciclos de extracción el tiempo fue de 45 minutos y una hora 15 minutos respectivamente; y que según los resultados recuperados se puede decir que entre más tiempo de extracción

menores los valores obtenidos como resultados por lo que se puede presumir de una degradación durante la extracción, especialmente de compuestos fenólicos. Por lo tanto, se coincide con Heffels *et al.*, 2015 que en su trabajo igualmente utiliza 25 minutos como tiempo de extracción con ASE ya que en ese tiempo es posible alcanzar un equilibrio entre las fases sólida y líquida y obtener más extracción de antocianinas aplicando además temperatura de 40 ° C porque la extracción se favorece por la elevación de temperatura al aumentar la solubilidad de los compuestos antociánicos y mejorar el coeficiente de difusión (Zapata, Heredia, *et al.*, 2014).

#### **6.6.Experimentos de extracción asistida por ultrasonido (EAU) de antocianinas a partir de residuos de arándanos.**

En el presente estudio, según el método de extracción asistida por ultrasonido, se pretende maximizar la extracción de antocianinas a partir de residuos de arándano mediante la combinación de múltiples factores que afectan este proceso, en específico, tiempo, porcentaje de amplitud y la concentración del disolvente. Los resultados del diseño experimental Box-Behnken se observan en la **Tabla 31**, se aprecia en general una tendencia al aumento en la extracción de antocianinas totales, polifenoles totales y de la actividad antioxidante al aplicar valores intermedios o altos de etanol, un porcentaje de amplitud intermedia y un tiempo moderado de extracción. Cabe destacar que, todos los tratamientos fueron sometidos a una temperatura de 35-40 ° C, y en general el incremento de etanol (50:50 – 80:20 % v/v), amplitud aproximada de 55 – 90% y tiempo (aprox. 10-35 min) causan un aumento de las cuatro variables respuestas estudiadas con el valor más alto en relación con los otros experimentos. Una situación distinta se observa al combinar un nivel inferior de etanol (20:80 %v/v) con un nivel inferior de amplitudes (20 %) y tiempos moderados (35-60 minutos), donde las mismas variables respuesta analizadas disminuyeron en comparación a los valores anteriores. Desglosando los resultados, en cuanto al contenido total de antocianinas para una amplitud del 55%, un tiempo de 10 minutos y una concentración de 80:20 % v/v (etanol: agua acidulada 0,5%) se obtuvieron valores más altos, mientras que, con una concentración de disolvente del 20:80 % de etanol: agua acidulada, un tiempo de 35 minutos y una amplitud del 20% se disminuyeron

los valores en el contenido de antocianinas totales en relación con los valores elevados. Con respecto al contenido de polifenoles totales, se muestra que, con un tiempo de 10 minutos, a una concentración constante de 80:20% v/v (etanol) y una amplitud del 55% se obtuvieron los valores más elevados con respecto a los demás experimentos, al contrario, con amplitud del 20%, tiempo de 35 minutos y una concentración del 20:80% v/v etanol-agua acidulada 0,5%, los valores que se obtuvieron en estos experimentos fueron los más bajos. Para la actividad antioxidante, en cuanto a la metodología de FRAP se observaron valores superiores en los experimentos con una combinación de amplitudes iguales al 90%, una constante de concentración de etanol del 50:50 %v/v y un tiempo de 60 min, al igual que en el caso del contenido de antocianinas y polifenoles totales los valores inferiores entre los experimentos resultaron de una combinación entre amplitudes del 20%, una concentración de etanol al 20:80% v/v y un tiempo de 35 minutos. Finalmente, para DPPH, los valores más altos también se observaron a un nivel intermedio del disolvente (50% etanol), una constante de 35 min y una amplitud de 55%, en contraste, los valores más bajos en el grupo de experimentos se obtuvieron con la combinación de una constante en la concentración de disolvente (20:80% v/v etanol-agua acidulada), tiempo de 60 minutos y una amplitud de 55%.

Por lo tanto, estos resultados muestran la importancia que presenta la concentración de disolvente y temperatura como parámetros muy influyentes en la extracción de este grupo de compuestos.

**Tabla 31. Caracterización Química de los extractos obtenidos por Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU)**

<b>Exp.</b>	<b>Etanol (% v/v)</b>	<b>Amplitud (%)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Antocianinas Totales</b>	<b>Polifenoles Totales</b>	<b>FRAP</b>	<b>DPPH</b>
<b>1</b>	50	55	35	9,79 ± 0,08	20,24 ± 0,22	26,94 ± 0,11	50,20 ± 0,65
<b>2</b>	80	55	60	10,93 ± 0,01	17,05 ± 0,41	25,69 ± 1,22	14,70 ± 1,29
<b>3</b>	50	20	10	12,06 ± 0,17	22,41 ± 0,21	29,00 ± 4,03	36,62 ± 2,00
<b>4</b>	50	55	35	10,78 ± 0,25	21,80 ± 0,02	28,07 ± 2,68	53,27 ± 2,68
<b>5</b>	50	20	60	11,75 ± 0,30	32,40 ± 0,26	30,27 ± 0,93	41,96 ± 3,22
<b>6</b>	80	20	35	12,80 ± 0,15	16,91 ± 0,02	23,61 ± 1,13	8,63 ± 0,52
<b>7</b>	50	90	60	10,05 ± 0,62	21,91 ± 0,17	30,64 ± 1,00	41,43 ± 2,46

8	80	55	10	13,11 ± 0,39	20,13 ± 0,02	26,18 ± 1,46	15,26 ± 0,69
9	20	55	10	7,13 ± 0,23	9,50 ± 0,09	16,16 ± 0,09	9,66 ± 3,53
10	20	20	35	6,83 ± 0,18	9,59 ± 0,24	14,76 ± 0,02	7,06 ± 2,27
11	50	55	35	11,86 ± 0,58	20,74 ± 0,19	27,81 ± 1,17	51,06 ± 2,82
12	80	90	35	12,21 ± 0,16	18,79 ± 0,92	24,44 ± 0,11	35,02 ± 2,94
13	50	90	10	11,76 ± 0,93	21,50 ± 0,36	28,34 ± 0,78	50,26 ± 0,93
14	20	90	35	9,92 ± 0,18	12,17 ± 0,46	25,80 ± 0,24	22,19 ± 2,27
15	20	55	60	6,86 ± 0,04	12,49 ± 0,28	16,10 ± 0,06	3,16 ± 0,16

Resultados presentados como promedio ± desviación estándar. Antocianinas totales: mg equivalentes de Cianidina 3-glucósido/g RA liofilizado. Polifenoles totales: mg equivalentes de ácido gálico/g RA liofilizado. FRAP:  $\mu$ mol equivalentes de Trolox/g RA liofilizado. DPPH:  $\mu$ mol equivalentes de Trolox/g RA liofilizado.

## 6.7. Caracterización de las propiedades físicas y químicas de los extractos obtenidos con extracción asistida por ultrasonido.

### 6.7.1. Contenido de Polifenoles Totales

En la **Tabla 31** se presenta el contenido de polifenoles totales obtenidos en las diferentes experiencias del diseño propuesto. La concentración de polifenoles totales fluctuó entre un mínimo de 9,50 y un máximo de 32,40 mg EAG/g residuo liofilizado.

El valor del coeficiente de determinación ( $R^2=83,5$ ) refleja una menor calidad de ajuste del modelo seleccionado; sin embargo, se puede predecir la concentración de polifenoles totales de los extractos, lo cual permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (**Figura 21**).

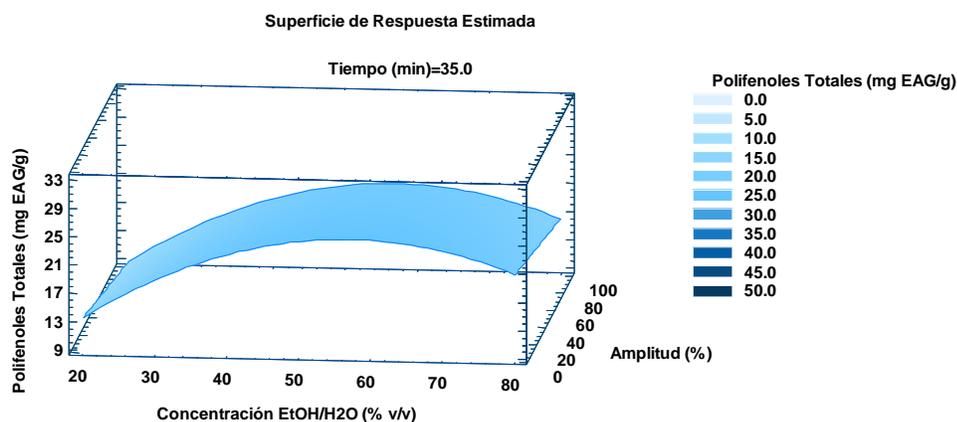


Figura 21. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Polifenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con EAU y variables independientes de amplitud, tiempo y concentración de etanol

En la **Figura 21**, la región azul intenso del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación amplitudes de 20%, un tiempo mínimo de 60 minutos y concentraciones intermedias de disolvente etanol/agua (57 % v/v) se puede obtener la mayor concentración de polifenoles totales (28,51 mg EAG/g RA). Considerando estas condiciones como óptimas para la maximización del contenido de polifenoles totales en los extractos obtenidos por el método asistido por ultrasonido a partir de residuos de arándanos como se observa en la **Tabla 32**.

**Tabla 32.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de polifenoles totales

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Concentración Et-OH/H <sub>2</sub> O	20,0	80,0	57,0
Amplitud (%)	20,0	90,0	20,0
Tiempo (min)	10,0	60,0	60,0

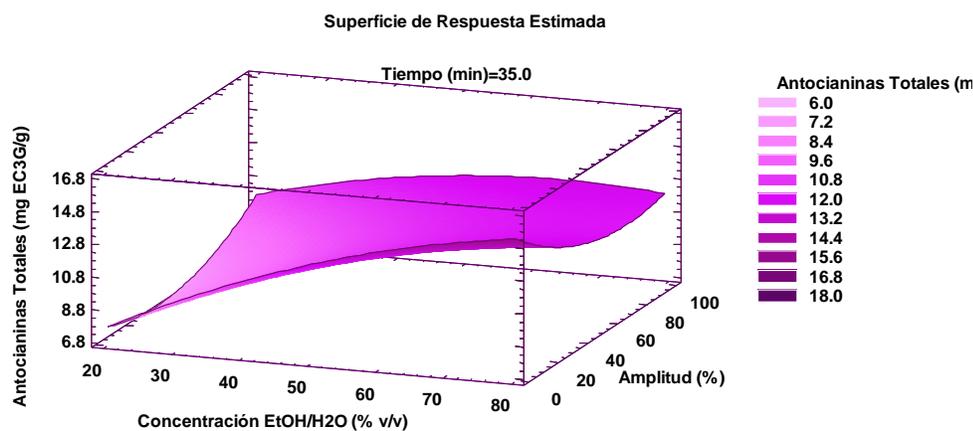
Valor óptimo = 28,51 mg EAG/g RA

Por otra parte, al realizar el análisis de varianza (**Anexo 6.1**) para la cantidad de polifenoles totales y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que el efecto lineal y cuadrático de la concentración de etanol y la interacción entre la concentración de amplitud-tiempo tuvieron efectos significativos ( $p < 0.05$ ). Esto se puede corroborar en el diagrama de Pareto, el cual se muestra en la (**Anexo 6.1**), donde se puede apreciar que tanto el efecto de la concentración de etanol influye de manera positiva en el proceso mientras que su efecto cuadrático y la interacción entre la amplitud-tiempo influyen de manera negativa en el proceso, de esta manera mientras más elevada sea la concentración del etanol como disolvente se obtuvieron cantidades superiores de polifenoles totales en el extracto. Por otro lado, la interacción el porcentaje de amplitud y tiempo y el efecto cuadrático de la concentración de etanol al tener influencia negativa durante el proceso, se pudo asumir que mientras menos prolongados fueron los tiempos de extracción y menores concentraciones de disolvente (etanol) aplicados, se obtuvieron menores cantidades de polifenoles totales en los extractos.

### 6.7.2. Contenido de Antocianinas Totales

La **Tabla 31** muestra el contenido de antocianinas totales resultantes de los diferentes tratamientos aplicados en el diseño experimental. La concentración de antocianinas totales fluctuó entre un mínimo de 6,83 y un máximo de 13,11 mg EC3G/ g de residuo de arándano liofilizado.

El valor del coeficiente de determinación ( $R^2=90,7$ ) del modelo seleccionado para predecir la concentración de polifenoles totales de los extractos permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (**Figura 22**).



*Figura 22.* Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Antocianinas Totales (mg equivalentes de cianidin-3 glucósido/ g de residuo de arándano) *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con EAU y variables independientes de amplitud de proceso, tiempo y concentración de etanol

En la **Figura 22**, la región de color púrpura intenso del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que, con la combinación de tiempos mínimos de 10 minutos, un aumento en la concentración de etanol (80:20% v/v) y amplitudes del 20% se puede obtener la mayor concentración de antocianinas totales (14,54 mg EC3G/g residuo liofilizado). Las condiciones óptimas para la maximización del contenido de antocianinas totales en los extractos del método EAU a partir de residuos de arándanos se obtuvieron con un tiempo de 10 minutos, una amplitud del 20,7% y una concentración de etanol de 80 % v/v como se observa en la **Tabla 33**.

**Tabla 33.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de antocianinas totales

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Concentración Et-OH/H <sub>2</sub> O	20,0	80,0	80,0
Amplitud (%)	20,0	90,0	20,0
Tiempo (min)	10,0	60,0	10,0

Valor óptimo = 14,54 mg EC3G/g RA

Según el análisis de varianza (**Anexo 6.2**) para el contenido de antocianinas totales y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que el efecto lineal de la concentración de etanol y su interacción tuvieron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en el modelo. Esto se puede corroborar en el diagrama de Pareto (**Anexo 6.2**), donde se puede apreciar que el efecto de la concentración de etanol tiene una influencia positiva en el modelo (mayor incidencia) mientras que su interacción cuadrática resulta negativa en el modelo, es decir que, un aumento en la concentración de etanol (80% v/v) aumenta el contenido de antocianinas totales en el extracto.

### **6.7.3. Actividad Antioxidante: FRAP**

La **Tabla 31** muestra la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por el método EAU aplicando las diferentes experiencias en términos de FRAP. Los valores que se observaron fluctúan entre un mínimo de 14,76 y un máximo de 30,64  $\mu\text{mol ET/g}$  de residuo de arándano liofilizado. El valor del coeficiente de determinación ( $R^2=89,1$ ) del modelo seleccionado para predecir la capacidad antioxidante (FRAP) de los extractos permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (**Figura 23**).

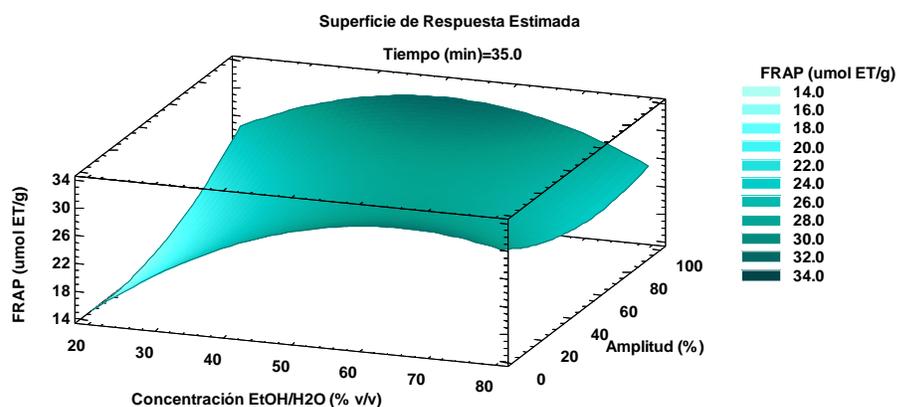


Figura 23. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para FRAP ( $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/ g de residuo de arándano) *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con EAU y variables independientes de amplitud del proceso, tiempo y concentración de etanol

En la **Figura 23** la región de color celeste intenso del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación de amplitudes del 90%, un aumento de tiempo (60 min) y concentraciones intermedias de disolvente (51,7 % v/v) se pueden obtener valores elevados de capacidad antioxidante del extracto obtenido (31,21  $\mu\text{mol}$  ET/g residuo liofilizado), que según la optimización del proceso serían las condiciones que favorecen maximizar la capacidad antioxidante en términos de FRAP en los extractos del método EAU a partir de residuos de arándanos cv. Legacy como se observa en la **Tabla 34**.

**Tabla 34.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando actividad antioxidante FRAP

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración Et-OH/H <sub>2</sub> O	20,0	80,0	51,78
Amplitud (%)	20,0	90,0	90,0
Tiempo (min)	10,0	60,0	59,9

Valor óptimo = 31,21  $\mu\text{mol}$  ET/g RA.

Por otra parte, al realizar el análisis de varianza (**Anexo 6.3**) para FRAP y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que el efecto lineal de la concentración de disolvente y su efecto cuadrático tuvieron efectos significativos ( $p < 0.05$ ), estos resultados se pueden observar en el diagrama de Pareto (**Anexo 6.3**), donde se puede apreciar que tanto la concentración de etanol como su interacción cuadrática (mayor incidencia) fueron

significativas. Siendo que el efecto lineal de la concentración del disolvente, tienen una influencia positiva en el proceso de extracción por lo cual, se observó que a medida de que aumentó la concentración del disolvente (51,78 % v/v) se obtuvieron como resultado valores superiores de FRAP en el extracto, no así en el caso del efecto de la interacción cuadrática de la concentración de etanol que resultó tener un efecto negativo en el proceso, de esta manera, se explicaría que la concentración de disolvente en el proceso sólo debería aumentar hasta valores intermedios para obtener resultados favorables ya que a niveles superiores se obtuvieron menores valores de FRAP en los extractos.

#### 6.7.4. Actividad Antioxidante: DPPH

En la Tabla 18, la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por el método EAU aplicando las diferentes experiencias mediante DPPH. Los valores que se observaron fluctúan entre un mínimo de 3,16 y un máximo de 51,51  $\mu\text{mol ET/g}$  de residuo de arándano liofilizado. El valor del coeficiente de determinación ( $R^2=97,5$ ) del modelo seleccionado para predecir la capacidad antioxidante (DPPH) de los extractos permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (**Figura 24**).

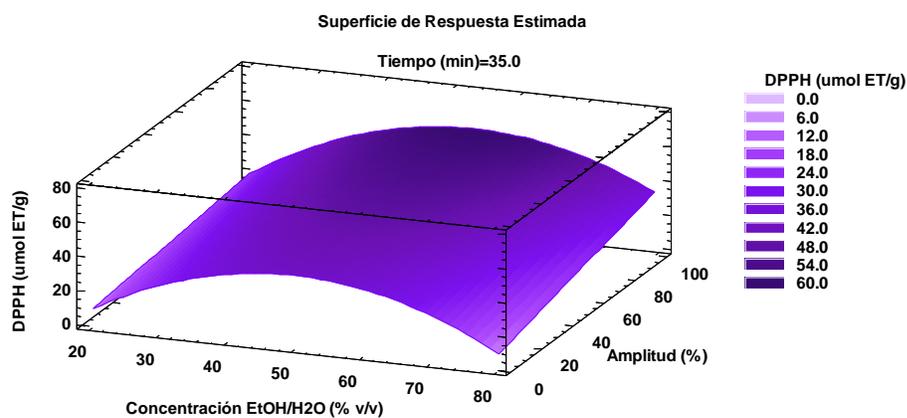


Figura 24. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para DPPH ( $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/ g de residuo de arándano) *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con EAU y variables independientes del porcentaje de amplitud, tiempo y concentración de etanol

En la **Figura 24**, la región violeta intensa del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación de una amplitud (90%), una disminución en el tiempo de extracción (27,55 min) y concentraciones intermedias de disolvente (53,1 % v/v) se puede obtener la mayor actividad antioxidante en términos de DPPH (58,97  $\mu\text{mol}$

ET/ g de residuo). Siendo éstas las condiciones óptimas resultantes para la maximización de la actividad antioxidante (DPPH) en los extractos del método EAU a partir de residuos de arándanos cv. Legacy como se observa en la **Tabla 35**.

**Tabla 35.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando la actividad antioxidante DPPH

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Concentración Et-OH/H <sub>2</sub> O	20,0	80,0	53,17
Amplitud (%)	20,0	90,0	90,0
Tiempo (min)	10,0	60,0	27,57

Valor óptimo = 59,87  $\mu\text{mol ET/ g RA}$

Según el análisis de varianza (**Anexo 6.4**) para la actividad antioxidante (DPPH) y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que el efecto lineal y cuadrático de la concentración de etanol, el efecto cuadrático del tiempo y el efecto lineal de la amplitud tuvieron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ), esto se puede observar en el diagrama de Pareto (**Anexo 6.4**), donde se puede apreciar que tanto la concentración de etanol como la variable amplitud tienen una influencia positiva en el diseño, es decir que a mayor concentración etanol se obtuvieron mayores valores de DPPH, de igual manera con la variable amplitud que a mayor porcentaje aplicado mayores fueron los valores obtenidos. Por otro lado, en cuanto al efecto cuadrático de concentración de etanol y tiempo poseen una influencia negativa en el proceso, por lo que se obtuvieron valores inferiores en aquellos tratamientos a los cuales se les aplicaron mayores concentraciones de etanol; asimismo, cuando se aplicaron mayor tiempo los experimentos en las que la duración del proceso fue superior a los 35 minutos aproximadamente también se obtuvieron valores inferiores en el análisis de capacidad antioxidante de los extractos obtenidos bajo estos parámetros.

#### **6.7.5. Optimización del porcentaje de amplitud, tiempo y concentración de disolvente para la metodología de extracción EAU sobre el contenido de antocianinas totales, polifenoles totales, FRAP y DPPH**

Para determinar el tiempo, porcentaje de amplitud y concentración de disolvente (etanol) óptimos para la extracción con EAU se procedió a transformar las variables respuesta

(contenido total de antocianinas, polifenoles totales, FRAP y DPPH) en una variable llamada “Desirability” o “Deseable”, por lo cual se requiere determinar cuál es la combinación del tiempo, porcentaje de amplitud y concentración de disolvente (etanol) en el proceso de extracción para determinar el valor máximo de las cuatro variables respuesta en los residuos de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy.

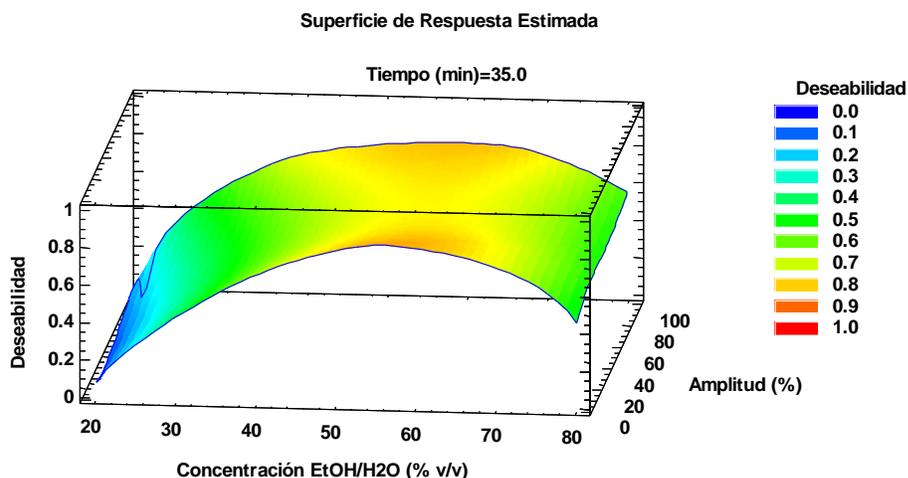


Figura 25. Superficie respuesta del valor deseable de concentración de antocianinas y polifenoles totales en los extractos obtenidos por el método de EAU a partir de residuos de arándano

Como se puede apreciar en la **Figura 25** de superficie respuesta del valor deseable, el valor máximo de antocianinas, polifenoles totales, DPPH y FRAP se encuentran en la zona más oscura del gráfico (amarillo), en la cual se obtuvieron valores para una combinación óptima del porcentaje de amplitud (90%), tiempo (10 minutos) y concentración de etanol (59,9 % v/v) en el proceso de extracción EAU como se muestra en la **Tabla 36**.

**Tabla 36.** Optimización de las cuatro Variables Respuesta maximizando la concentración de antocianinas totales, polifenoles totales, actividad antioxidante DPPH y FRAP

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración Et-OH/H <sub>2</sub> O	20,0	80,0	57,97
Amplitud (%)	20,0	90,0	90,0
Tiempo (min)	10,0	60,0	10,0

Valor deseabilidad= 0,86

Según el estudio realizado por He *et al.*, 2016 a residuos de vino de arándano (*Vaccinium ashei*) aplicando condiciones de temperatura (34-61,03 °C), tiempo de sonicación de 23,67 minutos y relación sólido-líquido 21,70 ml/g de pomasa seca se obtuvieron resultados que oscilan entre 3,41 a 4,11 mg EC3G/g de pomasa seca y 7,19 a 16,01 mg EAG/g de pomasa seca, mientras que según Aliaño-González *et al.*, 2020 mostró las condiciones óptimas para extracción asistida con ultrasonido de arándanos, temperatura 34 °C, 74,6% v/v de metanol: agua (pH=4) y amplitud del 70% por 5 minutos con obtenciones de 10,18 mg / g de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) y para polifenoles totales se encuentran extracciones de 32,18 mg/ g de arándano con 33,3 °C, 44% v/v metanol: agua (pH=7) y 70 % de amplitud durante 15 minutos pero no encontraron diferencias a los 20 minutos. Comparando estos resultados con las mayores obtenciones de este estudio; 13,11 mg EC3G/g de RA liofilizado para antocianinas totales y 50,50 mg EAG/g de RA liofilizado para polifenoles totales se nota que los residuos de arándano *Vaccinium corymbosum* cv Legacy superan a los encontrados en arándanos *Vaccinium ashei*, aproximadamente en un 68 % superior con respecto a antocianinas y polifenoles totales. Además, en relación con las extracciones demostradas por Aliaño-González *et al.*, 2020, también se muestra que el arándano como fruto entero bajo las condiciones propuestas por el autor se obtienen aproximadamente un 22% y un 56% menos de contenido de antocianinas y polifenoles totales. Por lo tanto, los resultados superiores obtenidos en este trabajo podrían deberse al tipo de cultivo y a la utilización de etanol en vez de metanol ya que tanto el tipo como la concentración del solvente (facilita el acceso del disolvente al soluto). En la literatura además se menciona que cuando se utiliza EAU con etanol como solvente la obtención de los compuestos fenólicos fue mayor (Di Donato *et al.*, 2018) y se considera como uno de los factores relevantes para la extracción de polifenoles totales y DPPH. Además, del tiempo y la concentración del solvente para la obtención de antocianinas totales según el estudio realizado por Wang *et al.*, 2016.

En la literatura se pueden encontrar diversos trabajos como el realizado por Holtung *et al.*, 2011 y Bamba *et al.*, 2018 sobre residuos de arándano *Vaccinium corymbosum* en donde los autores del primero aplican como condiciones de proceso un tiempo de 15 minutos y

90 °C de temperatura obteniendo resultados para antocianinas totales de  $6,86 \pm 12$  mg C3G/g muestra y  $20,04 \pm 17$  mg EAG/g muestra para polifenoles totales, mientras que en el segundo estudio para la extracción se aplican temperaturas de 20-40 °C, una concentración de solvente etanol-agua al 50 %v/v durante 40 minutos se obtuvieron como resultados para antocianinas totales (31,32 mg EC3G/100 g de materia seca), polifenoles totales (22,33 mg EAG/ 100 g de materia seca) y DPPH (41,79 mg Trolox/g de materia seca).

Otros estudios realizados sobre residuos de *Vaccinium myrtillus* por Machado *et al.*, 2017 y Dos Santos *et al.*, 2021, las condiciones de extracción aplicadas en el primer estudio fueron: sonicación de 90 min, temperatura de 80 °C y una concentración de solvente (EtOH/H<sub>2</sub>O) del 70 %v/v obteniendo valores para antocianinas totales de  $2,33 \pm 0,08$  mg EC3G/g residuo seco, polifenoles totales de  $5,75 \pm 0,02$  mg EAG/g residuo seco, DPPH:  $42,51 \pm 2,84$  µmol ET/g residuo seco y FRAP:  $54,82 \pm 2,54$  µmol ET/g residuo seco. Mientras que para el segundo estudio se aplicó un tiempo de 45 min, una intensidad del 100% y una temperatura de 60 °C resultando en la extracción de antocianinas totales ( $0,59 \pm 0,04$  µg C3G/mg de extracto), polifenoles totales ( $5,02 \pm 0,32$  µg EAG/mg de extracto), FRAP ( $129,28 \pm 17,25$  µM ET/ mg de extracto) Y DPPH ( $1,64 \pm 0,12$  µM ET/ mg de extracto). Con los resultados reportados por los autores a partir de residuos de arándanos de tipo *Vaccinium corymbosum* se encontró que en comparación con el presente estudio **Tabla 36** y **37**, la utilización de largos tiempos de extracción provoca una reducción del contenido de compuestos bioactivos en los extractos. Sumado a esto las temperaturas altas igualmente contribuyen a la reducción en la extracción de fenólicos. Una situación similar se evidencia en aquellos estudios que utilizaron residuos de *Vaccinium myrtillus* como materia prima en los experimentos.

**Tabla 37.** Valores de las variables respuesta (polifenoles totales, antocianinas totales, FRAP, DPPH) en el Extracto EAU Óptimo del modelo predicho y experimental de residuos de arándano liofilizado.

<i>Respuesta</i>	<i>Óptimo predicho</i>	<i>Óptimo experimental</i>
<b>Antocianinas Totales</b>	12,51	$12,57 \pm 0,08$

<b>Polifenoles Totales</b>	24,19	32 ± 2,13
<b>FRAP</b>	30,16	29,54 ± 7,09
<b>DPPH</b>	54,08	50,07 ± 1,85

Resultados presentados como promedio ± desviación estándar. Antocianinas totales: mg equivalentes de cianidina 3-glucósido/g de residuos de arándanos liofilizados. Polifenoles totales: mg equivalentes de ácido gálico/g de residuo de arándanos liofilizados. FRAP: μmol equivalentes de Trolox/g de residuo de arándano liofilizado. DPPH: μmol equivalente de Trolox/g de residuo de arándano liofilizado

Los parámetros obtenidos como óptimos en este estudio fueron: concentración etanol-agua acidulada al 0,5% con ácido acético (57,97 %v/v), amplitud al 90%, y tiempo (10 minutos). Los parámetros más significativos para la extracción correspondieron a: Concentración etanol (+), efecto cuadrático de la concentración de etanol y tiempo (-), la amplitud (+) y la interacción amplitud-tiempo (-). Resultados similares fueron obtenidos en el estudio realizado por Rezende *et al.*, 2017 en su trabajo de optimización de Extracción Asistida por Ultrasonido a residuos de acerola, dónde las variables significativas fueron: el tiempo de extracción para polifenoles totales, concentración de etanol para antocianinas totales, capacidad antioxidante medida por DPPH y la relación etanol-residuo, siendo esta última la única variable que mostró ser estadísticamente significativa y con efecto positivo similar a FRAP (Rezende *et al.*, 2017). Estos resultados también coinciden con los estudios donde las extracciones mejoran cuando se usan un menor porcentaje de solventes durante menores tiempos; ya que, los contenidos de compuestos fenólicos comienzan a disminuir mientras más tiempo se utiliza en el proceso. Probablemente esto ocurra porque tanto las antocianinas como los polifenoles totales están íntimamente relacionado con la degradación de los compuestos. Este concepto es similar a lo expresado por algunos autores recomendando que en ningún proceso de extracción se someta al extracto a más de 10 min. Sin embargo, existen trabajos como los de Wang *et al.*, 2016 en los que se notifican una mejora de extracción en el contenido de antocianinas monoméricas totales usando 70% de metanol a 30 ° C y 20 min de extracción; con esto se puede decir que existe un rango de tiempo de 10 a 20 minutos para evitar pérdida de compuestos fenólicos totales y un rango de 5 a 10 minutos para el caso de antocianinas totales dependiendo del tipo arándano y solvente utilizado, esto se explicaría ya que la energía vibratoria del ultrasonido se disipa como calor durante la extracción. Por lo tanto,

al usar 20 kHz la exposición a tiempos superiores a 10 minutos provocaría una reducción del contenido total de antocianinas. Sin embargo; otros autores plantean que el uso de 40 kHz en la extracción durante 180 minutos resultó en excelentes extracciones (Silva *et al.*, 2017).

Los valores de amplitud altas son favorables para la obtención de antocianinas y polifenoles totales debido a que la extracción asistida por ultrasonido utiliza una onda de presión sonora oscilante con una frecuencia de 20 kHz que rompe las paredes celulares aumentando de esta manera la transferencia de masa entre el disolvente y la matriz vegetal facilitando la extracción (Aliaño-González *et al.*, 2020; Rein y Yliopistopaino, 2005).

Cabe mencionar que, al igual que en el trabajo realizado por He *et al.*, 2016, en este estudio se usaron temperaturas oscilantes entre los 35 y 40 ° C para mantener la estabilidad de las antocianinas presentes en el extracto debido a que si se aplican temperaturas altas se da un aumento del vapor del solvente, presión y disminución de la tensión superficial conforme la temperatura aumenta lo que afecta la formación de la burbuja de cavitación colapsando con menos intensidad provocando menos alteración celular durante la sonicación (Bamba *et al.*, 2018). Además, aunque el ultrasonido puede degradar los compuestos antocianínicos tiene como posibilidad la utilización de las llamadas pulsaciones que no son más que ciclos de tiempo, de esta manera se podría minimizar efectos no deseados. Por ello, en el presente estudio se usaron ciclos de 10 segundos de ultrasonido y 10 segundos de pausa en parte para evitar el sobrecalentamiento del equipo y por otra parte para evitar la elevación brusca de temperatura durante el proceso de extracción.

En cuanto a la actividad antioxidante determinada a través de las metodologías de FRAP y DPPH estudios revelan que los resultados muestran una mayor obtención en los extractos pertenecientes a procesos con Soxhlet seguidos de extracción asistida con ultrasonido, en este estudio no es diferente ya que las extracciones fueron altas, para FRAP (30,64  $\mu\text{mol ET/g}$  de RA liofilizado) y para DPPH (51,51  $\mu\text{mol ET/g}$  de RA liofilizado) correspondiéndose estos valores a los hallados para antocianinas y polifenoles totales ya

que, la capacidad antioxidante depende directamente de los compuestos fenólicos recuperados tomando en cuenta que tanto la polaridad del disolvente como la temperatura de extracción juegan un papel importante (García-Mendoza *et al.*, 2017). Además, en la literatura se menciona que se obtienen mejores rendimientos con ultrasonido debido a que el proceso de sonicación puede conducir a la formación de radicales libres que pueden mejorar reacciones de polimerización / despolimerización sin disociar la antocianina y gracias a la cavitación se produce una serie de efectos mecánicos, colisiones de partículas y ruptura de la pared celular, que promueve la penetración del disolvente dentro de la matriz de la muestra aumentando las tasas de transferencia de antocianinas totales y reduciendo los tiempos de sonicación, por eso muchos autores además consideran una relación de etanol-residuo como efecto influyente en los procesos de extracción. Este parámetro no fue analizado en el presente estudio. Sin embargo, al utilizar una punta de ½ pulgada el volumen al que se recomienda extraer son 50 ml como mínimo; por lo tanto, la relación entre sólido y líquido fue de 10 ml/g de pomasa liofilizada la mitad de lo utilizado por He *et al.*, 2016. De la misma manera, la temperatura es considerada para ese tipo de proceso. A pesar de esto, considerando las experiencias anteriores de extracción realizadas en este mismo estudio y según la literatura se conoce el efecto que tiene la temperatura en la extracción asistida con ultrasonido determinando de manera práctica que la temperatura adecuada oscila entre los 35 y 40 °C (Aliaño-González *et al.*, 2020; Pingret *et al.*, 2012). La temperatura a un nivel suficientemente alto favorece la solubilidad y difusividad de la matriz vegetal en el solvente para que el rendimiento de extracción aumente. En adición, la temperatura tiene un mayor efecto sobre el umbral de cavitación, lo que provoca una cavitación acústica generando la formación de núcleos cavitacionales. Este efecto genera una fuerza de corte relativamente mayor que rompe y explota el núcleo de cavitación. Además, rompe las paredes celulares en la extracción aumentando la tasa de transferencia de masa y como consecuencia mayor eficiencia de extracción (Demirci *et al.*, 2021). De otra forma, una temperatura más alta que la óptima puede causar que compuestos termosensibles como las antocianinas se degraden (He *et al.*, 2016). Algunos autores incluso estudiaron la cinética de degradación de las antocianinas durante el

proceso térmico y sugieren una cinética de reacción de primer orden, donde la constante de degradación aumentó a medida que aumentaba la temperatura (Demirci *et al.*, 2021). También para una mejor extracción se debe tomar en cuenta que a condiciones neutras y alcalinas existe mayor degradación de antocianinas en comparación al uso de solventes acidificados ya que mejoran su estabilidad. En esta tesis se utilizó agua acidificada con ácido acético, aunque también la literatura recomienda utilizar ácido clorhídrico para ajustar el pH de las soluciones (Di Donato *et al.*, 2018; He *et al.*, 2016).

He *et al.*, 2016 afirma que para obtener un máximo de extracción con el método EAU los parámetros clave son: tiempo de sonicación, temperatura y relación líquido-sólidos; tomando en cuenta lo anterior este estudio aporta con la importancia que tiene además el porcentaje de amplitud ya que en el modelo presenta significancia para maximizar el contenido de antocianinas, polifenoles, FRAP y DPPH.

#### **6.8. Experimentos de extracción con CO<sub>2</sub> Supercrítico (CO<sub>2</sub>-SC) de antocianinas a partir de residuos de arándanos.**

En el presente estudio, según el método de extracción con el método (CO<sub>2</sub>-SC), se pretende maximizar la extracción de antocianinas a partir de residuos de arándano mediante la combinación de múltiples factores que afectan este proceso, en específico, temperatura, presión y adición de cosolvente en este caso etanol. Los resultados del diseño experimental Box-Behnken se observan en la **Tabla 38**. Se aprecia una tendencia al aumento en la extracción de antocianinas totales, polifenoles totales y de la actividad antioxidante al aplicar valores intermedios de temperatura, porcentajes altos de cosolvente y valores de presión elevados. De esta manera, un incremento de temperatura (50 °C), presión de 400 bar y aplicación de una concentración al 10% de cosolvente (etanol) causan un aumento de las cuatro variables respuestas estudiadas con el valor más alto en relación con los otros experimentos. Por el contrario, se obtuvieron valores inferiores para el contenido de polifenoles y antocianinas totales con una concentración de cosolvente al 0%, temperatura de 40 °C y presión de 300 bar.

**Tabla 38. Caracterización Química de los extractos obtenidos con Extracción mediante CO<sub>2</sub> Supercrítico**

Exp.	Cosolvente Etanol (%)	Temperatura (°C)	Presión (bar)	Antocianinas Totales	Polifenoles Totales	FRAP	DPPH
1	5	50	300	1,55 ± 0,01	1,50 ± 0,17	11,45 ± 0,25	6,51 ± 0,39
2	5	40	400	0,19 ± 0,04	0,20 ± 0,08	4,39 ± 0,19	1,51 ± 0,00
3	0	50	200	0,03 ± 0,03	0,20 ± 0,01	1,11 ± 0,09	0,22 ± 0,01
4	5	50	300	1,90 ± 0,26	2,50 ± 0,22	16,54 ± 0,27	11,58 ± 0,92
5	10	40	300	1,98 ± 0,05	2,10 ± 0,20	13,94 ± 0,37	9,33 ± 0,25
6	5	40	200	0,57 ± 0,00	0,90 ± 0,05	6,62 ± 0,08	2,91 ± 0,04
7	10	60	300	2,45 ± 0,04	1,40 ± 0,42	15,40 ± 0,04	11,86 ± 0,16
8	0	50	400	0,01 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,50 ± 0,05	0,13 ± 0,01
9	5	60	400	1,13 ± 0,00	3,90 ± 0,03	9,91 ± 0,28	6,98 ± 0,14
10	0	40	300	0,01 ± 0,00	0,10 ± 0,03	0,35 ± 0,00	0,12 ± 0,01
11	10	50	200	3,60 ± 0,03	3,90 ± 0,46	33,47 ± 0,36	22,03 ± 0,30
12	10	50	400	6,69 ± 0,11	7,50 ± 0,32	51,57 ± 2,43	34,48 ± 1,10
13	5	60	200	0,86 ± 0,06	1,40 ± 0,14	7,56 ± 0,26	5,75 ± 0,02
14	5	50	300	2,26 ± 0,05	1,10 ± 0,16	6,12 ± 0,06	3,81 ± 0,00
15	0	60	300	0,02 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,26 ± 0,00	0,07 ± 0,02

Resultados presentados como promedio ± desviación estándar. Antocianinas totales: mg equivalentes de Cianidina 3-glucósido/g RA liofilizado. Polifenoles totales: mg equivalentes de ácido gálico/g RA liofilizado. FRAP: μmol equivalentes de Trolox/g RA liofilizado. DPPH: μmol equivalentes de Trolox/g RA liofilizado.

## 6.9. Caracterización de las propiedades físicas y químicas de los extractos obtenidos con CO<sub>2</sub> Supercrítico (CO<sub>2</sub>-SC)

### 6.9.1. Contenido de Polifenoles Totales

En la **Tabla 38**, se presenta el contenido de polifenoles totales obtenidos en las diferentes experiencias del diseño propuesto. La concentración de polifenoles totales fluctuó entre un mínimo de 0,10 y un máximo de 7,50 mg EAG/g residuo liofilizado.

El valor superior del coeficiente de determinación ( $R^2=78,3\%$ ) del modelo seleccionado para predecir la concentración de polifenoles totales de los extractos permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (**Figura 26**).

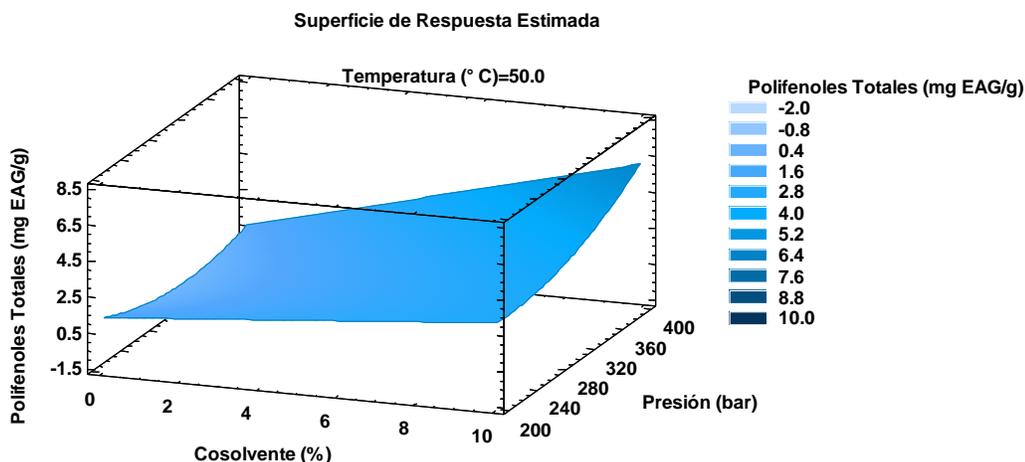


Figura 26. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Polifenoles Totales (mg equivalentes de ácido gálico/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con Extracción CO<sub>2</sub>-SC y variables independientes de concentración de cosolvente, temperatura y presión.

En la **Figura 26**, la región azul intenso del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación temperaturas moderadas (55 °C), un aumento en la presión (400 bar) y concentraciones de cosolvente elevados (10%) se pudieron obtener la mayor concentración de polifenoles totales (6,54 mg EAG/g RA). Siendo estas condiciones resultantes como óptimas para la maximización del contenido de polifenoles totales en los extractos obtenidos por el método con CO<sub>2</sub>-SC a partir de residuos de arándanos cv. Legacy como se describe en la **Tabla 39**.

**Tabla 39.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de polifenoles totales

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Presión (bar)	200,0	400,0	400,0
Temperatura (°C)	40,0	60,0	55,05
Cosolvente (%)	0,0	10,0	9,99

Valor óptimo = 6,54 mg EAG/g RA

Por otra parte, al realizar el análisis de varianza (**Anexo 7.1**) para la cantidad de polifenoles totales y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que el efecto que tiene la variable

cosolvente es la única que tuvo significancia ( $p < 0.05$ ). Esta información se puede corroborar en el diagrama de Pareto, el cual se muestra en la (**Anexo 7.1**), donde se puede apreciar que la concentración de etanol como cosolvente tuvo una influencia positiva en el método, ya que cuando mayor ha sido su concentración, mayores fueron los resultados que se obtuvieron para el contenido de polifenoles totales en los extractos.

### 6.9.2. Contenido de Antocianinas Totales

La **Tabla 38** muestra el contenido de antocianinas totales resultantes de los diferentes tratamientos aplicados en el diseño experimental. La concentración de antocianinas totales fluctuó entre un mínimo de 0,01 y un máximo de 6,69 mg EC3G/ g de residuo de arándano liofilizado.

El valor del coeficiente de determinación ( $R^2=86,5$ ) del modelo seleccionado para predecir la concentración de polifenoles totales de los extractos permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (**Figura 27**).

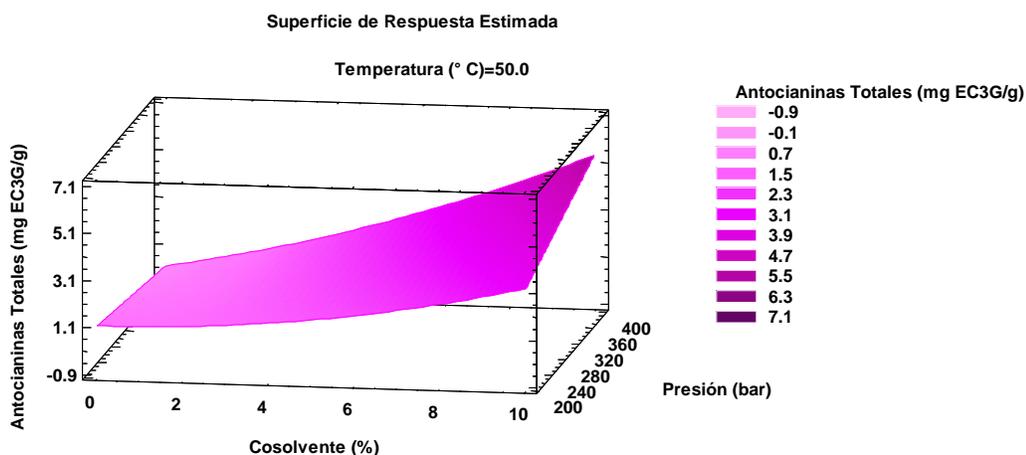


Figura 27. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para Antocianinas Totales (mg equivalentes de cianidin-3 glucósido/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con Extracción CO<sub>2</sub>-SC y variables independientes de concentración de cosolvente, temperatura y presión.

En la **Figura 27**, la región de color púrpura intenso del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación temperaturas intermedias (50,7 °C), una presión elevada de 400 bar y una concentración de cosolvente (etanol) al 10% se pudo obtener la mayor concentración de antocianinas totales (5,51 mg EC3G/g residuo liofilizado), tomando estas como condiciones óptimas para la maximización del contenido

de antocianinas totales en los extractos del método CO<sub>2</sub>-SC a partir de residuos de arándanos cv. Legacy como se observa en la **Tabla 40**.

**Tabla 40.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando la cantidad de antocianinas totales

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Presión (bar)	200,0	400,0	400,0
Temperatura (°C)	40,0	60,0	50,77
Cosolvente (%)	0,0	10,0	9,99

Valor óptimo = 5,51 mg EC3G/g RA

Según el análisis de varianza (**Anexo 7.2**) para la cantidad de antocianinas totales y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que el efecto lineal concentración de etanol como cosolvente y el efecto cuadrático de la temperatura tuvieron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en el modelo como se puede observar en el diagrama de Pareto (**Anexo 7.2**), donde se puede apreciar que el efecto del porcentaje de cosolvente tienen una influencia positiva en el proceso, es decir que, cuanto mayor fue la concentración de etanol como cosolvente se obtuvieron valores superiores en el contenido de antocianinas totales del extracto, mientras que la temperatura si bien tuvo significancia, la influencia de la variable en el modelo es negativa, es decir que al disminuir o aumentar a los rangos de temperatura hacia los extremos usados en las diferentes experiencias se obtuvieron menores valores de antocianinas totales recuperados en los extractos.

### **6.9.3. Actividad Antioxidante: FRAP**

La **Tabla 38** muestra la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por el método de extracción con CO<sub>2</sub>-SC aplicando las diferentes experiencias en términos de FRAP. Los valores que se observaron fluctúan entre un mínimo de 0,26 y un máximo de 51,57  $\mu\text{mol ET/g}$  de residuo de arándano liofilizado. El valor del coeficiente de determinación ( $R^2=82,6$ ) del modelo seleccionado para predecir la capacidad antioxidante (FRAP) de los extractos permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (**Figura 28**).

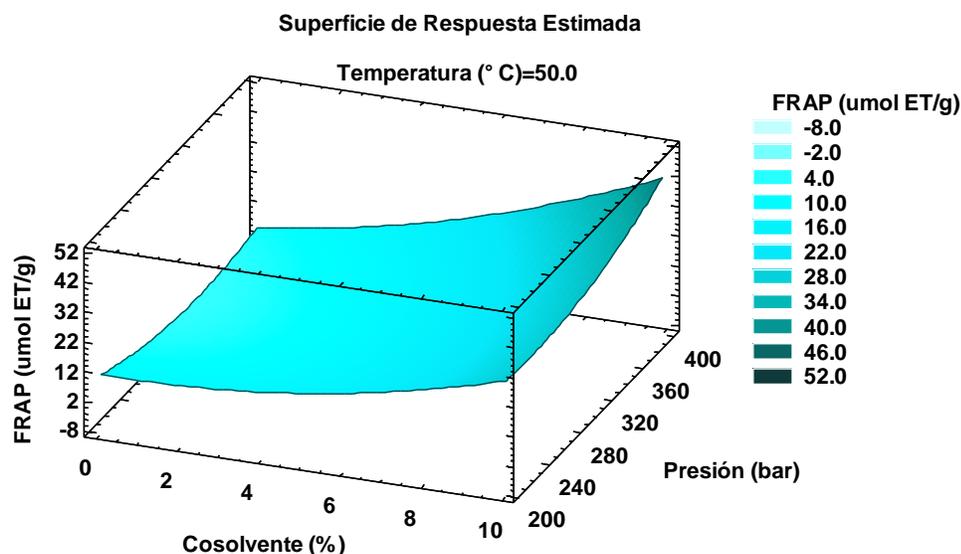


Figura 28. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para FRAP  $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con con Extracción  $\text{CO}_2$ -SC y variables independientes de concentración de cosolvente, temperatura y presión.

En la **Figura 28**, la región de color celeste intenso del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación temperaturas intermedias ( $50^\circ\text{C}$ ), presiones elevadas (400 bar) y concentraciones superiores de etanol como cosolvente (10%) se pueden obtener valores elevados de capacidad antioxidante del extracto obtenido (51,57  $\mu\text{mol ET/g}$  residuo liofilizado). Las condiciones óptimas para maximizar FRAP en los extractos del método  $\text{CO}_2$  -SC a partir de residuos de arándanos se obtuvieron con una temperatura de  $51^\circ\text{C}$ , una concentración de etanol de como cosolvente al 10 % y presiones de 400 bar como se observa en la **Tabla 41**.

**Tabla 41.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando actividad antioxidante FRAP

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Presión (bar)	200,0	400,0	400,0
Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	40,0	60,0	50,53
Cosolvente (%)	0,0	10,0	9,99

Valor óptimo = 42,73  $\mu\text{mol ET/g RA}$ .

Por otra parte, al realizar el análisis de varianza (**Anexo 7.3**) para FRAP y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que el efecto lineal de la concentración de etanol como

cosolvente fue la única variable que presenta efectos significativos ( $p < 0.05$ ). Esto se puede corroborar en el diagrama de Pareto (**Anexo 7.3**), donde se puede apreciar que la concentración de etanol como cosolvente tuvo una influencia positiva en el proceso, por lo que, se puede decir que cuando se utilizaron porcentajes elevados de esta variable se obtuvieron como resultado valores superiores de FRAP en el extracto.

#### 6.9.4. Actividad Antioxidante: DPPH

La **Tabla 38** muestra la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por el método con CO<sub>2</sub>-SC aplicando las diferentes experiencias mediante DPPH. Los valores que se observaron fluctúan entre un mínimo de 0,07 y un máximo de 34,48  $\mu\text{mol ET/g}$  de residuo de arándano liofilizado. El valor del coeficiente de determinación ( $R^2=83,2$ ) del modelo seleccionado para predecir la capacidad antioxidante (DPPH) de los extractos permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (**Figura 29**).

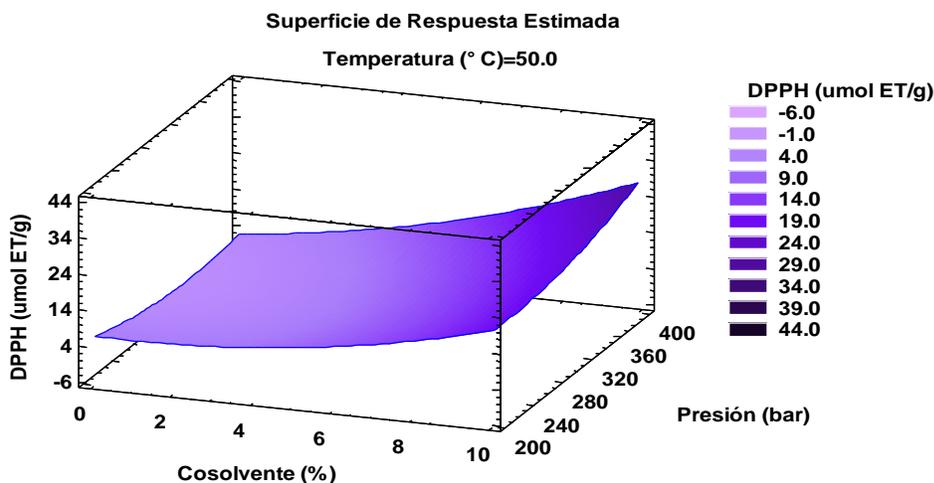


Figura 29. Gráfico de Superficie Respuesta estimada para DPPH ( $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con Extracción CO<sub>2</sub>-SC y variables independientes de concentración de cosolvente, temperatura y presión.

En la **Figura 29**, la región violeta intensa del gráfico tridimensional de Superficie Respuesta indica que con la combinación temperaturas intermedias (51,1 ° C), presiones elevadas (400 bar) y concentraciones elevadas de cosolvente (10%) se puede obtener la mayor actividad antioxidante en términos de DPPH (28,59  $\mu\text{mol ET/g}$  de residuo),

estableciéndose éstas como las condiciones óptimas para la maximización de la actividad antioxidante (DPPH) en los extractos del método de extracción con CO<sub>2</sub>-SC a partir de residuos de arándanos cv Legacy como se observa en la **Tabla 42**.

**Tabla 42.** Optimización de la Variable Respuesta maximizando la actividad antioxidante DPPH

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Presión (bar)	200,0	400,0	400,0
Temperatura (°C)	40,0	60,0	51,13
Cosolvente (%)	0,0	10,0	10,0

Valor óptimo = 28,59 µmol ET/ g RA

Según el análisis de varianza (**Anexo 7.4**) para la actividad antioxidante (DPPH) y aplicando el modelo seleccionado, se obtuvo que únicamente la influencia de la concentración de etanol como cosolvente tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ). Esto se puede corroborar en el diagrama de Pareto (**Anexo 7.4**), donde se puede apreciar que si bien la concentración de etanol tiene influencia en el diseño dicho efecto tiende a ser positivo en el proceso, es decir que a mayor concentración de etanol (cosolvente) mayores fueron los valores de capacidad antioxidante que se obtengan en términos de DPPH.

#### **6.9.5. Optimización de la temperatura, presión y concentración de cosolvente para la metodología de extracción con CO<sub>2</sub> Supercrítico sobre el contenido de antocianinas totales, polifenoles totales, FRAP y DPPH**

Para determinar la temperatura, presión y concentración de cosolvente (etanol) óptimos para la extracción con CO<sub>2</sub> - SC se procedió a transformar las variables respuesta (contenido total de antocianinas, polifenoles totales, FRAP y DPPH) en una variable llamada “Desirability” o “Deseable”, por lo cual se requiere determinar cuál es la combinación de la temperatura, presión y concentración de cosolvente (etanol) en el proceso de extracción para determinar el valor máximo de las cuatro variables respuesta en los residuos de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy.

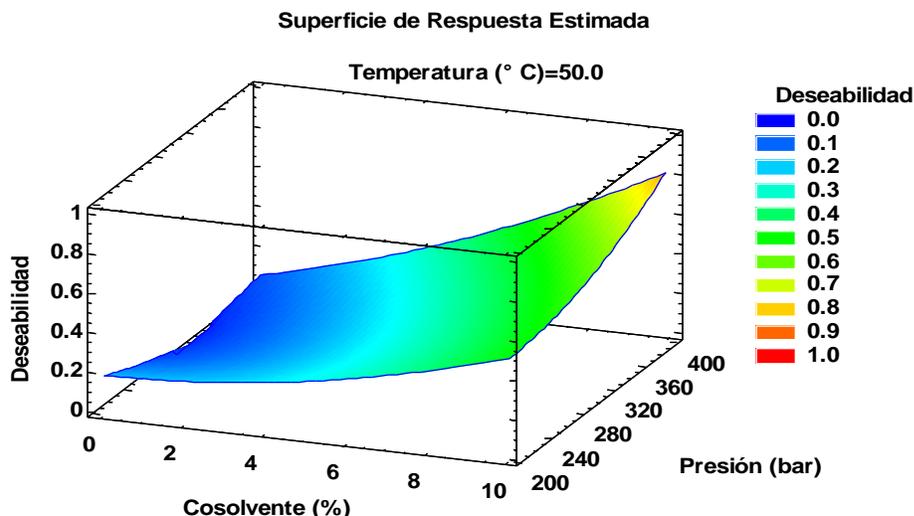


Figura 30. Superficie respuesta del valor deseable de concentración de antocianinas y polifenoles totales en los extractos obtenidos por el método con Extracción CO<sub>2</sub>-SC a partir de residuos de arándano

Como se puede apreciar en la **Figura 30** de superficie respuesta del valor deseable el valor máximo de antocianinas, polifenoles totales, DPPH y FRAP se encuentran en la zona más oscura del gráfico (naranja), en la cual se obtuvieron valores para una combinación óptima de temperatura (51,8 ° C), presión (400 bar) y una concentración de cosolvente al 10% de etanol puro como se muestra en la **Tabla 43**.

**Tabla 43.** Optimización de las cuatro Variables Respuesta maximizando la concentración de antocianinas totales, polifenoles totales, actividad antioxidante DPPH y FRAP

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
Presión (bar)	200,0	400,0	400,0
Temperatura (°C)	40,0	60,0	51,80
Cosolvente (%)	0,0	10,0	10,0

Valor deseabilidad= 0,82

Obteniendo resultados máximos para polifenoles totales (7,2 mg EAG/g), antocianinas totales (5,48 mg EC3G/g), FRAP (44,95 mg ET/g) y DPPH (39,64 mg ET/g). Paes *et al.*, 2014 por otro lado reporta que para residuos de arándano liofilizados las condiciones óptimas requeridas para las máximas extracciones fueron 40 ° C, 200-210 bar utilizando además etanol acuoso como cosolvente al 5% v/v con valores máximos para el contenido

de polifenoles totales (3,5 mg EAG/g), antocianinas totales (0,16 mg/g), DPPH (35  $\mu$ mol ET/g) representando estos valores aproximadamente un 2% de los encontrados cuando se analiza la baya entera fresca después de una extracción sometida a temperaturas de 40 °C y presiones de 150 a 250 bar, mientras que cuando el residuo es liofilizado obtuvo hasta un 7,6% del rendimiento global en la extracción (López-Padilla *et al.*, 2016). Como se nota en este estudio los valores obtenidos fueron superiores a los obtenidos en el trabajo de Paes *et al.*, 2016, esta diferencia en los resultados probablemente sea debido a que se analizan arándanos de tipo y cultivares diferentes además de que, las condiciones óptimas varían utilizando un porcentaje de cosolvente (etanol) igual al 10% y mayores presiones (400 bar). Sin embargo, en cuanto a la temperatura a pesar de que se coincide con un óptimo de temperaturas intermedias 40-50 °C; resulta un tema controversial ya que, la mayoría de autores coinciden en que las antocianinas son sensibles a temperaturas altas y aquellas temperaturas superiores a los 40 °C son útiles en la extracción de otros compuestos fenólicos (Silva *et al.*, 2017), así lo menciona un estudio realizado por Garcia-Mendoza *et al.*, 2017 a residuos de juçara usando líquidos presurizados y fluidos supercríticos mostraron mayores extracciones de polifenoles totales al aplicar temperaturas de 60 °C, usando como solvente mezclas acidificadas de etanol-agua al 50% v/v y aumentando la temperatura a 80 °C se favoreció la extracción de compuestos fenólicos de un 51 a un 53%.

En los registros de la literatura se pueden encontrar escasos trabajos realizados sobre residuos de arándano *Vaccinium corymbosum* L aplicando la metodología de extracción con CO<sub>2</sub>-SC. Sin embargo, en el estudio realizado por Laroze *et al.*, 2010 las condiciones de proceso utilizadas fueron: temperatura de 60 °C y presión de 80-100 bar obteniendo extracciones de polifenoles totales de 0,295 mg EC3G/g de pomasa y DPPH de 72,6  $\mu$ g DPPH/g EAG. Otro trabajo realizado por Kitrytė *et al.*, 2020 sobre residuos de arándano *Vaccinium vitis-idaea* L aplica las siguientes condiciones de proceso: presión 470 bar y temperatura 53 °C obteniendo 11,82 mg/g de pomasa seca para polifenoles totales. Comparando estos estudios con el presente trabajo **Tabla 43** y **44**, se puede deducir que, para obtener mayor extracción de fenólicos el uso de un cosolvente es de gran importancia

en el proceso; además de observar que las presiones adecuadas corresponden a valores altos (400 bar o más) con temperaturas moderadas de 50 a 60 °C.

**Tabla 44.** Valores de las variables respuesta (polifenoles totales, antocianinas totales, FRAP, DPPH) en el Extracto CO<sub>2</sub>-SC Óptimo del modelo predicho y experimental de residuos de arándano liofilizado.

<i>Respuesta</i>	<i>Óptimo predicho</i>	<i>Óptimo experimental</i>
<b>Antocianinas Totales</b>	5,49	5,48 ± 0,07
<b>Polifenoles Totales</b>	6,37	7,2 ± 0,11
<b>FRAP</b>	42,43	44,95 ± 1,37
<b>DPPH</b>	28,56	39,64 ± 3,07

Resultados presentados como promedio ± desviación estándar. Antocianinas totales: mg equivalentes de cianidina 3-glucósido/g de residuos de arándanos liofilizados. Polifenoles totales: mg equivalentes de ácido gálico/g de residuo de arándanos liofilizados. FRAP: μmol equivalentes de Trolox/g de residuo de arándano liofilizado. DPPH: μmol equivalente de Trolox/g de residuo de arándano liofilizado

La temperatura es un factor muy relevante en este tipo de extracción. Al aumentar isobáricamente la temperatura disminuye el poder del solvente ya que disminuye la densidad del CO<sub>2</sub>-SC. Sin embargo, también aumenta la presión de vapor (volatilidad) del soluto. Este incremento de presión cercano al punto crítico no es capaz de compensar la disminución en la densidad del CO<sub>2</sub>-SC, por lo que se produce una disminución en la solubilidad. Este inconveniente se soluciona elevando las presiones a niveles muy superiores al punto crítico del CO<sub>2</sub> ya que con esta intervención, el fluido se vuelve menos compresible sobrepasando de esta manera la disminución de solubilidad con aumentos de temperatura a presión constante (Lizcano *et al.*, 2019). Por otra parte, la presión es otro factor relevante en la extracción con CO<sub>2</sub>-SC. Al aumentar este parámetro, el CO<sub>2</sub>-SC es capaz de separar compuestos de mayor peso molecular o con mayor polaridad como ocurre con los compuestos antociánicos ya que, la densidad del CO<sub>2</sub> aumenta provocando un incremento del poder solvente, lo que favorece la eficiencia de la extracción de varias matrices vegetales (Bustamante *et al.*, 2016; López-Padilla *et al.*, 2016).

La extracción con CO<sub>2</sub>-SC tradicionalmente se usa para la extracción de compuestos no polares al ser un solvente de baja polaridad similar al pentano y hexano. La densidad del fluido supercrítico es similar a la de los líquidos y su viscosidad similar a la de los gases entregando un gran poder solvente y favoreciendo la capacidad de penetración en

los poros de la matriz vegetal (Babova *et al.*, 2016). Sin embargo, para extraer antocianinas conocidas por ser moléculas polares, se debe utilizar en adición un disolvente polar que actuará como cosolvente al generar fuerzas intermoleculares (enlaces de hidrógeno). De esta forma se aumenta la selectividad el proceso, compitiendo con los compuestos adsorbidos en los puntos activos de la matriz vegetal mejorando los rendimientos de la extracción respecto a los experimentos en los que no se utilizó niveles mayores de cosolvente. Este comportamiento se observa en la **Tabla 38**. La elección del cosolvente es un factor de alta relevancia para el éxito de la extracción ya que la presencia de sustituyentes polares y el aumento del peso molecular de los compuestos extraíbles disminuyen su solubilidad en el CO<sub>2</sub> (Bustamante *et al.*, 2016; Garcia-Mendoza *et al.*, 2017). Comúnmente se utiliza una mezcla de CO<sub>2</sub>, etanol y agua, en proporciones de acuerdo con la matriz vegetal que se analiza ya que, se aumenta la solubilidad de sustancias no volátiles en comparación con el uso de CO<sub>2</sub> puro acentuando además la dependencia de la metodología con la temperatura, permitiendo reducir la presión de extracción y posibilitando la extracción de compuestos modificando únicamente la temperatura. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que la fracción de etanol / agua debe estar en proporciones en las que la mezcla sea soluble en CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico, a la presión y temperatura utilizada (mezcla supercrítica). Si no se cumple este requisito hay una coexistencia de dos fases, líquida y supercrítica que probablemente afectarían la obtención de compuestos. Al contrario que en las técnicas anteriores la acidificación de los disolventes en la literatura se menciona que no se tiene una influencia significativa sobre la eficiencia en la extracción con fluidos supercríticos (Paes *et al.*, 2014) debido a que, si la muestra analizada contiene agua cuando entra en contacto con el CO<sub>2</sub> genera ácido carbónico (pH bajo), por lo que no sería necesario la adición de otro acidificante (Silva *et al.*, 2017). Aunque también es cierto que en cuanto a la estabilidad de las antocianinas como se ha citado a lo largo de esta tesis, el uso de un cosolvente acidificado puede ejercer efectos positivos ya que se mantendría la forma de catión flavílo en las antocianinas por lo que es de importancia considerar las características del cosolvente, más cuando se demuestra que en la extracción con CO<sub>2</sub>-SC los efectos significativos en

el modelo corresponden al cosolvente (+) y la interacción cosolvente-presión (+) con efectos positivos para ambos. Por ello se afirma que el rendimiento de la extracción depende en gran medida de la combinación de variables (temperatura, presión y carga de cosolvente) para obtener los mejores resultados de solubilidad y transferencia de masa. Lizcano *et al.*, 2019 recomienda que presiones intermedias y el uso de un cosolvente son útiles para obtener mayores extracciones. Estos mismos autores indican que las altas presiones pueden mejorar la transferencia de masa, lo que coincide con lo observado en esta tesis.

Los arándanos son frutos con alta capacidad antioxidante. Sin embargo, aplicando este tipo de extracción se obtuvieron valores bajos para esta variable en el extracto de residuo de arándano cv Legacy. La explicación a estos valores encontrados puede estar relacionada con que la capacidad antioxidante depende del contenido de polifenoles totales o de antocianinas. El rendimiento obtenido con este método es mucho menor que con otras metodologías; por lo que, lo mismo se extiende a los valores de capacidad antioxidante para este método. Además, podrían haber otros factores que disminuyen esta capacidad antioxidante; por ejemplo, la presencia del ácido ascórbico, que se sabe está presente en una cantidad significativa en arándanos y aporta con una pequeña porción (10%) a la capacidad antioxidante total (Skrovankova *et al.*, 2015; Rein y Yliopistopaino, 2005; Cavalcanti *et al.*, 2011).

De acuerdo con los resultados, este método no es la mejor opción para la extracción de antocianinas y polifenoles porque la extracción con CO<sub>2</sub>-SC está dirigido a moléculas principalmente apolares, esto a pesar de que se usaron los niveles superiores del diseño, no se logró llegar a los rendimientos de las otras tecnologías. Como se mencionó anteriormente, esta situación podría ser debido a las propiedades del solvente y su baja afinidad por compuestos polares. Por lo tanto, esta situación resulta desventajosa para la extracción.

**6.10. Extracciones óptimas aplicando metodologías emergentes: ASE, EAU y CO<sub>2</sub>-SC y extracción convencional a partir de residuos *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy.**

La optimización de los cuatro métodos de extracción a partir de los residuos de arándanos cv Legacy para la extracción de polifenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante fueron afectados tanto por la técnica de extracción como por los parámetros aplicados para cada tipo de extracción realizada. En la **Tabla 45.**, se muestran los resultados tanto los experimentales como los obtenidos en la optimización múltiple correspondientes al contenido de polifenoles totales, contenido de antocianinas totales y capacidad antioxidante medida tanto con metodología FRAP como DPPH en el diseño.

**Tabla 45. Contenido óptimo y experimental de Polifenoles, Antocianinas totales, DPPH y FRAP recuperados por Extracción Convencional, ASE, EAU y CO<sub>2</sub> – SC a partir de residuos de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy.**

Método Extracción	Polifenoles Totales		Antocianinas Totales		FRAP		DPPH	
	Exp	Ópt	Exp	Ópt	Exp	Ópt	Exp	Ópt
Convencional	53±6,6	41,6	25,6±1,3	11,0	381,2±13,5	230,7	197,4±8,2	319,8
ASE	49,3±0,5	50,5	15,7±0,1	18,4	378,6±15,3	438,2	230,3±0,9	328,5
EAU	32±2,1	24,1	12,5±0,08	12,5	29,5±7	30,1	50,0±1,8	54,0
CO <sub>2</sub> - SC	7,2 ± 0,1	6,37	5,4±0,07	5,5	44,9±1,3	42,4	39,6± 3,0	28,5

Resultados presentados como promedio ± desviación estándar. Antocianinas totales: mg equivalentes de Cianidina 3-glucósido/g RA liofilizado. Polifenoles totales: mg equivalentes de ácido gálico/g RA liofilizado. FRAP: μmol equivalentes de Trolox/g RA liofilizado. DPPH: μmol equivalentes de Trolox/g RA liofilizado; Exp=modelo experimental; Opt= modelo óptimo.

Su y Chien, 2007 reportan en jugos de arándanos (*Vaccinium ashei*) un contenido de antocianinas totales de 11,9±0,03 mg EC3G/g y para polifenoles totales 29,2±0,58 mg EAG/g (Su y Silva, 2006). Comparando estos valores con los residuos de arándano de este estudio, el valor más alto de extracciones representa aproximadamente el doble de las antocianinas y polifenoles totales. Este fenómeno ha sido previamente descrito con un 18-50% del contenido de antocianinas de las bayas frescas contenido en el residuo y que no se extraen con prensado del jugo (Struck *et al.*, 2016)

Otros trabajos como los realizados por Aldaba Marquez *et al.*, 2016 o los reportados por Struck *et al.*, 2016 sobre extractos de arándanos *Vaccinium corymbosum* L., mostraron valores altos en cuanto al contenido fenólico (90,86 y 72 mg de ácido gálico/g de fruta seca, respectivamente). Si estos resultados son comparados con los obtenidos con los cuatro métodos de extracción aplicados a residuos de arándano cv Legacy, los valores de extracción oscilan entre 7,50 -50,50 mg EAG/g de residuo liofilizado, es decir que se obtiene aproximadamente un 56% del total de polifenoles existentes en el fruto entero aplicando la ASE, siendo este método en el que mayor extracción se ha obtenido aplicando el diseño experimental propuesto entre las metodologías emergentes.

Por otra parte, en cuanto al contenido de antocianinas totales la mayor extracción se obtuvo aplicando la extracción acelerada de solventes (18,49 mg EC3G/g RA liofilizado), comparando este valor con los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Zapata, Heredia, *et al.*, 2014 a extractos de arándano (0,921±2.8 mg cianidina-3-glucósido/g de fruto fresco y 8,79 mg cianidina-3-glucósido/g de extracto de arándano), es decir, el residuo posee aproximadamente un 50% del total de antocianinas encontradas en la fruta fresca entera. Además, transformando los valores de este trabajo utilizando el análisis de humedad del residuo fresco (n=24), los valores del contenido de antocianinas ya que oscilan entre (1,60-4,43 mg EC3G/g RA fresco) son comparables a los reportados por Paes *et al.*, 2014 (1,21-3,62 mg EC3G/g RA fresco) y Reque, 2015 (3,75 mg EC3G/g RA fresco). Sin embargo, cabe destacar que los residuos de arándano cv Legacy analizados en este estudio a pesar de ser comparables, los valores fueron superiores en un 30% aproximadamente y estas diferencias e intervalos en el análisis pueden explicarse por el análisis utilizado para la extracción de los residuos y la fruta fresca. Además estos resultados dependerán de las prácticas de cultivo, lugares de cultivo, cosecha de los frutos además del tipo de cultivo y variedad al que pertenecen los arándanos (Ribera *et al.*, 2010; Skrovankova *et al.*, 2015).

En cuanto a la capacidad antioxidante según Pertuzatti *et al.*, 2014; usando la metodología FRAP los arándanos como fruto fresco presentan valores que oscilan entre 128 y 312  $\mu\text{mol ET/g}$  fruto seco ó 5,1 - 12,5  $\mu\text{mol de Trolox / g}$  de peso fresco siendo las

extracciones más altas para cultivos de arándano Florida, mientras que para cultivo Bluecrop se reportaron valores de 5,3 – 9,9  $\mu\text{mol Trolox / g}$  peso fresco. Otro estudio realizado por Aldaba Marquez *et al.*, 2016 demuestra en términos de DPPH que los arándanos poseen valores de 1,10 mg ET /g fruto seco. En cambio, en este estudio se recuperaron valores para FRAP de 438,29  $\mu\text{mol ET/g RA}$  liofilizado y para DPPH valores iguales a 332  $\mu\text{mol ET/g RA}$  liofilizado como los valores más altos recuperados según la extracción ASE. Por lo cual el residuo de arándano cv Legacy conserva en general un 66% de la capacidad antioxidante presente en el fruto entero medido en términos de DPPH del y en el caso de FRAP incluso los análisis realizados a los residuos de arándano cv. Legacy son superiores a los valores que se describe la literatura. Estas diferencias de extracción se pueden dar por diversos factores en especial la madurez de la fruta a la hora de la cosecha (Pertuzatti *et al.*, 2014; Reque *et al.*, 2015). Durante la madurez de la fruta es cuando existe un aumento en el contenido de antocianinas porque hay una conversión de fenoles hacia la síntesis de antocianinas que da como resultado una disminución general de otros compuestos fenólicos. Estudios previos mencionan que; a diferencia de otras bayas, para los arándanos la etapa donde se reporta mayor actividad antioxidante en la maduración temprana y durante la pigmentación inicial. En etapas tempranas los compuestos antociánicos junto con otros compuestos responsables también de la actividad antioxidante del arándano como los ácidos hidroxicinámicos, procianidinas, ácido clorogénico y flavonoles reflejándose de esta manera valores más elevados para la capacidad antioxidante del fruto (Skrovankova *et al.*, 2015).

Según la literatura, las bayas como fruto entero tienen mayor capacidad antioxidante. Sin embargo; el residuo que resulta de la extracción de jugo (orujo) contiene aproximadamente el 52% de la actividad antioxidante de la fruta (en base seca) demostrando de esta manera que los compuestos presentes en la piel contribuyen a la propiedades antioxidantes del arándano (Velioğlu *et al.*, 1998), probablemente debido a la mayor contenido de antocianinas (Lee y Wrolstad, 2004).

En este estudio igualmente se demuestra que en promedio el residuo de arándanos cv Legacy conserva una cantidad considerable (56%) de los componentes bioactivos

(antocianinas, polifenoles y capacidad antioxidante) presentes en el fruto entero, lo cual es importante a la hora de analizar una posible extracción de pomasa resultante del procesamiento en la industria de jugo brindando la oportunidad de utilizar los compuestos bioactivos como materia prima útil para la industria en la elaboración de productos con ingredientes alimentarios funcionales. Sin embargo, también se puede considerar, que en todas las extracciones probablemente existe una pérdida de compuestos antioxidantes no únicamente con el prensado de la fruta sino también el pretratamiento al que fue sometida la pomasa de arándanos. El pretratamiento de la materia prima antes de la extracción es importante debido a las características del arándano ya que naturalmente contiene agua en gran cantidad lo cual podría producir dilución en el extracto; además, puede reaccionar como nucleófilo con el catión flavilio en el C-2 formando una base carbinol incolora, lo que constituye una degradación de las antocianinas y, por lo tanto, un deterioro en la capacidad antioxidante. Las antocianinas están contenidas en orgánulos intracelulares; por lo que, el tratamiento previo de los tejidos facilitaría la accesibilidad y liberación de los compuestos del tejido vegetal. Para aumentar la eficiencia de extracción podría ser interesante analizar el tratamiento previo siempre y cuando se consideren las limitaciones que se impone por la estructura química de las propias antocianinas (Silva *et al.*, 2017; Kurek *et al.*, 2018).

En este estudio, se optó por la liofilización de los residuos obteniendo muy buenos resultados en todas las extracciones, los valores fueron comparables o incluso superiores en cuanto al contenido de antocianinas totales, polifenoles totales, FRAP y DPPH, al igual que lo reportado por Paes *et al.*, 2014 que asegura que la cantidad de antocianinas fue mayor en muestras liofilizadas, aunque otros autores también reportan degradación de las antocianinas a causa de este proceso (Paes *et al.*, 2014). Además, como solvente estrella en todas las experiencias se utilizó etanol debido a que este solvente, posee dos pares de electrones de no enlace que podría actuar como nucleófilo ya que presenta un impedimento esférico de ataque al C-2 del catión flavilo, lo que disminuiría la efectividad de los ataques del agua presente en las muestras (Silva *et al.*, 2017). Estos dos parámetros se aplicaron en todas las extracciones. Sin embargo, se obtuvieron diferencias entre las

obteniciones dependiendo del método de extracción utilizado. De esta manera, se nota que para la obtención de antocianinas totales la mejor opción según el modelo óptimo resulta ser el método ASE con una extracción de 18,46 mg EC3G/g de RA liofilizada. Igualmente, para el contenido total de polifenoles totales (50,5 mg EAG/g de RA liofilizado), FRAP (438,2  $\mu\text{mol ET/g}$  RA liofilizado) y DPPH (328,5  $\mu\text{mol ET/g}$  RA liofilizado).

Comparando los métodos que se usaron para la obtención de antocianinas, polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y FRAP) se observa que tomando en consideración el modelo óptimo, entre los métodos emergentes, ASE fue en el que se obtuvo la máxima extracción para las cuatro variables respuesta, mientras que los valores mínimos se obtuvieron con el método de  $\text{CO}_2$  – SC. Sin embargo, es necesario mencionar que cada metodología posee sus propias particularidades, pero en términos generales se visualizan factores favorables y desfavorables que determinan la correcta extracción de compuestos polifenólicos y antocianinas principalmente.

A partir del creciente interés en la obtención de compuestos bioactivos con potencial industrial se aplicaron en este estudio tecnologías consideradas modernas para la extracción de antocianinas y compuestos fenólicos en una búsqueda por mejorar aspectos en la metodología de extracción como; la reducción de la cantidad de disolventes orgánicos utilizados, menor exposición a agentes reductores, mejora general del rendimiento de extracción, etc. Los métodos de extracción que se aplican en la actualidad usan solventes tóxicos y costosos que incluso podrían llegar a deteriorar la salud si se consumen; sin embargo, usando tecnologías ecológicas como la extracción asistida por ultrasonido y la extracción de fluidos supercríticos y la extracción acelerada de solventes son considerados como métodos alternativos a la extracción con solventes convencionales.

Paes *et al.*, 2014 demuestra que existió una mejora significativa en la extracción de antocianinas por fluidos supercríticos en comparación con ASE contrario a lo obtenido en el presente estudio ya que, la metodología ASE resultó ser más eficiente, menos costosa y más automatizada. Sin embargo, a pesar de que en este estudio la extracción con fluidos

supercríticos obtuvo los rendimientos más bajos en comparación con las otras extracciones, se la puede considerar como una tecnología prometedora para aprovechar los residuos agroindustriales ya que permite obtener extractos ricos en compuestos fenólicos que contienen antocianinas con alta pureza (alta calidad con una mejor actividad funcional) y valiosa capacidad antioxidante. Los compuestos extraídos son selectivos y los extractos poseen un mínimo deterioro o degradación de los compuestos de interés ya que durante el proceso existe ausencia de oxígeno atmosférico y luz por lo que se reduce la oxidación de antocianinas; además, los extractos son libres de solvente que se podrían aplicar en diferentes campos como la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética. Además, el uso de temperaturas puede aumentar la solubilidad de los compuestos extraíbles al romper los enlaces sólidos de los solutos permitiendo aumentar la difusión, reducir la viscosidad del solvente y la tensión interfacial, mejorando así la transferencia de masa (Machado *et al.*, 2017). En comparación con extractos obtenidos con disolventes líquidos en el método convencional (Kurek *et al.*, 2018).

En cuanto al método de extracción asistido por ultrasonido resulta ser un procedimiento que utiliza cantidades reducidas de solventes con un consumo de energía relativamente bajo; además, tiene un enfoque ecológico y seguro para la ingesta humana, lo que convierte a este método en una técnica de especial interés para la industria alimentaria, rápida, eficiente y útil especialmente para materiales con estructuras celulares firmes (Wang *et al.*, 2016). Por otro lado, en el ámbito económico los costos de producción son relativamente altos, por ello, como alternativa por la obtención de rendimientos similares a menores costos se tiene la extracción acelerada de solventes ya que esta metodología tiene la particularidad de ser un proceso automatizado con aplicabilidad industrial.

#### **6.11. Cuantificación e identificación de antocianinas individuales en los extractos óptimos a partir de residuos de arándano (*Vaccinium Corymbosum* cv. Legacy) analizados mediante HPLC-DAD**

El análisis HPLC permitió identificar y cuantificar las diferentes antocianinas individuales presentes en los extractos óptimos obtenidos al aplicar los diferentes métodos de

extracción utilizadas en esta tesis. La identificación se llevó a cabo comparando el tiempo de retención de las muestras y los datos de los estándares de antocianinas, mientras que la concentración fue analizada mediante curvas construidas con concentraciones conocidas a partir de estándares de cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina y malvidina glucósidos generando ecuaciones de calibración con coeficientes de linealidad de 0,99 considerados aceptables para cuantificar (**Anexo 9**).

La mayor concentración de antocianinas individuales fue atribuida a la extracción convencional ya que, la sumatoria de los glucósidos de cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina y malvidina dieron los valores más altos (0,7176 mg/g de residuo liofilizado) en comparación con la concentración de los otros tres extractos. Estos resultados coinciden con otros estudios como los de Reque *et al.*, 2015 y Paes *et al.*, 2014 que identificaron en residuos de arándano cinco antocianidinas (cianidina, delphinidina, malvidina, petunidina y peonidina) y sus combinaciones con glucosa, galactosa y arabinosa en posición 3. Además, utilizando CO<sub>2</sub>-SC estudios como los realizados por Paes *et al.*, 2014 reporta un contenido de 21,8 mg de antocianina/g de residuo fresco (base húmeda) y 14,2 mg de antocianina/100 g de residuo liofilizado (base húmeda) bajo las siguientes condiciones de proceso: 90% CO<sub>2</sub> + 5% H<sub>2</sub>O + 5% etanol. Estos valores resultan ser inferiores a los descritos en este estudio, por lo que, se corrobora que las condiciones óptimas son las adecuadas para obtener mayores concentraciones de antocianinas totales según HPLC como se muestra en la **Tabla 46**.

Estos resultados indican que, se pueden encontrar tanto en arándanos como en sus residuos gran variedad de contenido de antocianinas de acuerdo con las distintas variedades utilizadas. Sin embargo, la distribución del perfil de antocianinas es similar así se puede observar los respectivos cromatogramas en las **Figuras 31, 32,33 y 34**.

**Tabla 46. Análisis de las antocianinas individuales presentes en residuos de arándano (*Vaccinium Corymbosum* cv Legacy) a partir de los extractos óptimos obtenidos por el método Convencional, ASE, EAU y CO<sub>2</sub>-SC.**

---

Antocianinas Individuales

---

<b>Extractos Óptimos</b>	<b>Condiciones óptimas de proceso</b>	<b>Del-3OG</b>	<b>Pet-3OG</b>	<b>Peo-3OG</b>	<b>Cia-3OG</b>	<b>Mal-3OG</b>	<b>Contenido Total</b>
<b>Convencional</b>	EtOH: H <sub>2</sub> O: 50,4 % v/v Tiempo: 84,6 min. Temperatura: 60 °C	0,0033 (0,46%)	0,1996 (27,8%)	0,0512 (7,13%)	0,4070 (56,7%)	0,0565 (7,87%)	0,7176 (100%)
<b>ASE</b>	EtOH: H <sub>2</sub> O: 79,8 % v/v Temperatura: 41,3 °C Ciclos estáticos: 1	0,0058 (1,42%)	0,1165 (28,6%)	0,0605 (14,8%)	0,1769 (43,5%)	0,0468 (11,5%)	0,4065 (100%)
<b>EAU</b>	EtOH: H <sub>2</sub> O: 57,9 % v/v Amplitud: 90% Tiempo: 10 min.	0,0052 (1,25%)	0,1136 (27,5%)	0,0294 (7,12%)	0,2304 (55,7%)	0,0344 (8,33%)	0,4130 (100%)
<b>CO<sub>2</sub>-SC</b>	Presión: 400 bar Temperatura: 51,8 °C Cosolvente (EtOH): 10%	0,0158 (6,12%)	0,0600 (23,2%)	0,0219 (8,49%)	0,1374 (53,2%)	0,0228 (8,84%)	0,2579 (100%)

Los resultados de antocianinas individuales fueron expresados en mg de antocianina/g de residuo liofilizado. Del-3OG: Delfinidina-3-O-glucósido. Pet-3OG: Petunidina-3-O-glucósido. Peo-3OG: Peonidina-3-O-glucósido. Cia-3OG: Cianidina-3-glucósido. Mal-3OG: Malvidina-3-glucósido.

Las antocianinas que difieren solo en su antocianidina eluyen diferente en el tiempo así se puede observar en el caso de la delfinidina y la malvidina, ya que la primera al poseer más grupos hidroxilo posee mayor polaridad en comparación con la malvidina que posee más grupos metoxi confiriéndole a la molécula un carácter más hidrofóbico, por lo que eluye al final a través de una columna de fase inversa., este principio se cumple en todos los extractos sin excepción, independientemente del tipo de extracción que se haya utilizado como se demuestra en los cromatogramas presentados.

En la literatura se menciona que en arándanos (*Vaccinium Corymbosum*) como frutos enteros aquellos derivados de delfinidina y malvidina son las formas más representativas de antocianinas encontradas. Investigaciones recientes destacan que después de analizar 24 especies de bayas salvajes y cultivadas se demostró que el arándano tiene altos contenidos de glucósidos de peonidina (He *et al.*, 2016). Sin embargo, dependiendo del cultivo las concentraciones pueden variar; por ejemplo: en los cultivos Bluecrop y Darrow la antocianina delfinidina-3-galactósido se encuentra en menor concentración mientras que peonidina-3-galactósido, malvidina-3-glucósido y malvidina-3-arabinósido están presentes en concentraciones más altas en comparación con cultivos Goldtraube y Patriot. Por otro lado, también se ha informado que las concentraciones de los glucósidos de malvidina (glucosa y arabinosa) son más bajas en frutos silvestres en comparación con

aquellos cultivados (Giovanelli y Buratti, 2009). Otros autores como Vilkickyte *et al.*, 2021 en su estudio realizado sobre arándanos del género *Vaccinium* encontraron que en cultivos 'Erntedank' la cianidina 3-galactósido fue la antocianina predominante aportando entre el 71 y el 84 % del total de antocianinas (419 a 2330 g/g peso seco). Asimismo, cianidina-3-glucósido y cianidina 3-arabinósido tuvieron mayor presencia en los cultivares 'Sussi' y 'Kostromicka', respectivamente. Además, niveles significativamente altos de peonidina-3-glucósidos, petunidina-3-glucósidos y malvidina-3-glucósidos fueron hallados en los cultivares. Por otro lado, Yang *et al.*, 2021 encontró que en los extractos de arándano principalmente se puede encontrar pelargonidina-3-O-galactósido ( $m/z = 433$ ), delphinidina-3-glucósido ( $m/z = 500$ ), y malvidin-3-O-glucosa ( $m/z = 495$ ). Y por mencionar otro, Zhou *et al.*, 2021 reporta que el contenido de malvidin-3-O-glucósido fue el más alto en todos los extractos de arándanos *Vaccinium ashei* seguido por peonidin-3-O-glucósido, petunidin-3-O-glucósido y delphinidin-3-O-glucósido. Además, no se detectó cianidina-3-O-glucósido en los cultivos Britewell, y pelargonidin-3-O-glucósido no se detectó en Baldwin.

Es decir, se encuentran diferentes perfiles de antocianinas dependiendo del tipo de cultivar, dado que, el contenido de antocianinas depende en gran medida de los factores ambientales del hábitat natural, extracción, almacenamiento, entre otras.

En forma similar a lo mencionado anteriormente el jugo y residuos de arándano muestran un patrón similar. Algunos estudios han reportado que en el jugo de arándano presenta una baja concentración de antocianinas, con malvidina-3-glucósido como principal compuesto (Reque *et al.*, 2015). Mientras que con respecto a los residuos de arándano un estudio realizado por Hu *et al.*, 2019 reporta que tanto los glucósidos de malvidina como los de delphinidina representan un 27,71% y 26,3%, respectivamente constituyendo de esta manera las principales antocianinas presentes en los residuos. Además, de constituir más de la mitad del contenido de antocianinas totales. También reportaron que malvidina-3-galactósido con un 18,56% representó la antocianina individual más abundante. Coincidiendo con otro estudio realizado por Li *et al.*, 2016 cuyo estudio analizó diversas

variedades de arándano en China (Dandong, Zhuanghe, Suizhou y Qingdao) obteniendo que malvidina (41,0%), delfinidina (33,1%) y petunidina (17,3%) fueron los principales contribuyentes al contenido de antocianinas totales. Mientras autores como Jara-Palacios *et al.*, 2019 encontró en su estudio que las antocianinas más abundantes en los orujos de arándanos fueron malvidin-3-O-galactosido y malvidin-3-O-arbinosido con un 30 y 29% del contenido de antocianinas totales, respectivamente. Asimismo, según Tagliani *et al.*, 2019 menciona que entre las antocianinas que representan la mayor parte de los compuestos fenólicos totales presentes en la torta de prensa de arándanos destacan la cianidina 3-O-glucósido, malvidina 3-O-glucósido y petunidina 3-O-glucósido representando el 42% de los componentes, seguidos por los fenoles ácidos que representan un 37% en esta matriz (Kurek *et al.*, 2018).

En esta tesis, según los resultados obtenidos se puede coincidir con el último estudio citado, ya que tanto en las extracciones óptimas del método convencional, ASE, EAU como las de CO<sub>2</sub>-SC, la principal antocianina encontrada fue la cianidina-3-O-glucósido, seguido de petunidina-3-O-glucósido, malvidina-3-O-glucósido, peonidina-3-O-glucósido y finalmente definidina-3-O-glucósido.

En el método convencional, el valor de antocianinas totales en el extracto óptimo fue de  $25,61 \pm 1,31$  mg EC3G/g de residuo liofilizado, a partir de este valor se puede decir que la cianidina-3-O-glucósido (0,4070 mg/ g de residuo liofilizado) representó un 1,5%, petunidina-3-O-glucósido (0,1996 mg/g de residuo liofilizado) un 0,77%, malvidina-3-O-glucósido (0,0565 mg/g de residuo liofilizado) un 0,22%, peonidina-3-O-glucósido (0,0512 mg/g de residuo liofilizado) un 0,19% y definidina-3-O-glucósido (0,0033 mg/g de residuo liofilizado) un 0,012%. En total estas cinco antocianinas glicosiladas representaron aproximadamente un 2,8% del total de antocianinas monoméricas encontradas en el extracto óptimo a partir de residuos de arándano cv Legacy.

Según lo obtenido por el método ASE, en el extracto óptimo las antocianinas totales tienen un valor de  $15,76 \pm 0,16$  mg EC3G/g de residuo liofilizado, donde las cinco antocianinas glicosiladas analizadas en esta tesis representaron aproximadamente un 2,6%

del total de antocianinas monoméricas, predominando la cianidina-3-O-glucósido (0,1769 mg/ g de residuo liofilizado) con un 1,12%, seguido por petunidina-3-O-glucósido (0,1165 mg/g de residuo liofilizado) con un 0,77%, peonidina-3-O-glucósido (0,0605 mg/g de residuo liofilizado) un 0,38%, malvidina-3-O-glucósido (0,0468 mg/g de residuo liofilizado) con un 0,30%, y finalmente definidina-3-O-glucósido (0,0058 mg/g de residuo liofilizado) un 0,03%.

Al analizar el extracto obtenido por el método EAU aplicando los parámetros de extracción óptimos el valor de antocianinas totales fue igual a  $12,57 \pm 0,08$  mg EC3G/g de residuo de arándano liofilizado cv. Legacy. Según estos resultados al cotejarlos con la concentración de antocianinas individuales, cianidina-3-O-glucósido (0,2304 mg/ g de residuo liofilizado) resultó ser que predomina con un 1,8%, seguido por petunidina-3-O-glucósido (0,1136 mg/g de residuo liofilizado) con un 0,9%, malvidina-3-O-glucósido (0,0344 mg/g de residuo liofilizado) con un 0,27%, peonidina-3-O-glucósido (0,0294 mg/g de residuo liofilizado) un 0,23%, y finalmente definidina-3-O-glucósido (0,0052 mg/g de residuo liofilizado) un 0,04%. Las cinco antocianinas glicosiladas representaron aproximadamente un 3,2% del total de antocianinas monoméricas encontradas en el extracto óptimo.

Para el caso del extracto óptimo obtenido mediante el método de CO<sub>2</sub>-SC se obtuvo un valor de antocianinas totales igual a  $5,48 \pm 0,07$  mg EC3G/g de residuo de arándano cv. Legacy liofilizado. Analizando mediante HPLC la concentración de antocianinas individuales glucosiladas se tiene que representan aproximadamente un 4,7% del total de antocianinas encontradas en el extracto óptimo. Además, resulta que siguen el mismo orden decreciente que en los métodos anteriores; siendo la cianidina-3-O-glucósido (0,1374 mg/ g de residuo liofilizado) la de mayor concentración representando un 2,5% del total de antocianinas halladas por pH diferencial, seguido por petunidina-3-O-glucósido (0,06 mg/g de residuo liofilizado) con un 1,09%, malvidina-3-O-glucósido (0,0228 mg/g de residuo liofilizado) con un 0,41%, peonidina-3-O-glucósido (0,0219

mg/g de residuo liofilizado) un 0,39%, y finalmente definidina-3-O-glucósido (0,0158 mg/g de residuo liofilizado) un 0,29%.

Por lo tanto, los glucósidos de cianidina y petunidina constituyen las principales antocianinas presentes en los residuos de arándano (*Vaccinium corymbosum* cv. Legacy) dominando el perfil cromatográfico en extractos obtenidos por los cuatro métodos de extracción analizados en esta tesis.

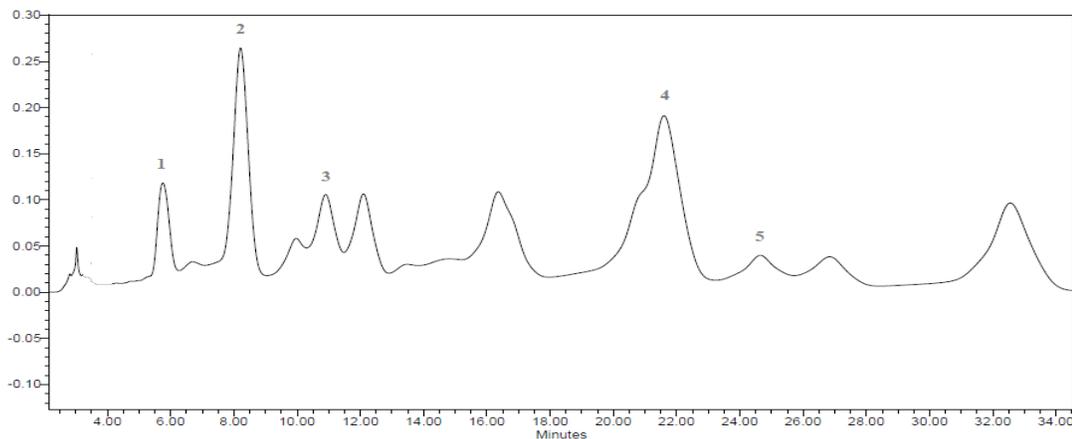
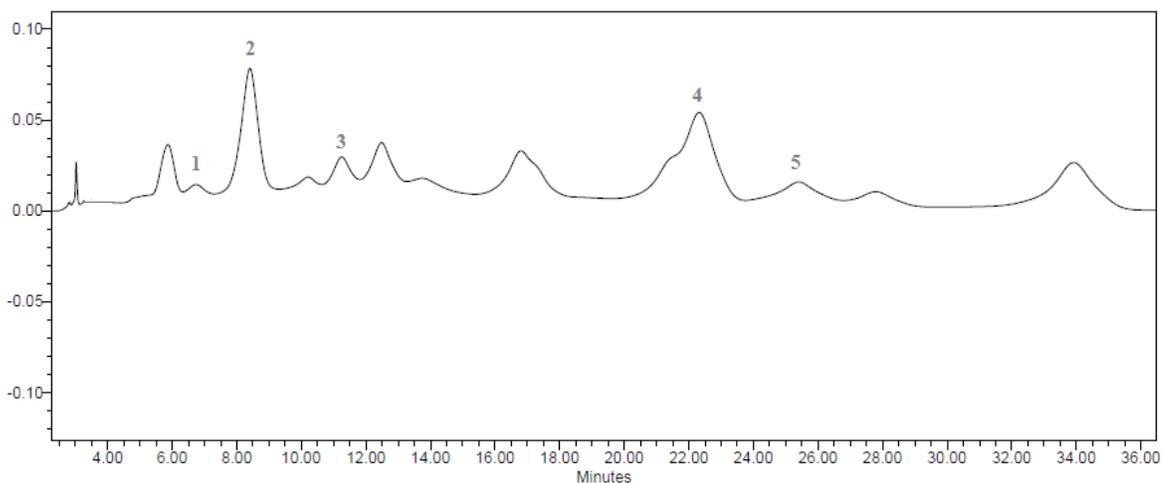
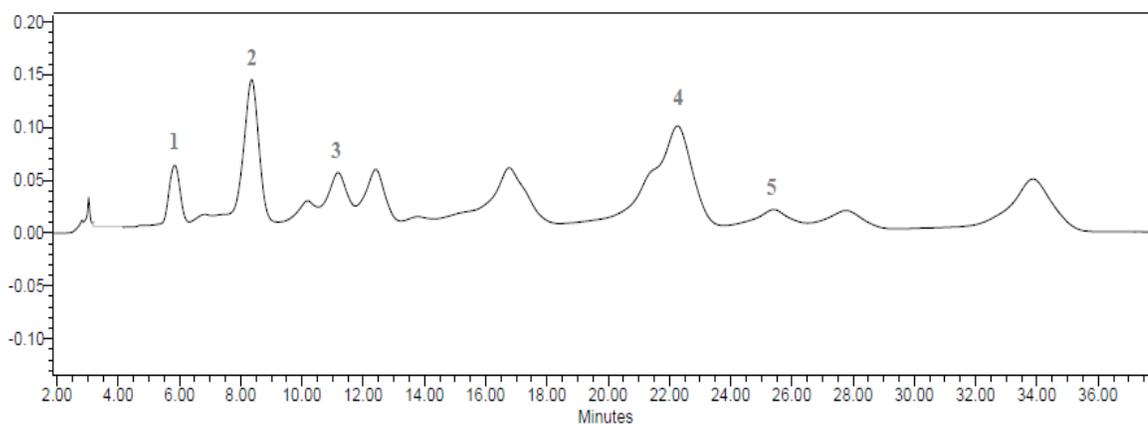


Figura 31. Perfiles de antocianinas mediante Cromatografía líquida de alta resolución equipada con un detector de fotiodo (HPLC-DAD) a residuos de arándano cv Legacy, sobre el extracto óptimo obtenido por el método convencional. Los peaks de antocianinas fueron asignados de la siguiente manera en orden de su tiempo de retención: 1= delfinidina-3-glucósido, 2=petunidina-3-glucósido, 3= peonidina-3-glucósido, 4= cianidina-3-glucósido, 5= malvidina-3-glucósido.



*Figura 32.* Perfiles de antocianinas mediante Cromatografía líquida de alta resolución equipada con un detector de fotiodo (HPLC-DAD) a residuos de arándano cv Legacy sobre el extracto óptimo obtenido por el método ASE. Los peaks de antocianinas detectadas a 520 nm fueron asignados de la siguiente manera en orden de su tiempo de retención: 1= delfinidina-3-glucósido, 2=peonidina-3-glucósido, 3= petunidina-3-glucósido, 4= cianidina-3-glucósido, 5= malvidina-3-glucósido.



*Figura 33.* Perfiles de antocianinas mediante Cromatografía líquida de alta resolución equipada con un detector de fotiodo (HPLC-DAD) a residuos de arándano cv Legacy, sobre el extracto óptimo obtenido por el método EAU. Los peaks de antocianinas detectadas a 520 nm fueron asignados de la siguiente manera en orden de su tiempo de retención: 1= delfinidina-3-glucósido, 2=petunidina-3-glucósido, 3= peonidina-3-glucósido, 4= cianidina-3-glucósido, 5= malvidina-3-glucósido.

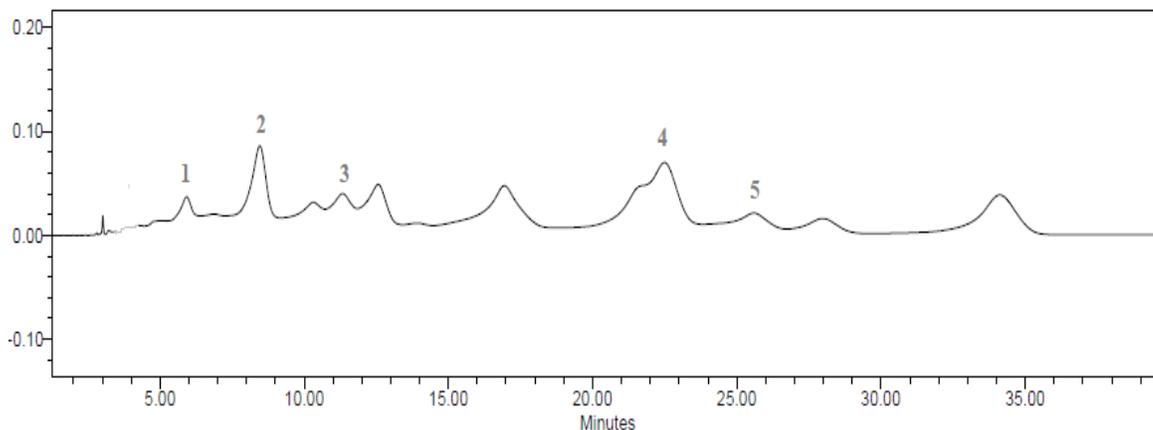


Figura 34. Perfiles de antocianinas mediante Cromatografía líquida de alta resolución equipada con un detector de fotiodio (HPLC-DAD) a residuos de arándano cv Legacy, sobre el extracto óptimo obtenido por el método CO<sub>2</sub>-SC. Los peaks de antocianinas detectadas a 520 nm fueron asignados de la siguiente manera en orden de su tiempo de retención: 1= delfinidina-3-glucósido, 2=petunidina-3-glucósido, 3= peounidina-3-glucósido, 4= cianidina-3-glucósido, 5= malvidina-3-glucósido.

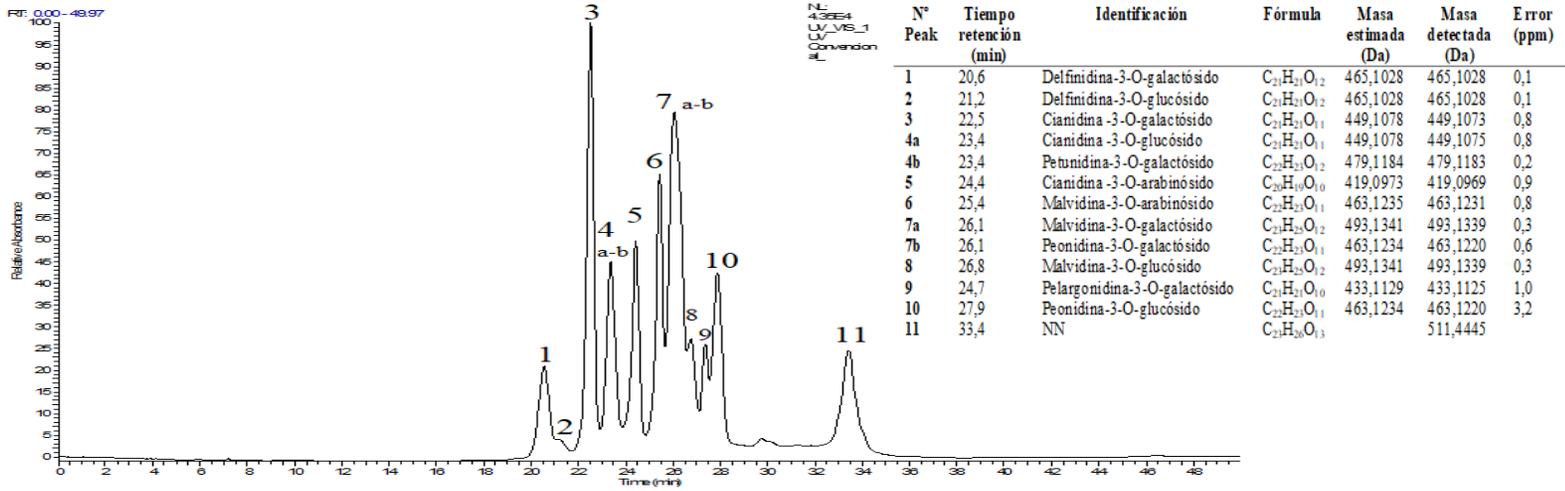
### 6.12. Identificación de antocianinas individuales en los extractos óptimos obtenidos a partir de residuos de arándano (*Vaccinium Corymbosum* cv. Legacy) por Extracción Convencional, ASE, EAU y CO<sub>2</sub>-SC analizados mediante UPLC-DAD-MS

Para caracterizar de mejor forma los extractos, además se realizó el análisis de éstos mediante HPLC-MS. Previamente, otros autores han identificado al menos 35 antocianinas en los extractos de bayas de *Vaccinium* (Zhou *et al.*, 2021). En esta tesis, se encontraron las 15 principales antocianinas y sus derivados tanto acilados como glicosilados presentes en la especie de *Vaccinium Corymbosum* (fruto entero). Similar identificación fue reportada por Barnes *et al.*, 2008. En total se identificaron 32 antocianinas (**Anexo 10**) en los extractos obtenidos por los tres métodos de extracción (Convencional, EAU y CO<sub>2</sub>-SC) aplicados a residuos de arándano cv Legacy. Para los extractos obtenidos por ASE la única antocianina no detectada en comparación con los otros fue petunidina- 3-O-(6"-acetil-galactósido) (C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>O<sub>13</sub>). Los experimentos de extracción muestran que distintos métodos de extracción podrían cambiar el perfil de antocianinas. Sin embargo, cabe destacar que en las diferentes especies de arándano se han encontrado variedad de antocianinas, así como también se evidencian diferentes

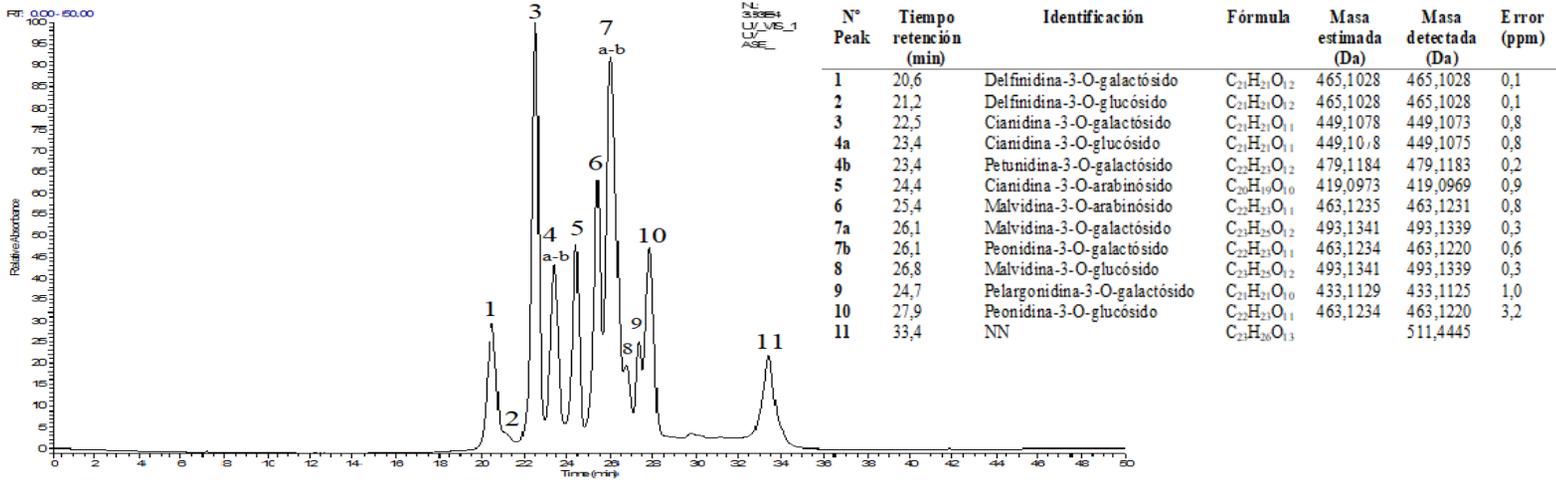
perfiles según el tipo de residuos ya que, para el caso de residuos de vino de arándano como lo reportado por He *et al.*, 2016 se identificaron únicamente 7 antocianinas extraídas por EAU y extracción convencional: delphinidina-3-O-glucósido, delphinidina-3-O-arabinósido, petunidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-arabinósido, malvidina-3-O-glucósido y malvidina-3-O-arabinósido

El perfil encontrado en este trabajo difiere con información publicada previamente por Barnes *et al.*, 2008 en cuanto no se observó la presencia de cianidina-3-O-(6"-acetil-galactósido), delphinidina-3-(6"-acetil) glucósido, cianidina-3-(6"-acetil) glucósido y quercetina-3-rutinósido. Es interesante mencionar que, casi no hay presencia de pelargonidina o no se libera en la ionización, esto ocurre aplicando los cuatro métodos de extracción. Además, en los cromatogramas (**Figura 35**) se pueden observar algunas diferencias en las señales obtenidas, lo cual demuestra que, los perfiles de antocianinas podrían variar según el tipo de metodología utilizada para la extracción principalmente en cuanto a la cuantificación demostrado anteriormente en el análisis de antocianinas individuales glucosiladas mediante HPLC.

a)



b)



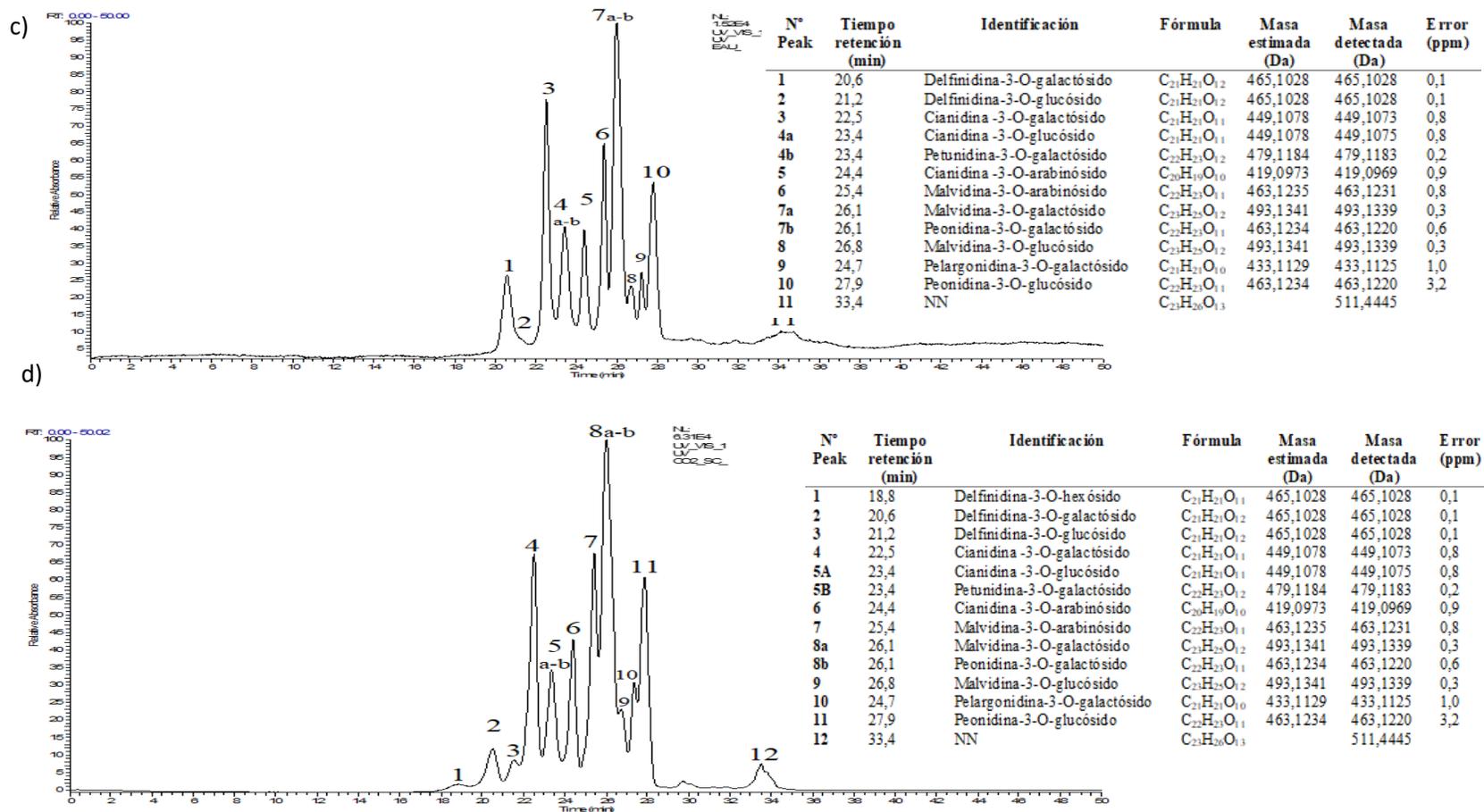


Figura 35. Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento equipada con un fotodiodo junto con espectrometría de masas de ionización por electrospray con detector de matriz de diodos (UPLC-DAD-MS) de antocianinas de residuos de arándano (*Vaccinium Corymbosum* cv Legacy). Cromatogramas de iones totales extraídos: a) Extracto óptimo Convencional, b) Extracto óptimo ASE, c) Extracto óptimo EAU, d) Extracto óptimo CO<sub>2</sub>-SC. Los peaks de antocianina fueron: Pelargonidina (m/z: 271,0601), Cianidina (m/z: 287,0545), Peonidina (m/z: 301,0705), Delfinidina (m/z: 303,0497), Petunidina (m/z: 317,0655), 6= Malvidina (m/z: 331,0809)

## VII. CONCLUSIONES

- En la extracción convencional los factores que tuvieron influencia significativa para la extracción de polifenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante fueron la temperatura y la concentración de solvente. Esto da cuenta de la mayor velocidad de difusión y mejoramiento de la transferencia de masas por efecto de la temperatura y máxima eficiencia de extracción por la adición de etanol a la mezcla de solventes.
- En la extracción por ASE, tanto la concentración de solvente como el número de ciclos estáticos fueron los factores significativamente influyentes en el proceso de extracción de antocianinas totales, polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos. Estos factores favorecen los procesos de reacción y mejoran la difusión de los analitos en el fluido de extracción, lo cual lleva a una mayor concentración de los compuestos de interés en los extractos.
- En la extracción por ultrasonido, para maximizar la obtención de antocianinas totales, polifenoles totales y capacidad antioxidante, los factores que influyeron significativamente en el proceso fueron; la concentración de solvente y la amplitud. En específico, la combinación de 58 %v/v y una amplitud del 90 % permiten maximizar la solubilidad de compuestos fenólicos lo que estaría causado por el solvente y como producto de la amplitud se mejoraría la cavitación y por ende una mayor extracción.
- En la extracción con CO<sub>2</sub>-SC, el uso de un 10 % de etanol como cosolvente resultó en obtención de la máxima concentración de antocianinas totales, polifenoles totales y capacidad antioxidante. Este factor fue significativo debido a que generaría fuerzas intermoleculares -enlaces de hidrógeno- que favorecerían la extracción de compuestos de naturaleza polar como las antocianinas.
- La optimización múltiple de cada proceso de extracción permitió maximizar el contenido de antocianinas totales, polifenoles totales y la capacidad antioxidante,

encontrándose mayores contenidos en el caso de ASE, proyectando a esta tecnología como una alternativa viable para futuros estudios de escalamiento.

- La proporción relativa de antocianinas en los extractos depende de la tecnología de extracción. En el extracto convencional cianidina 3-O-glucósido representó un aproximadamente el 56,7%, en el extracto ASE un 43,5%, en el extracto EAU un 55,7% y en el extracto de CO<sub>2</sub>-SC un 53,2%. La segunda antocianina con mayor presencia fue la petunidina 3-O-glucósido con una distribución relativa de 27,8% en el extracto convencional, 28,6% en el extracto ASE, 27,5% en el extracto EAU y 23,2% en el extracto CO<sub>2</sub>-SC. Las siguientes antocianinas fueron la malvidina 3-O-glucósido y peonidina 3-O-glucósido con una distribución relativa de 7,8% y 7,1% en el extracto convencional, 11,5% y 14,8% en el extracto ASE, 8,33% y 7,12% en el extracto EAU y 8,84% y 8,49% en el extracto CO<sub>2</sub>-SC. A continuación, le siguen, delphinidina 3-O-glucósido con una distribución relativa de 0,46% en el extracto convencional, 1,42% en el extracto ASE, 1,25% en el extracto EAU y 6,12% en el extracto CO<sub>2</sub>-SC.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aaby, K., Grimmer, S., y Holtung, L. (2013). Extraction of phenolic compounds from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) press residue: Effects on phenolic composition and cell proliferation. *LWT - Food Science and Technology*, 54(1), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.031>
- Aldaba Marquez, J., Concha Herrera, V., Enciso Muñoz, V. del C., y Carranza Concha, J. (2016). FUNCIONALIDAD DEL ARÁNDANO AZUL (*Vaccinium corymbosum* L.). *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 423–428. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/3/73.pdf>
- Aliaño-González, M. J., Jarillo, J. A., Carrera, C., Ferreiro-González, M., Álvarez, J. Á., Palma, M., Ayuso, J., Barbero, G. F., y Espada-Bellido, E. (2020). Optimization of a novel method based on ultrasound-assisted extraction for the quantification of anthocyanins and total phenolic compounds in blueberry samples (*Vaccinium corymbosum* l.). *Foods*, 9(12), 1–20. <https://doi.org/10.3390/foods9121763>
- Avram, A. M., Morin, P., Brownmiller, C., Howard, L. R., Sengupta, A., y Wickramasinghe, S. R. (2017). Concentrations of polyphenols from blueberry pomace extract using nanofiltration. *Food and Bioproducts Processing*, 106, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.07.006>
- Babova, O., Occhipinti, A., Capuzzo, A., y Maffei, M. E. (2016). Extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) antioxidants using supercritical/subcritical CO<sub>2</sub> and ethanol as co-solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 107, 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.029>
- BAKOWSKA-BARCZAK, A. (2005). Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants : A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(2), 107–116.
- Bamba, B. S. B., Shi, J., Tranchant, C. C., Xue, S. J., Forney, C. F., y Lim, L. T. (2018). Influence of extraction conditions on ultrasound-assisted recovery of bioactive phenolics from blueberry pomace and their antioxidant activity. *Molecules*, 23(7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules23071685>

- Bener, M., Shen, Y., Apak, R., Finley, J. W., y Xu, Z. (2013). Release and degradation of anthocyanins and phenolics from blueberry pomace during thermal acid hydrolysis and dry heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(27), 6643–6649. <https://doi.org/10.1021/jf401983c>
- Bittencourt, L. L. de A., Silva, K. A., de Sousa, V. P., Fontes-Sant’Ana, G. C., y Rocha-Leão, M. H. (2018). Blueberry Residue Encapsulation by Iontropic Gelation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(4), 278–286. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0685-y>
- Bustamante, A., Masson, L., Velasco, J., Del Valle, J. M., y Robert, P. (2016). Microencapsulation of *H. pluvialis* oleoresins with different fatty acid composition: Kinetic stability of astaxanthin and alpha-tocopherol. *Food Chemistry*, 190, 1013–1021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.062>
- Calabuig-Jiménez, L., Hinestroza-Córdoba, L. I., Barrera, C., Seguí, L., y Betoret, N. (2022). Effects of Processing and Storage Conditions on Functional Properties of Powdered Blueberry Pomace. *Sustainability*, 14(3), 1839. <https://doi.org/10.3390/su14031839>
- Castagnini, J. M. (2014). *Estudio del proceso de obtención de zumo de arándanos y su utilización como ingrediente para la obtención de un alimento funcional por impregnación a vacío*. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/38988>
- CASTAGNINI, J. M. (2014). *Estudio del proceso de obtención de zumo de arándanos y su utilización como ingrediente para la obtención de un alimento funcional por impregnación a vacío*. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/38988>
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., y Meireles, M. A. A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. In *Food Research International* (Vol. 44, Issue 2, pp. 499–509). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.007>
- Cervantes Ceja, M. L. (2009). *Potencial Nutracéutico de cultivos de Arándanos (Vaccinium sp.) seleccionados en México*. 40–76. [https://www.blueberriesconsulting.com/subidas/2015/09/pdf\\_310.pdf?fbclid=IwAR](https://www.blueberriesconsulting.com/subidas/2015/09/pdf_310.pdf?fbclid=IwAR)

3JQpSoiOIr-E2HhH651AeO-bUFzRKctnsVhh0HnDzmBikSkWrYtDs3h4

- Cheok, C. Y., Chin, N. L., Yusof, Y. A., y Law, C. L. (2012). Extraction of Total Phenolic Content from *Garcinia mangostana* Linn. hull. I. Effects of Solvents and UV-Vis Spectrophotometer Absorbance Method. *Food and Bioprocess Technology*, 5(7), 2928–2933. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0627-2>
- Coronado H., M., Vega Y León, S., Gutiérrez T., R., Marcela, V. F., y Radilla V., C. (2015). Antioxidantes: Perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutricion*, 42(2), 206–212. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Ćujić-Nikolić, N., Stanisavljević, N., Šavikin, K., Kalušević, A., Nedović, V., Samardžić, J., y Janković, T. (2019). Chokeberry polyphenols preservation using spray drying: effect of encapsulation using maltodextrin and skimmed milk on their recovery following in vitro digestion. *Journal of Microencapsulation*, 36(8), 693–703. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1667448>
- Cury R, K., Aguas M, Y., Martinez M, A., Olivero V, R., y Chams Ch, L. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 9(S), 122. <https://doi.org/10.24188/recia.v9.ns.2017.530>
- Dai, J., Gupte, A., Gates, L., y Mumper, R. J. (2009). A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 47(4), 837–847. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.016>
- DEMIRCI, M., TOMAS, M., TEKIN-ÇAKMAK, Z. H., y KARASU, S. (2021). *Berberis crataegina* DC. as a novel natural food colorant source: ultrasound-assisted extraction optimization using response surface methodology and thermal stability studies. *Food Science and Technology*, 2061, 1–8. <https://doi.org/10.1590/fst.13421>
- Deng, Y., Yang, G., Yue, J., Qian, B., Liu, Z., Wang, D., Zhong, Y., y Zhao, Y. (2014). Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. *Food Control*, 38(1), 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.023>
- Di Donato, P., Taurisano, V., Tommonaro, G., Pasquale, V., Jiménez, J. M. S., de Pascual-

- Teresa, S., Poli, A., y Nicolaus, B. (2018). Biological Properties of Polyphenols Extracts from Agro Industry's Wastes. *Waste and Biomass Valorization*, 9(9), 1567–1578. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9939-4>
- Diez-Sánchez, E., Quiles, A., y Hernando, I. (2021). Use of Berry Pomace to Design Functional Foods. *Food Reviews International*, 00(00), 1–21. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2010217>
- Extraction, I. A. (2019). *and Individual Anthocyanin Extraction from Blueberry Pomace : Optimization.*
- Francis, F. J., y Markakis, P. C. (1989). Critical Reviews in Food Science and Nutrition Food colorants : Anthocyanins. In *Food Science and Nutrition* (Vol. 28, Issue 4). <https://doi.org/10.1080/10408398909527503>
- GAO, L., y MAZZA, G. (1994). Quantitation and Distribution of Simple and Acylated Anthocyanins and Other Phenolics in Blueberries. *Journal of Food Science*, 59(5), 1057–1059. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08189.x>
- Garcia-Mendoza, M. del P., Espinosa-Pardo, F. A., Baseggio, A. M., Barbero, G. F., Maróstica Junior, M. R., Rostagno, M. A., y Martínez, J. (2017). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. *Journal of Supercritical Fluids*, 119, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.014>
- Giovanelli, G., y Buratti, S. (2009). Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry*, 112(4), 903–908. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.066>
- He, B., Zhang, L. L., Yue, X. Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X. L., y Yue, P. X. (2016). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, 204, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.094>
- Heffels, P., Weber, F., y Schieber, A. (2015). Influence of Accelerated Solvent Extraction and Ultrasound-Assisted Extraction on the Anthocyanin Profile of Different *Vaccinium* Species in the Context of Statistical Models for Authentication. *Journal*

- of Agricultural and Food Chemistry*, 63(34), 7532–7538.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02255>
- Heras, I., Alvis, A., y Arrazola, G. (2013). Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (Solana melonera L.). *Informacion Tecnologica*, 24(5), 93–102.  
<https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000500011>
- Hernández-Carlos, B., Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., y Cecilia Guadarrama-Mendoza, P. (2019). Antioxidant Compounds from Agro-Industrial Residue. *Antioxidants*, i, 1–22.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.85184>
- Hidalgo, G.-I., y Almajano, M. (2017). Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination: A Review. *Antioxidants*, 6(1), 7.  
<https://doi.org/10.3390/antiox6010007>
- Holtung, L., Grimmer, S., y Aaby, K. (2011). Effect of processing of black currant press-residue on polyphenol composition and cell proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3632–3640. <https://doi.org/10.1021/jf104427r>
- ICHIYANAGI, T., OIKAWA, K., TATEYAMA, C., y KONISHI, T. (2002). Acid Mediated Hydrolysis of Blueberry Anthocyanins. *Chemical y Pharmaceutical Bulletin*, 49(1), 114–117. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.114>
- Jara-Palacios, M. J., Santisteban, A., Gordillo, B., Hernanz, D., Heredia, F. J., y Escudero-Gilete, M. L. (2019). Comparative study of red berry pomaces (blueberry, red raspberry, red currant and blackberry) as source of antioxidants and pigments. *European Food Research and Technology*, 245(1), 1–9.  
<https://doi.org/10.1007/s00217-018-3135-z>
- Jaramillo, A. C., Echavarría, A. M., y Hormaza, A. (2013). Diseño Box-Behnken para la optimización de la adsorción del colorante azul ácido sobre residuos de flores. *Ingeniería y Ciencia*, 9(18), 75–91. <https://doi.org/10.17230/ingciecia.9.18.4>
- Kähkönen, M. P., y Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 628–633.

<https://doi.org/10.1021/jf025551i>

- Kelly, E. H., Dennis, J. B., y Anthony, R. T. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Kitrytė, V., Kavaliauskaitė, A., Tamkutė, L., Pukalskienė, M., Syrpas, M., y Rimantas Venskutonis, P. (2020). Zero waste biorefining of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) pomace into functional ingredients by consecutive high pressure and enzyme assisted extractions with green solvents. *Food Chemistry*, 322, 126767. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126767>
- Klavins, L., Kvisiis, J., y Klavins, M. (2017). Comparison of methods of extraction of phenolic compounds from american cranberry (*Vaccinium macrocarpon* L.) press residues. *Agronomy Research*, 15(Special Issue 2), 1316–1329.
- Klavins, Linards, Kvisiis, J., Nakurte, I., y Klavins, M. (2018). Berry press residues as a valuable source of polyphenolics: Extraction optimisation and analysis. *Lwt*, 93(February), 583–591. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.021>
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., y Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923–933. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00438-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00438-2)
- Kurek, M., Garofulić, I. E., Bakić, M. T., Ščetar, M., Uzelac, V. D., y Galić, K. (2018). Development and evaluation of a novel antioxidant and pH indicator film based on chitosan and food waste sources of antioxidants. *Food Hydrocolloids*, 84, 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.050>
- Laroze, L. E., Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Zúñiga, M. E., y Domínguez, H. (2010). Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. *European Food Research and Technology*, 231(5), 669–677. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1320-9>
- Lee, J., y Wrolstad, R. (2004). C: Food Chemistry and Toxicology Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics. *Journal of Food Science*, 69(7).
- Lee, J., y Wrolstad, R. E. (2010). Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from

- Blueberry Processing Waste. *Journal of Food Science*, 69(7), 564–573.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13651.x>
- Li, D., Meng, X., y Li, B. (2016). Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 47, 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.09.005>
- Lizcano, S. C., Dávila, J. A., y Hernández, V. (2019). Fruit Agroindustrial Wastes for Preparing Beverages for Medicinal Purposes by Supercritical Fluid Extraction Technology: Andes Berry (*Rubus glaucus benth*) Case. In *Production and Management of Beverages* (pp. 151–177). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815260-7.00005-5>
- López-Padilla, A., Ruiz-Rodriguez, A., Flórez, C. E. R., Barrios, D. M. R., Reglero, G., y Fornari, T. (2016). *Vaccinium meridionale* Swartz supercritical CO<sub>2</sub> extraction: Effect of process conditions and scaling up. *Materials*, 9(7).  
<https://doi.org/10.3390/ma9070519>
- Luchese, C. L., Abdalla, V. F., Spada, J. C., y Tessaro, I. C. (2018). Evaluation of blueberry residue incorporated cassava starch film as pH indicator in different simulants and foodstuffs. *Food Hydrocolloids*, 82, 209–218.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.010>
- Luchese, C. L., Garrido, T., Spada, J. C., Tessaro, I. C., y de la Caba, K. (2018). Development and characterization of cassava starch films incorporated with blueberry pomace. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 834–839. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.083>
- Machado, A. P. D. F., Pereira, A. L. D., Barbero, G. F., y Martínez, J. (2017). Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. *Food Chemistry*, 231, 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.060>
- Mayer-Miebach, E., Adamiuk, M., y Behsnilian, D. (2012). Stability of chokeberry

- bioactive polyphenols during juice processing and stabilization of a polyphenol-rich material from the by-product. *Agriculture (Switzerland)*, 2(3), 244–258. <https://doi.org/10.3390/agriculture2030244>
- Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T., y Holub, B. J. (2002). Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26), 7731–7737. <https://doi.org/10.1021/jf020690l>
- Meléndez-Jácome, M. R., Flor-Romero, L. E., Sandoval-Pacheco, M. E., Vasquez-Castillo, W. A., y Racines-Oliva, M. A. (2021). *Vaccinium* spp.: Karyotypic and phylogenetic characteristics, nutritional composition, edaphoclimatic conditions, biotic factors and beneficial microorganisms in the rhizosphere. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 109–120. <https://doi.org/10.17268/SCIAGROPECU.2021.013>
- Mi, J. C., Howard, L. R., Prior, R. L., y Clark, J. R. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(13), 1771–1782. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1885>
- Mohamed, K., Gibriel, A. Y., Rasmy, N. M. H., y Abu-salem, F. M. (2016). *Extraction of anthocyanin pigments from*. 61(3), 1–11.
- Mulinacci, N., y Innocenti, M. (2012). Anthocyanins and betalains. *Food Analysis by HPLC, Third Edition*, 757–775. <https://doi.org/10.1201/b13024>
- ODEPA (2016) Evaluación de la superficie frutícola por región oficina de estudio y políticas agrarias (ODEPA), (<http://www.odepa.gob.cl/estadísticas-del-sector/estadísticas-productivas>). Acceso: 01/05/2022.
- Oliveira, G., Eliasson, L., Ehrnell, M., Höglund, E., Andlid, T., y Alminger, M. (2019). Tailoring bilberry powder functionality through processing: Effects of drying and fractionation on the stability of total polyphenols and anthocyanins. *Food Science and Nutrition*, 7(3), 1017–1026. <https://doi.org/10.1002/fsn3.930>

- Paes, J., Dotta, R., Barbero, G. F., y Martínez, J. (2014). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized liquids. *Journal of Supercritical Fluids*, 95, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.025>
- Paes, J., Dotta, R., y Martínez, J. (2013). *EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM BLUEBERRY (Vaccinium myrtillus L.) RESIDUES USING SUPERCRITICAL CO<sub>2</sub> and PRESSURIZED WATER.*
- Panicker, G. K., Sims, C. A., Silva, J. L., Matta, F. B., y Spiers, J. M. (2009). Effect of worm castings, cow manure, and forest waste on yield and fruit quality of organic blueberries grown on a heavy soil. *Acta Horticulturae*, 841, 581–584. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.841.88>
- Patil, G., Madhusudhan, M. C., Ravindra Babu, B., y Raghavarao, K. S. M. S. (2009). Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(1), 364–369. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2008.05.006>
- Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Rodrigues, D., Da Cruz, P. N., Hermosín-Gutiérrez, I., Smith, R., y Godoy, H. T. (2014). Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. *Food Chemistry*, 164, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.114>
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., Bourvellec, C. Le, Renard, C. M. G. C., y Chemat, F. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.026>
- Prior, R. L., y Wu, X. (2006). Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, 40(10), 1014–1028. <https://doi.org/10.1080/10715760600758522>
- Rein, M., y (Yliopistopaino). (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. University of Helsinki.
- Reque, P. M., Steffens, R. S., Silva, A. M. Da, Jablonski, A., Flôres, S. H., Rios, A. de O.,

- y Jong, E. V. De. (2015). Characterization of blueberry fruits (*Vaccinium* spp.) and derived products. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(4), 773–779. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.6470>
- Rezende, Y. R. R. S., Nogueira, J. P., y Narain, N. (2017). Comparison and optimization of conventional and ultrasound assisted extraction for bioactive compounds and antioxidant activity from agro-industrial acerola (*Malpighia emarginata* DC) residue. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.020>
- Ribera, A. E., Reyes-Díaz, M., Alberdi, M., Zuñiga, G. E., y Mora, M. L. (2010). Antioxidant compounds in skin and pulp of fruits change among genotypes and maturity stages in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in southern Chile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(4), 509–536. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000200010>
- Román Páez, M. A., Rivera Narváez, C. M., Cardona Bermúdez, L. M., Muñoz, L. M., Gómez, D. D., Passaro Carvalho, C., y Quiceno Rico, J. M. (2016). *Guía de extracción por fluidos supercríticos: Fundamentos y aplicaciones*.
- Ross, K. A., Ehret, D., Godfrey, D., Fukumoto, L., y Diarra, M. (2017). Characterization of Pilot Scale Processed Canadian Organic Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) and Blueberry (*Vaccinium angustifolium*) Juice Pressing Residues and Phenolic-Enriched Extractives. *International Journal of Fruit Science*, 17(2), 202–232. <https://doi.org/10.1080/15538362.2017.1285264>
- Salaheen, S., Nguyen, C., Hewes, D., y Biswas, D. (2014). Cheap extraction of antibacterial compounds of berry pomace and their mode of action against the pathogen *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, 46, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.026>
- Silva, S., Costa, E. M., Calhau, C., Morais, R. M., y Pintado, M. E. (2017a). Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), 3072–3083. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1087963>
- Silva, S., Costa, E. M., Calhau, C., Morais, R. M., y Pintado, M. E. (2017b). Anthocyanin

- extraction from plant tissues: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), 3072–3083. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1087963>
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., y Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 10, pp. 24673–24706). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
- Stevenson, D., y Scalzo, J. (2012). Anthocyanin composition and content of blueberries from around the world. In *Journal of Berry Research* (Vol. 2, Issue 4, pp. 179–189). <https://doi.org/10.3233/JBR-2012-038>
- Struck, S., Plaza, M., Turner, C., y Rohm, H. (2016). Berry pomace - A review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(6), 1305–1318. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13112>
- Su, M. S., y Chien, P. J. (2007). Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chemistry*, 104(1), 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.021>
- Su, M. S., y Silva, J. L. (2006). Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) by-products as affected by fermentation. *Food Chemistry*, 97(3), 447–451. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.023>
- Tagliani, C., Perez, C., Curutchet, A., Arcia, P., y Cozzano, S. (2019). Blueberry pomace, valorization of an industry by-product source of fibre with antioxidant capacity. *Food Science and Technology*, 39(3), 644–651. <https://doi.org/10.1590/fst.00318>
- Tamkutė, L., Pukalskas, A., Syrpas, M., Urbonavičienė, D., Viškelis, P., y Venskutonis, P. R. (2020). Fractionation of cranberry pomace lipids by supercritical carbon dioxide extraction and on-line separation of extracts at low temperatures. *Journal of Supercritical Fluids*, 163. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104884>
- Van Acker, S. A. B. E., De Groot, M. J., Van Berg, D. J. Den, Tromp, M. N. J. L., Kelder, G. D. O. Den, Van Der Vijgh, W. J. F., y Bast, A. (1996). A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chemical Research in Toxicology*, 9(8), 1305–1312. <https://doi.org/10.1021/tx9600964>

- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., y Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*vaccinium floribundum* kunth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8274–8281. <https://doi.org/10.1021/jf9013586>
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., y Oomah, B. D. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4113–4117. <https://doi.org/10.1021/jf9801973>
- Vilkickyte, G., Motiekaityte, V., Vainoriene, R., Liaudanskas, M., y Raudone, L. (2021). Development, validation, and application of UPLC-PDA method for anthocyanins profiling in *Vaccinium* L. berries. *Journal of Berry Research*, 11(4), 583–599. <https://doi.org/10.3233/JBR-200658>
- Vold, M., Aleš, Ř. I. C. H., y Esra, R. (2013). *Jfmr20134P\_3*. 52(4), 219–229.
- Wang, W., Jung, J., Tomasino, E., y Zhao, Y. (2016). Optimization of solvent and ultrasound-assisted extraction for different anthocyanin rich fruit and their effects on anthocyanin compositions. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.041>
- Waterhouse, G. I. N., Sun-Waterhouse, D., Su, G., Zhao, H., y Zhao, M. (2017). Spray-Drying of Antioxidant-Rich Blueberry Waste Extracts; Interplay Between Waste Pretreatments and Spray-Drying Process. *Food and Bioprocess Technology*, 10(6), 1074–1092. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1880-9>
- Wrolstad, R. E. (2010). Anthocyanin Pigments-Bioactivity and Coloring Properties. *Journal of Food Science*, 69(5), C419–C425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10709.x>
- Xue, H., Tan, J., Li, Q., Tang, J., y Cai, X. (2020). Ultrasound-Assisted Deep Eutectic Solvent Extraction of Anthocyanins from Blueberry Wine Residues: Optimization, Identification, and HepG2 Antitumor Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22). <https://doi.org/10.3390/molecules25225456>
- Yaguas, O. J. (2017). Response surface methodology for optimization of an agricultural

- production. *Revista Ingeniería Industrial*, 16(1), 205–222.
- Yang, S., Wang, C., Li, X., Wu, C., Liu, C., Xue, Z., y Kou, X. (2021). Investigation on the biological activity of anthocyanins and polyphenols in blueberry. *Journal of Food Science*, 86(2), 614–627. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15598>
- Zapata, L., Carcel, J., y Clemente, G. (2014). *Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria.* 25–45. <http://www.blueberrieschile.cl/wp-content/uploads/2016/05/obtenciondeextracto.pdf>
- Zapata, L., Heredia, A., Quinteros, C., Malleret, A., Clemente, G., y Cárcel, J. (2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia Docencia y Tecnología*, 25, 166–192.
- Zapata, L. M. ;, Heredia, A. M. ;, Quinteros, C. F. ;, Malleret, A. D. ;, Clemente, G. ;, y Cárcel, J. A. (n.d.). *CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES investigación Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos.* 166–192. <http://www.scielo.org.ar/pdf/cdyt/n49/n49a08.pdf>
- Zhang, H., Tchabo, W., y Ma, Y. (2017). Quality of extracts from blueberry pomace by high hydrostatic pressure, ultrasonic, microwave and heating extraction: A comparison study. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(10), 815–819. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2017.v29.i10.1259>
- Zhao, C. L., Chen, Z. J., Bai, X. S., Ding, C., Long, T. J., Wei, F. G., y Miao, K. R. (2014). Structure-activity relationships of anthocyanidin glycosylation. *Molecular Diversity*, 18(3), 687–700. <https://doi.org/10.1007/s11030-014-9520-z>
- Zhao, C. L., Yu, Y. Q., Chen, Z. J., Wen, G. S., Wei, F. G., Zheng, Q., Wang, C. De, y Xiao, X. L. (2017). Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chemistry*, 214, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.073>
- Zhou, Y., Long, S., Xu, Q., Yan, C., Yang, J., y Zhou, Y. (2021). Optimization and application of HPLC for simultaneous separation of six well-known major anthocyanins in blueberry. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 51(10), 961–970. <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1881906>

## IX. ANEXOS

### Anexo 1.

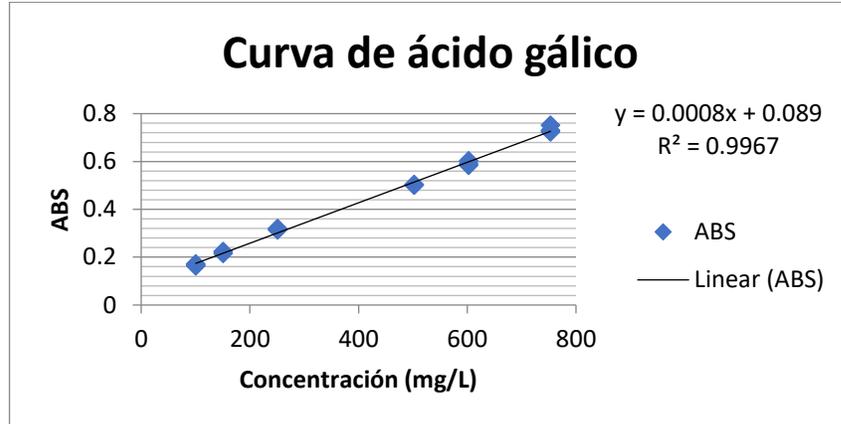


Figura 36. Curva de Calibración para el cálculo de polifenoles totales.

### Anexo 2.

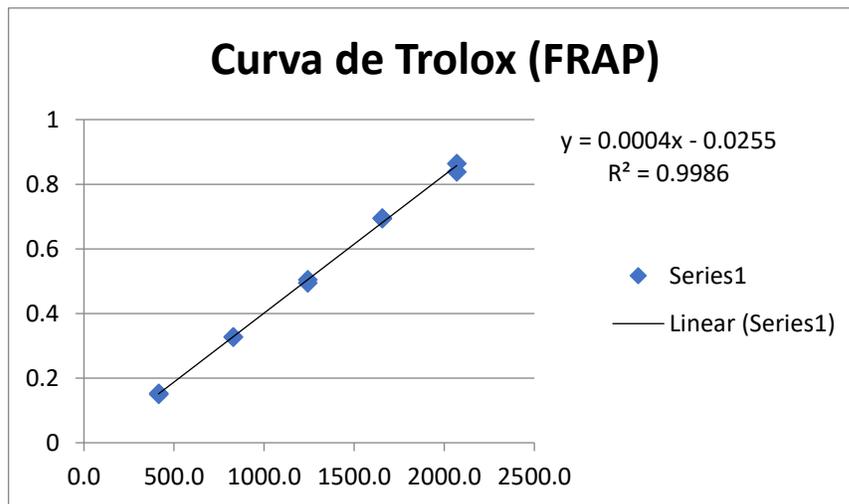


Figura 37. Curva de calibración para el cálculo de capacidad antioxidante por metodología FRAP.

### Anexo 3.

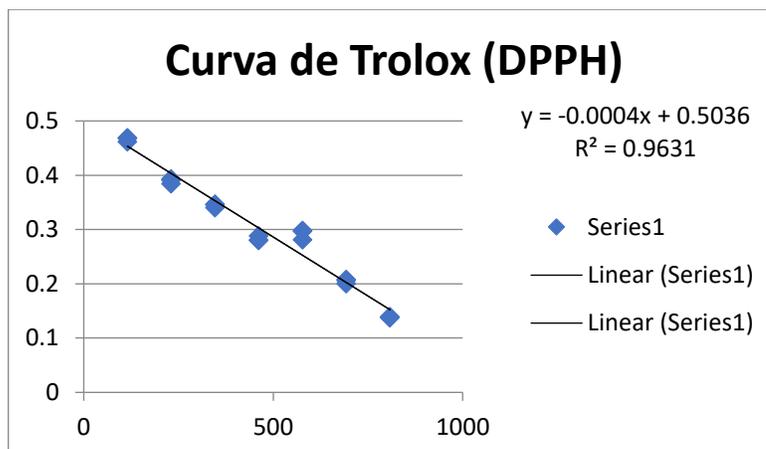


Figura 38. Curva de calibración para el análisis de la capacidad antioxidante mediante la metodología de DPPH.

### Anexo 4.

#### Extracción Convencional a partir de residuos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* cv. Legacy)

**Tabla 1.** Sólidos Solubles en los extractos obtenidos con Extracción Convencional

Exp.	Tiempo (min)	Etanol (% v/v)	Temperatura (°C)	Sólidos Solubles (°Brix)
1	120	75	60	20,90±0,28
2	90	100	60	19,05±0,07
3	60	100	40	20,40±0,00
4	60	75	60	20,95±0,35
5	90	75	40	21,35±0,07
6	60	75	20	21,05±0,07
7	120	100	40	21,35±0,07
8	90	50	20	19,80±0,00
9	90	75	40	20,95±0,21
10	120	75	20	20,40±0,28

	<b>11</b>	90	75	40	20,90±0,14	
	<b>12</b>	90	100	20	18,65±0,07	
	<b>13</b>	60	50	40	18,65±0,21	
	<b>14</b>	120	50	40	18,55±0,07	
Resultados	<b>15</b>	90	50	60	18,85±0,07	presentados como

promedio ± desviación estándar.

#### 4.1. Polifenoles Totales

##### Análisis de Varianza para Polifenoles Totales mg EAG/g de residuo liofilizado

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	957.031	1	957.031	240.58	0.0001
B: Temperatura (°C)	145.255	1	145.255	36.51	0.0038
C: Tiempo (min)	1.96021	1	1.96021	0.49	0.5214
AA	12.9948	1	12.9948	3.27	0.1450
AB	3.8025	1	3.8025	0.96	0.3836
AC	0.01	1	0.01	0.00	0.9624
BB	3.03762	1	3.03762	0.76	0.4315
BC	2.25781	1	2.25781	0.57	0.4931
CC	6.47168	1	6.47168	1.63	0.2712
Error total	15.9119	4	3.97797		
Total (corr.)	1191.89	13			

R-cuadrada = 98.665 %

Diagrama de Pareto Estandarizada para Polifenoles Totales mg EAG/g

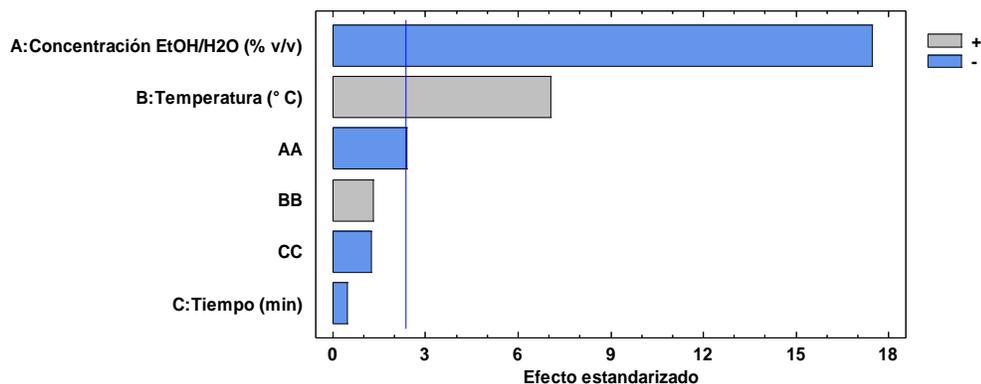


Figura 39. Diagrama de Pareto Estandarizada para Polifenoles Totales

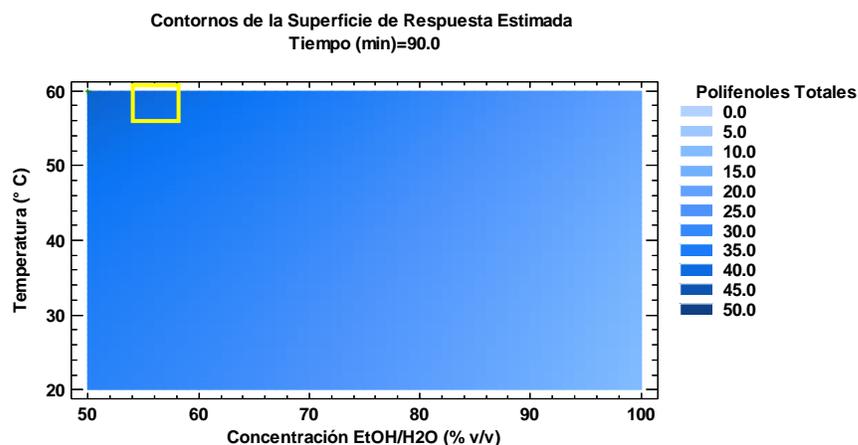


Figura 40. La combinación de Temperatura moderada y concentración de etanol intermedio muestra como resultado una mayor concentración de polifenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con Extracción Convencional.

## 4.2. Antocianinas Totales

### Análisis de Varianza para Antocianinas Totales mg EC3G/g de residuo liofilizado

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	8.41936	1	8.41936	8.43	0.0198
B: Temperatura (°C)	1.99362	1	1.99362	2.00	0.1954
C: Tiempo (min)	0.497384	1	0.497384	0.50	0.5004
AA	3.59379	1	3.59379	3.60	0.0944
AB	6.85131	1	6.85131	6.86	0.0307
Error total	7.98786	8	0.998482		
Total (corr.)	30.2308	13			

R-cuadrada = 73.5771 %

Diagrama de Pareto Estandarizada para Antocianinas Totales mg EC3G/g

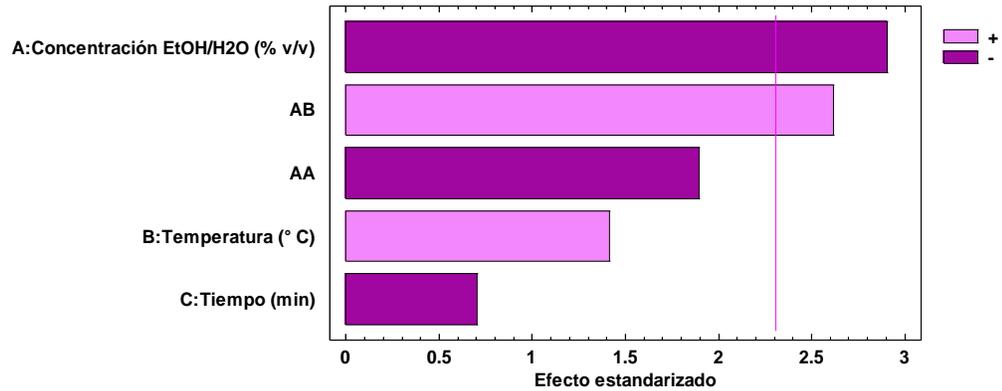


Figura 41. Diagrama de Pareto Estandarizada para Antocianinas Totales.

Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada  
Tiempo (min)=90.0

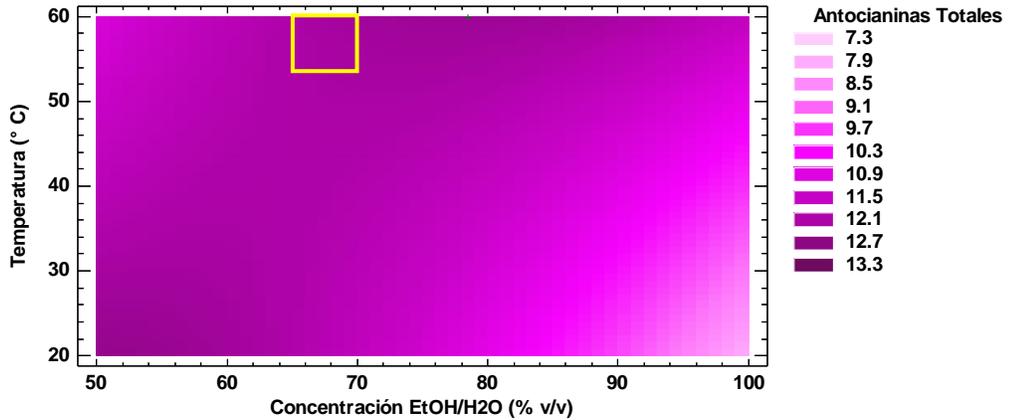


Figura 42. La interacción entre temperatura y concentración de etanol muestra como resultado una mayor concentración de Antocianinas Totales (mg equivalentes de cianidin-3 glucósido / g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con Extracción Convencional

### 4.3.FRAP

#### Análisis de Varianza para FRAP (umol ET/g)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	23742.4	1	23742.4	552.79	0.0000
B: Temperatura (°C)	3293.81	1	3293.81	76.69	0.0001
C: Tiempo (min)	2.08748	1	2.08748	0.05	0.8318
AA	870.153	1	870.153	20.26	0.0028

AC	72.7609	1	72.7609	1.69	0.2343
CC	315.977	1	315.977	7.36	0.0301
Error total	300.65	7	42.95		
Total (corr.)	29011.9	13			

R-cuadrado = 98.9637 %

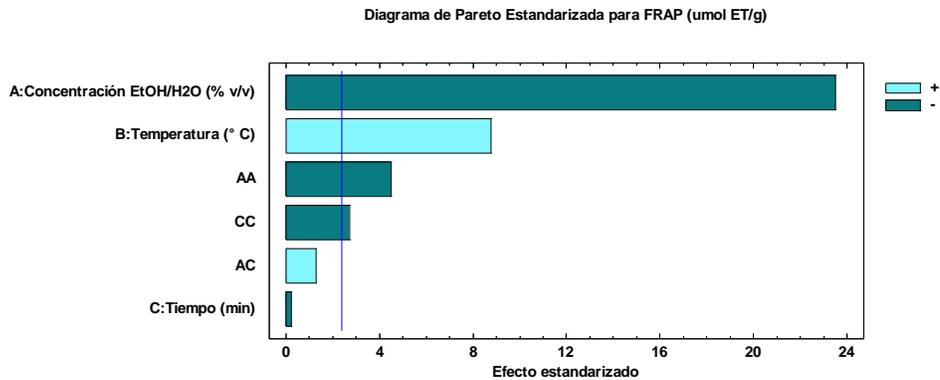


Figura 43. Diagrama de Pareto Estandarizada para FRAP

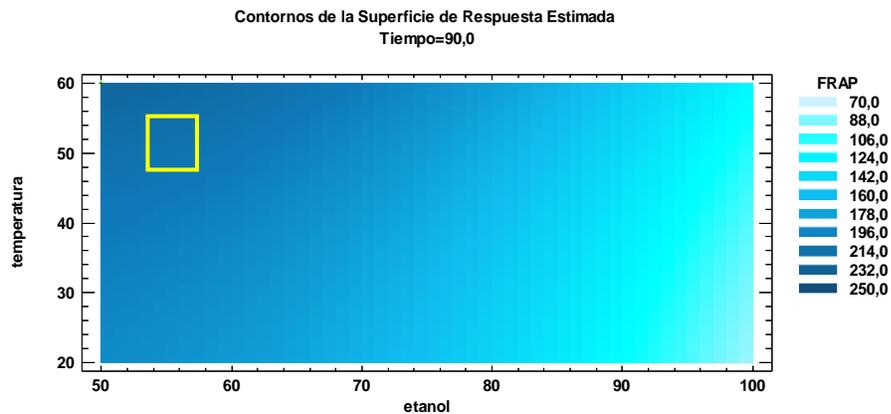


Figura 44. La concentración de etanol intermedia y temperaturas moderadas muestran como resultado una mayor actividad antioxidante FRAP ( $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con Extracción Convencional

#### 4.4.DPPH

##### Análisis de Varianza para DPPH (umol ET/g)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	40092.6	1	40092.6	99.64	0.0000

B: Temperatura (° C)	690.335	1	690.335	1.72	0.2316
C: Tiempo (min)	784.977	1	784.977	1.95	0.2052
AA	782.14	1	782.14	1.94	0.2059
AB	726.033	1	726.033	1.80	0.2211
CC	490.687	1	490.687	1.22	0.3060
Error total	2816.64	7	402.377		
Total (corr.)	46749.5	13			

R-cuadrada = 93.975 %

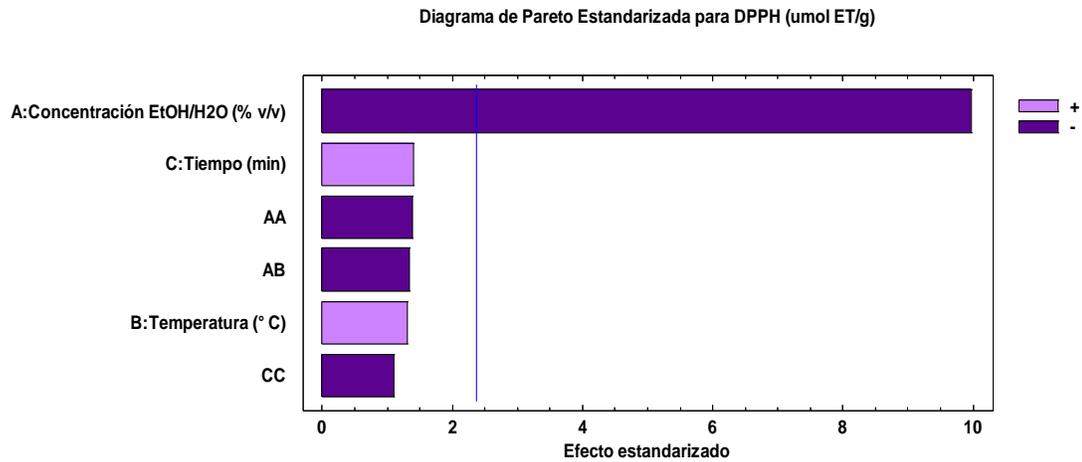


Figura 45. Diagrama de Pareto Estandarizada para Polifenoles Totales

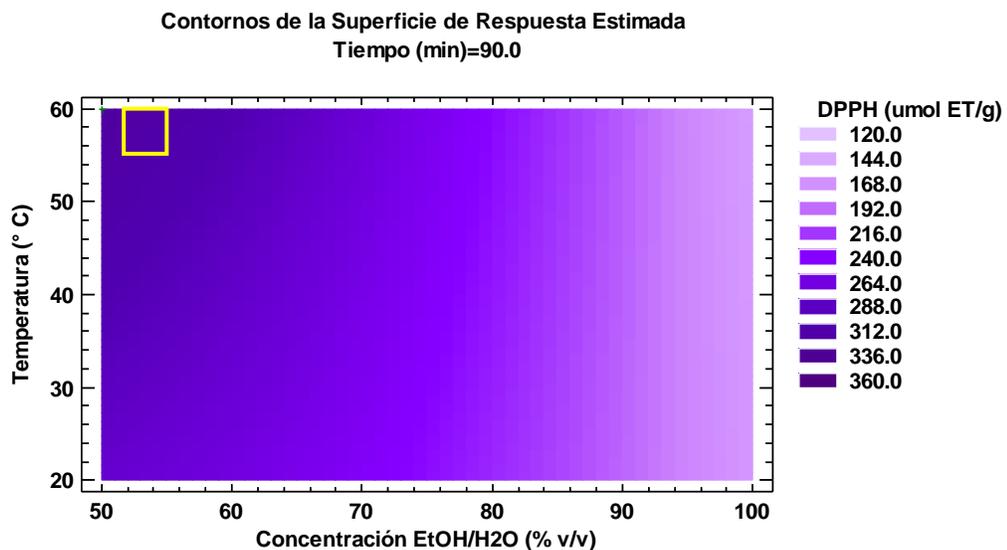


Figura 46. La concentración de etanol intermedia muestra como resultado una mayor actividad antioxidante DPPH (umol equivalente de Trolox/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con Extracción Convencional

## Anexo 5.

### Extracción ASE a partir de residuos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* cv. Legacy)

**Tabla 2.** Sólidos Solubles en los extractos obtenidos con ASE

Exp.	Etanol (% v/v)	Temperatura (°C)	Ciclos estáticos	Sólidos Solubles (°Brix)
1	50	40	1	9,20±0,14
2	20	40	3	5,20±0,00
3	80	40	3	17,45±0,21
4	50	40	5	20,95±0,35
5	50	50	3	8,00±0,00
6	50	50	3	7,95±0,07
7	50	50	3	7,20±0,14
8	20	50	1	5,05±0,07
9	80	50	1	16,95±0,21
10	20	50	5	4,60±0,28
11	80	50	5	21,70±0,14
12	50	60	1	7,75±0,14
13	20	60	3	9,95±0,07
14	80	60	3	22,10±0,07
15	50	60	5	17,75±0,28

Resultados presentados como promedio ± desviación estándar

#### 5.1. Polifenoles Totales

##### Análisis de Varianza para Polifenoles Totales (mg EAG/g)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentración EtOH/H2O (% v/v)	369.92	1	369.92	8.44	0.0175

B:Temperatura (°C)	58.32	1	58.32	1.33	0.2785
C:Ciclos Estáticos (unidades)	163.805	1	163.805	3.74	0.0853
AB	147.623	1	147.623	3.37	0.0997
BC	142.803	1	142.803	3.26	0.1046
Error total	394.554	9	43.8393		
Total (corr.)	1277.02	14			

R-cuadrada = 69.1036 %

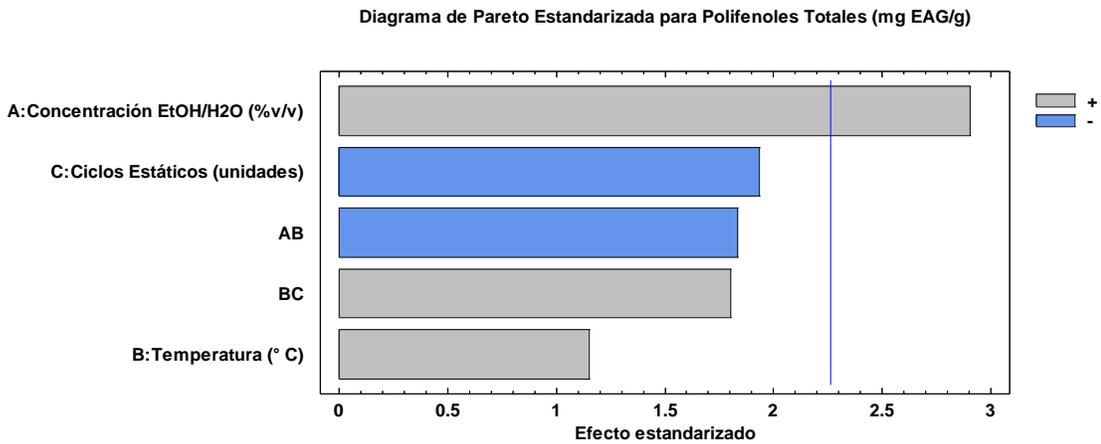


Figura 47. Diagrama de Pareto Estandarizada para Polifenoles Totales

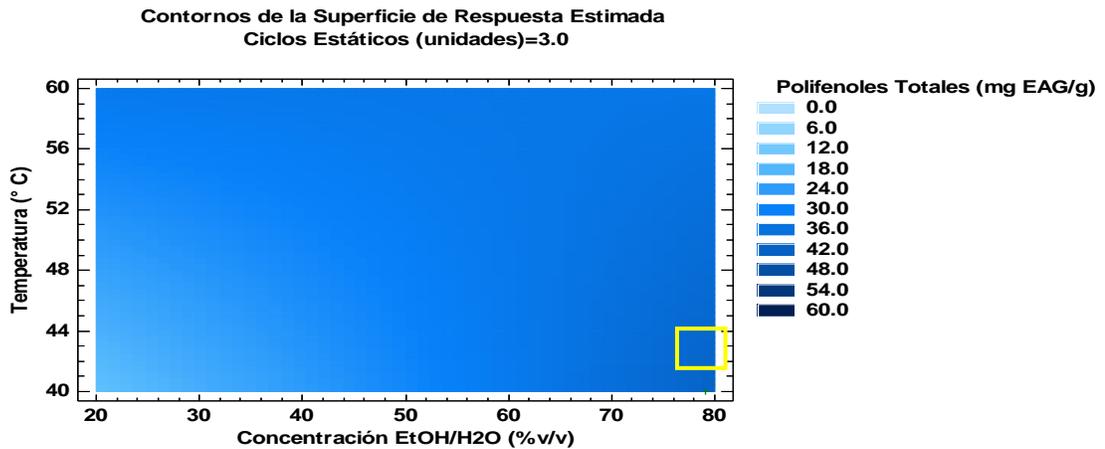


Figura 48. La extracción con una concentración de etanol elevado muestra como resultado una mayor concentración de polifenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy con Extracción ASE

## 5.2. Antocianinas Totales

### Análisis de Varianza para Antocianinas Totales (mg EC3G/g)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	53.7685	1	53.7685	9.88	0.0119
B: Temperatura (° C)	6.48	1	6.48	1.19	0.3035
C: Ciclos Estáticos (unidades)	7.64405	1	7.64405	1.40	0.2662
AB	6.94323	1	6.94323	1.28	0.2878
BC	18.02	1	18.02	3.31	0.1021
Error total	48.9664	9	5.44071		
Total (corr.)	141.822	14			

R-cuadrada = 65.4734 %

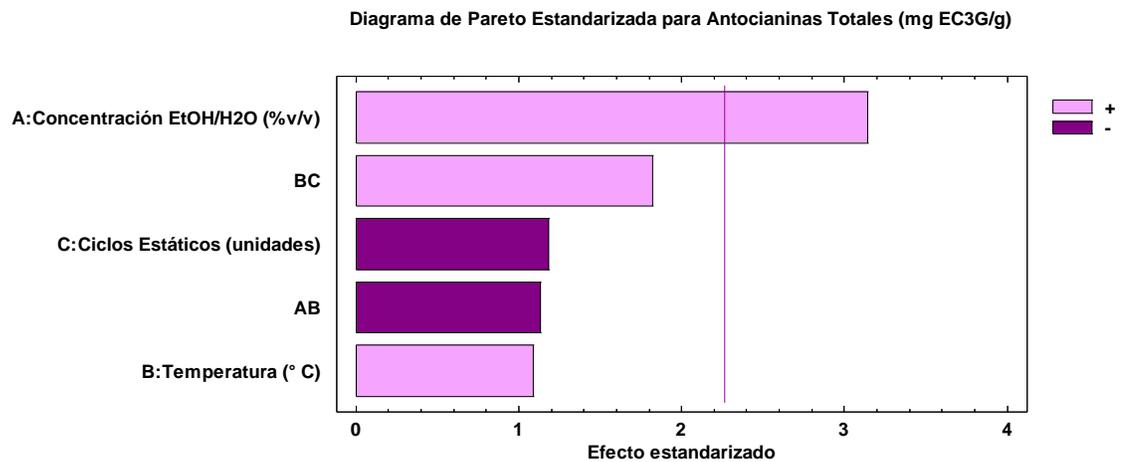


Figura 49. Diagrama de Pareto Estandarizada para Antocianinas Totales

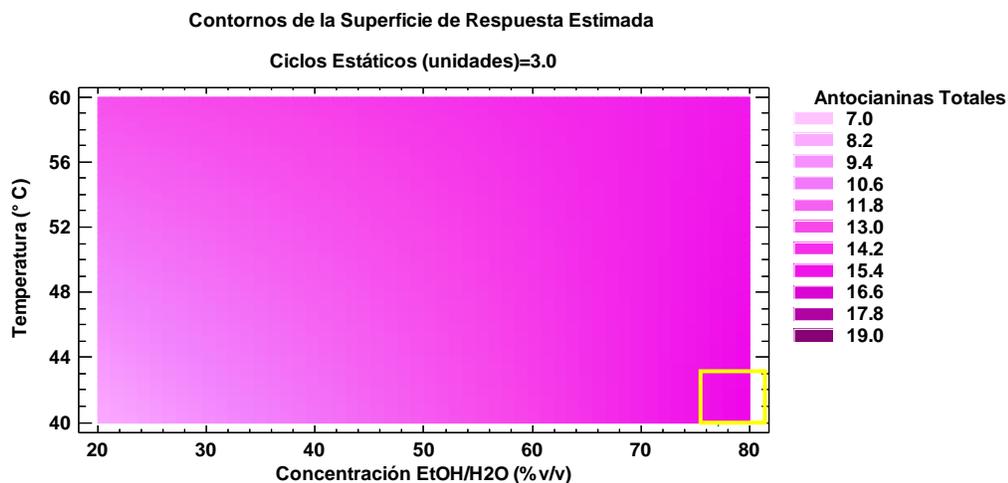


Figura 50. La interacción entre temperaturas mínimas, ciclo de extracción igual a 1 y concentración de etanol de 78% v/v muestra como resultado una mayor concentración de Antocianinas Totales (mg equivalentes de cianidin-3 glucósido / g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con ASE.

### 5.3. FRAP

#### Análisis de Varianza para FRAP (umol ET/g)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	11963.7	1	11963.7	20.06	0.0042
B: Temperatura (° C)	3655.55	1	3655.55	6.13	0.0481
C: Ciclos Estáticos (unidades)	20895.8	1	20895.8	35.04	0.0010
AA	3419.49	1	3419.49	5.73	0.0537
AB	7611.69	1	7611.69	12.76	0.0117
AC	907.817	1	907.817	1.52	0.2634
BC	7291.45	1	7291.45	12.23	0.0129
CC	7221.75	1	7221.75	12.11	0.0131
Error total	3577.88	6	596.314		
Total (corr.)	65886.2	14			

R-cuadrada = 94.5696 %

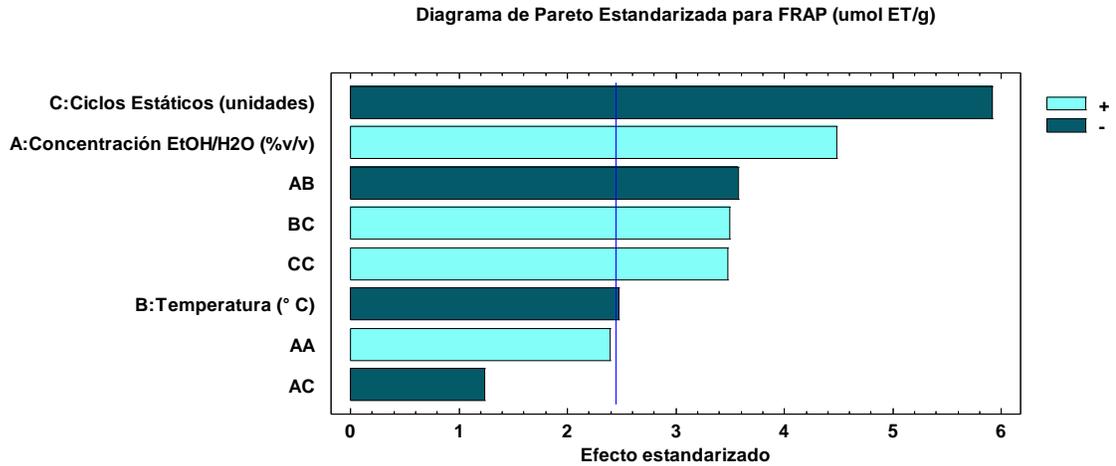


Figura 51. Diagrama de Pareto Estandarizada para FRAP

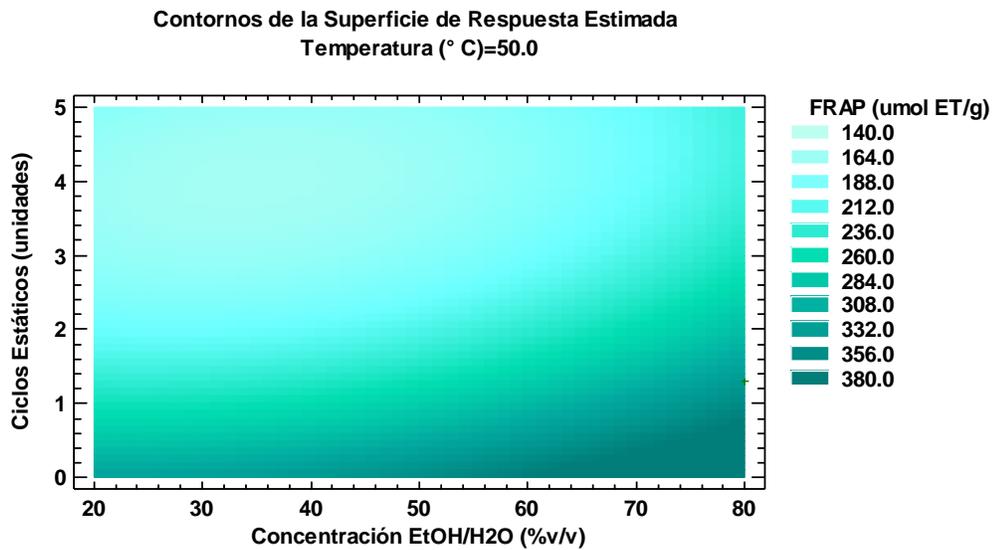


Figura 52. Las concentraciones de etanol elevadas y temperaturas moderadas muestran como resultado una mayor actividad antioxidante FRAP ( $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con ASE

## 5.4. DPPH

### Análisis de Varianza para DPPH (umol ET/g)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	1587.66	1	1587.66	3.65	0.1142
B: Temperatura (° C)	1734.9	1	1734.9	3.99	0.1023
C: Ciclos Estáticos (unidades)	9359.17	1	9359.17	21.53	0.0056

AA	2247.02	1	2247.02	5.17	0.0721
AB	5088.68	1	5088.68	11.70	0.0188
AC	3481.59	1	3481.59	8.01	0.0367
BB	998.945	1	998.945	2.30	0.1900
BC	3556.93	1	3556.93	8.18	0.0354
CC	5599.21	1	5599.21	12.88	0.0157
Error total	2173.87	5	434.774		
Total (corr.)	35971.9	14			

R-cuadrada = 93.9568 %

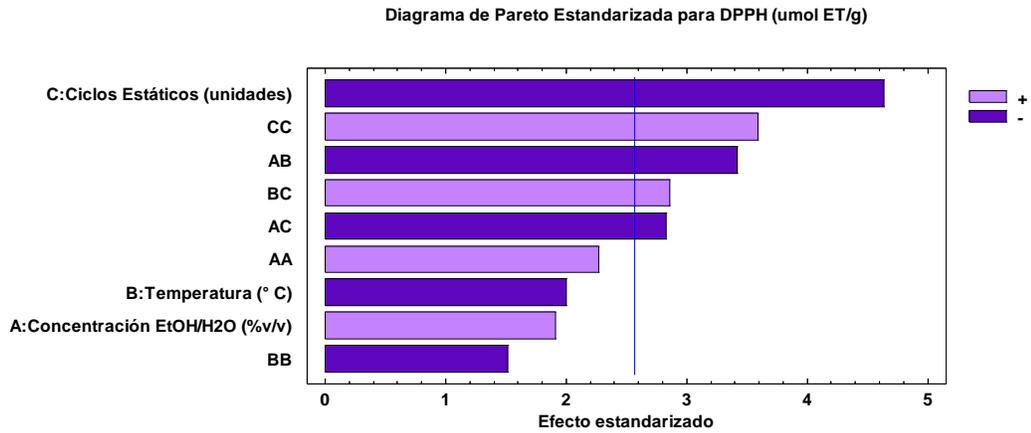


Figura 53. Diagrama de Pareto Estandarizada para DPPH

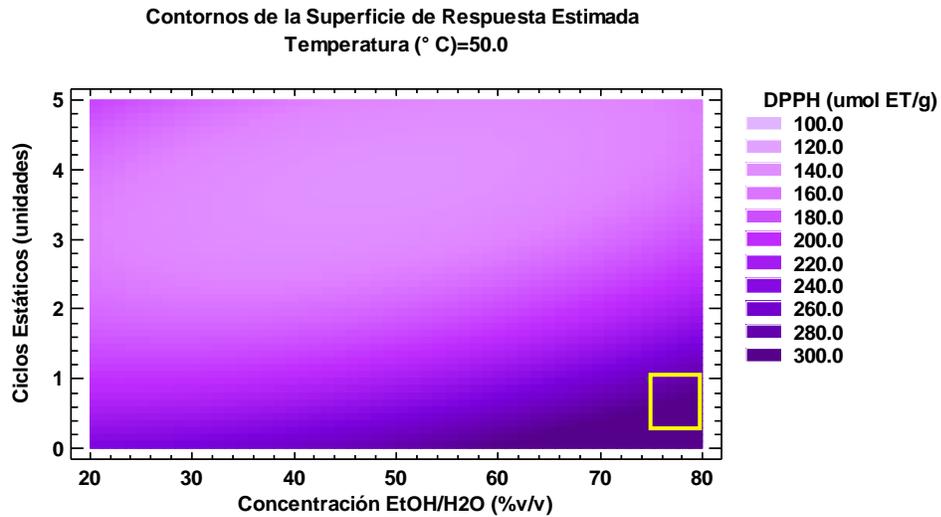


Figura 54. Al aplicar temperaturas intermedias se muestra como resultado una mayor actividad antioxidante DPPH ( $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con ASE.

## Anexo 6.

### Extracción asistida por ultrasonido (EAU) a partir de residuos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* cv. Legacy).

**Tabla 3.** Sólidos Solubles en los extractos obtenidos con EAU

Exp.	Etanol (% v/v)	Amplitud (%)	Tiempo (min)	Sólidos Solubles (°Brix)
1	50	55	35	24,80±0,14
2	80	55	60	24,70±0,28
3	50	20	10	24,50±0,42
4	50	55	35	23,70±0,14
5	50	20	60	24,40±0,00
6	80	20	35	25,05±0,07
7	50	90	60	21,60±0,14
8	80	55	10	25,15±0,07
9	20	55	10	25,15±0,07
10	20	20	35	14,15±0,21
11	50	55	35	24,85±0,07
12	80	90	35	24,85±0,07
13	50	90	10	22,80±0,14
14	20	90	35	12,20±0,28
15	20	55	60	10,40±0,42

Resultados presentados como promedio ± desviación estándar.

## 6.1 Polifenoles Totales

### Análisis de Varianza para Polifenoles Totales (mg EAG/g de residuo liofilizado)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentración EtOH/H2O (% v/v)	106.07	1	106.07	12.08	0.0070
B:Amplitud (%)	17.8204	1	17.8204	2.03	0.1880

C:Tiempo (min)	3.52451	1	3.52451	0.40	0.5421
AA	221.75	1	221.75	25.26	0.0007
BC	53.1441	1	53.1441	6.05	0.0361
Error total	79.0204	9	8.78004		
Total (corr.)	481.329	14			

R-cuadrada = 83.5829 %

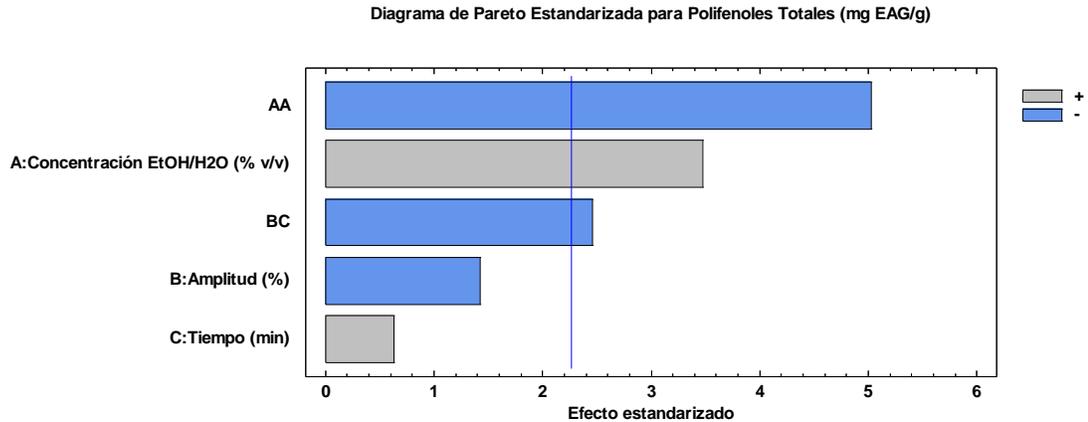


Figura 55. Diagrama de Pareto Estandarizada para Polifenoles Totales

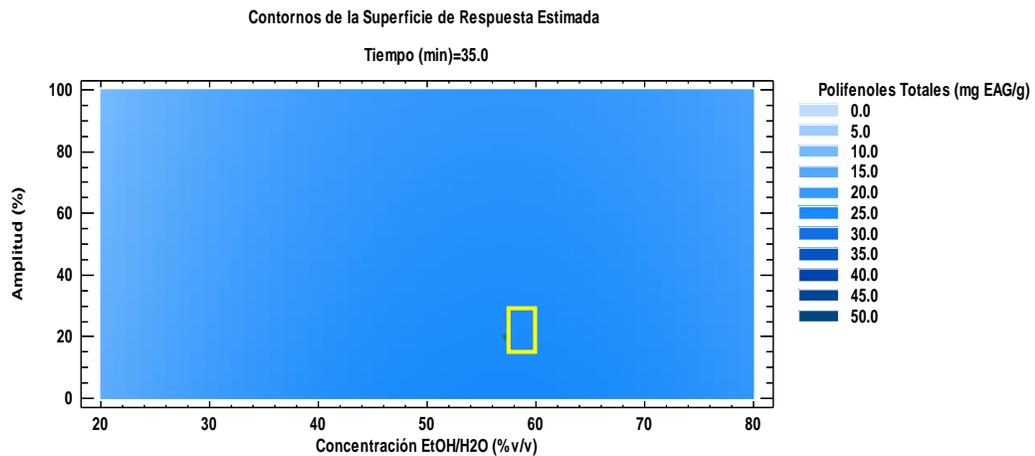


Figura 56. La combinación de amplitud del proceso y concentración de etanol intermedio aplicando tiempos moderados muestra como resultado una mayor concentración de polifenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico/g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con EAU

## 6.2. Antocianinas Totales

### Análisis de Varianza para Antocianinas Totales (mg EC3G/g de residuo liofilizado)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
--------	-------------------	----	----------------	---------	---------

A: Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	41.907	1	41.907	51.52	0.0002
B: Amplitud (%)	0.03125	1	0.03125	0.04	0.8502
C: Tiempo (min)	2.49761	1	2.49761	3.07	0.1232
AA	4.6656	1	4.6656	5.74	0.0478
AB	3.3856	1	3.3856	4.16	0.0807
AC	0.912025	1	0.912025	1.12	0.3248
BB	2.24087	1	2.24087	2.75	0.1409
Error total	5.69382	7	0.813403		
Total (corr.)	61.8335	14			

R-cuadrada = 90.7917 %

Diagrama de Pareto Estandarizada para Antocianinas Totales (mg EC3G/g)

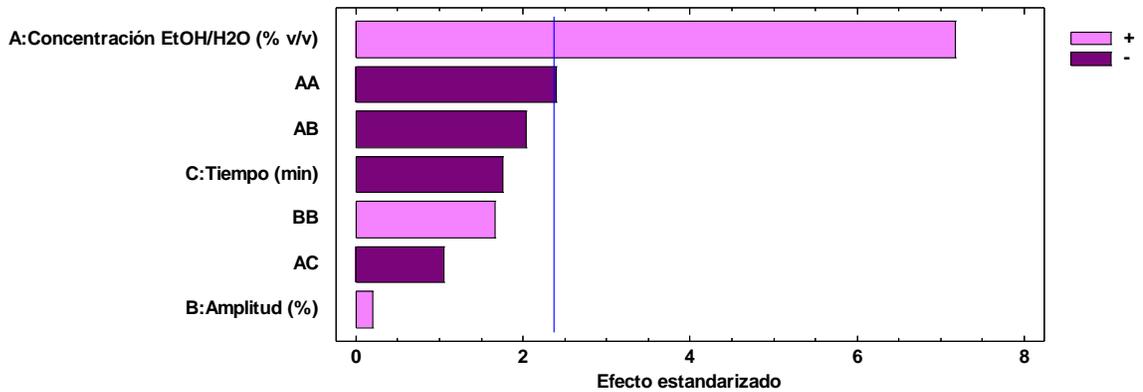


Figura 57. Diagrama de Pareto Estandarizada para Antocianinas Totales

Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada

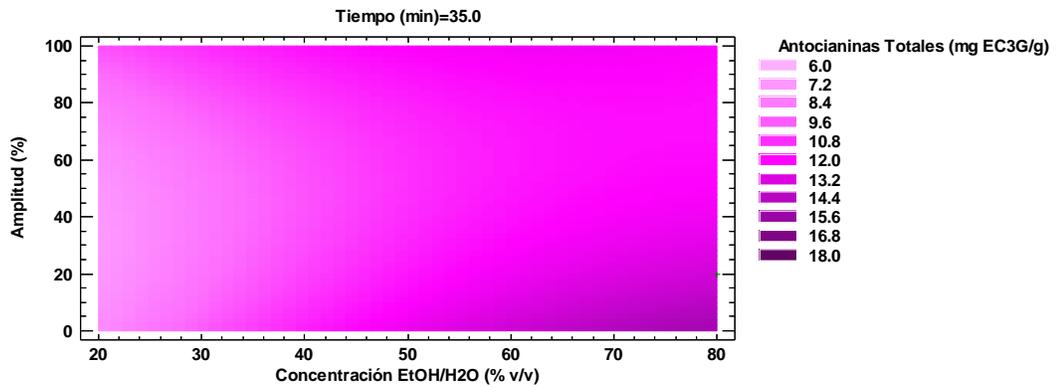


Figura 58. La interacción entre tiempos y amplitudes mínimas con una concentración de etanol elevada muestra como resultado una mayor concentración de Antocianinas Totales (mg equivalentes de cianidin-3 glucósido / g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con EAU.

### 6.3. FRAP

### Análisis de Varianza para FRAP (umol ET/g de residuo liofilizado)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	91.8013	1	91.8013	18.08	0.0028
B: Amplitud (%)	16.7621	1	16.7621	3.30	0.1068
C: Tiempo (min)	1.14005	1	1.14005	0.22	0.6483
AA	183.262	1	183.262	36.09	0.0003
AB	26.061	1	26.061	5.13	0.0533
BB	8.42155	1	8.42155	1.66	0.2338
Error total	40.6236	8	5.07795		
Total (corr.)	374.696	14			

R-cuadrada = 89.1582 %

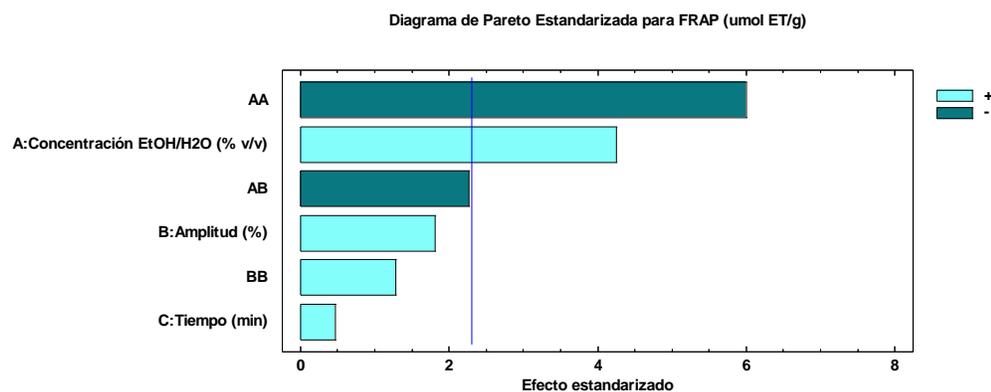


Figura 59. Diagrama de Pareto Estandarizada para FRAP

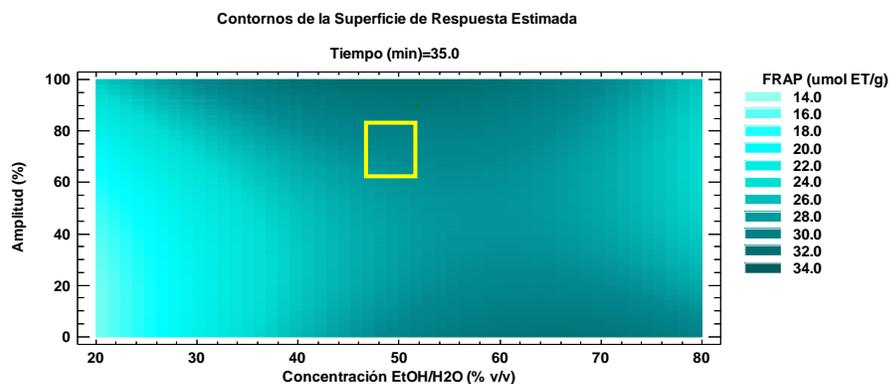


Figura 60. La concentración de etanol intermedia y amplitudes superiores muestran como resultado una mayor actividad antioxidante FRAP ( $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con EAU.

## 6.4. DPPH

### Análisis de Varianza para DPPH (umol ET/g de residuo liofilizado)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración EtOH/H <sub>2</sub> O (% v/v)	124.346	1	124.346	7.31	0.0305
B: Amplitud (%)	373.055	1	373.055	21.93	0.0023
C: Tiempo (min)	13.9128	1	13.9128	0.82	0.3959
AA	3929.11	1	3929.11	230.93	0.0000
AB	31.6969	1	31.6969	1.86	0.2145
BC	50.1972	1	50.1972	2.95	0.1296
CC	248.649	1	248.649	14.61	0.0065
Error total	119.101	7	17.0145		
Total (corr.)	4769.57	14			

R-cuadrada = 97.5029 %

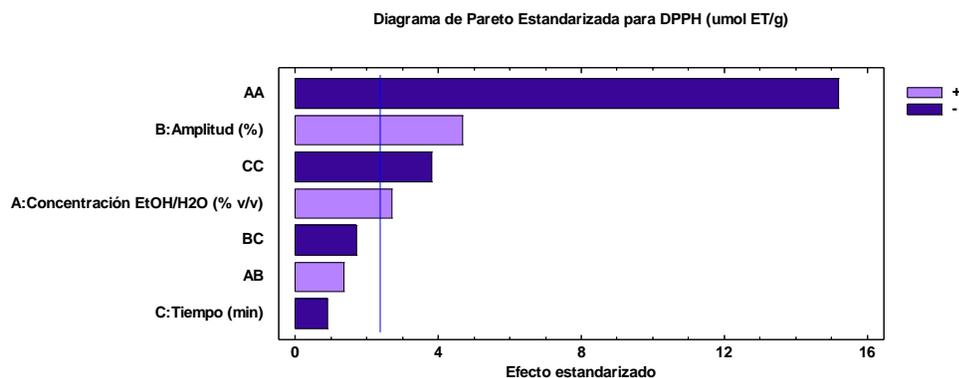


Figura 61. Diagrama de Pareto Estandarizada para DPPH

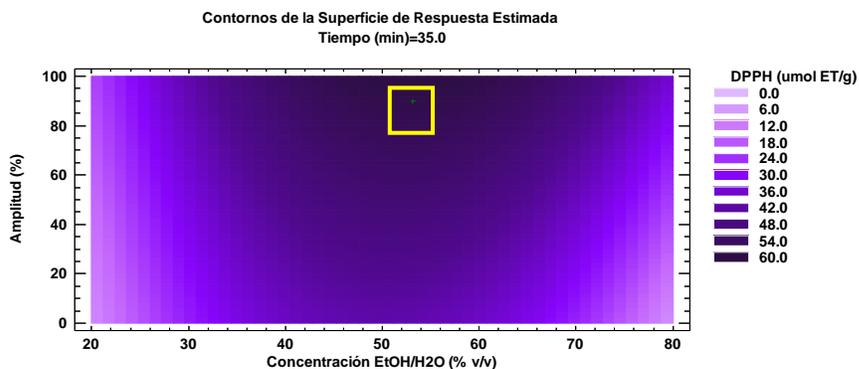


Figura 62. La concentración de etanol intermedia y un porcentaje de amplitud elevado muestra como resultado una mayor actividad antioxidante DPPH ( $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con EAU.

## Anexo 7

### Extracción con CO<sub>2</sub> Supercrítico a partir de residuos de arándano *Vaccinium Corymbosum* cv. Legacy.

Tabla 38. Análisis de los Sólidos Solubles de los extractos obtenidos con Extracción mediante CO<sub>2</sub> Supercrítico

Exp.	Cosolvente	Temperatura	Presión	Sólidos
	Etanol (%)	(°C)	(bar)	Solubles (°Brix)
1	5	50	300	20,55±0,07
2	5	40	400	20,05±0,21
3	0	50	200	20,20±0,14
4	5	50	300	21,10±0,00
5	10	40	300	20,05±0,07
6	5	40	200	20,25±0,07
7	10	60	300	20,20±0,14
8	0	50	400	19,65±0,07
9	5	60	400	20,95±0,49
10	0	40	300	19,40±0,14
11	10	50	200	20,40±0,57
12	10	50	400	21,45±0,07
13	5	60	200	20,90±0,42

<b>14</b>	5	50	300	20,60±0,57
<b>15</b>	0	60	300	20,35±0,21

Resultados presentados como promedio ± desviación estándar.

## 7.1. Polifenoles Totales

### Análisis de Varianza para Polifenoles Totales (mg EAG/g de residuo liofilizado)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Cosolvente (%)	25.92	1	25.92	14.62	0.0065
B: Temperatura (° C)	1.53125	1	1.53125	0.86	0.3836
C: Presión (bar)	3.51125	1	3.51125	1.98	0.2021
AC	3.4225	1	3.4225	1.93	0.2073
BB	4.26166	1	4.26166	2.40	0.1650
BC	2.56	1	2.56	1.44	0.2686
CC	3.20452	1	3.20452	1.81	0.2207
Error total	12.4092	7	1.77275		
Total (corr.)	57.3893	14			

R-cuadrada = 78.3771 %

Diagrama de Pareto Estandarizada para Polifenoles Totales (mg EAG/g)

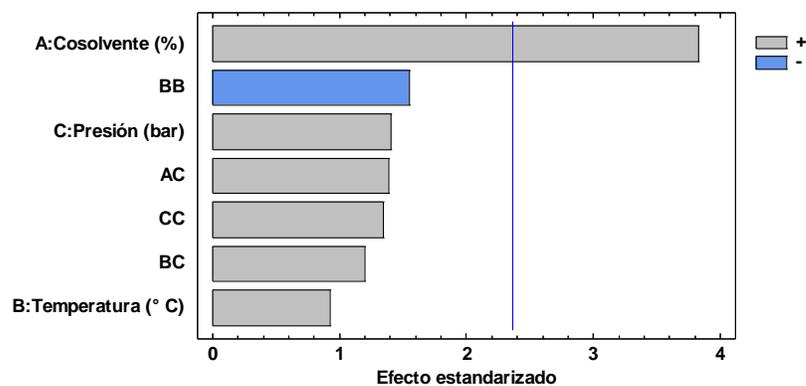


Figura 63. Diagrama de Pareto Estandarizada para Polifenoles Totales

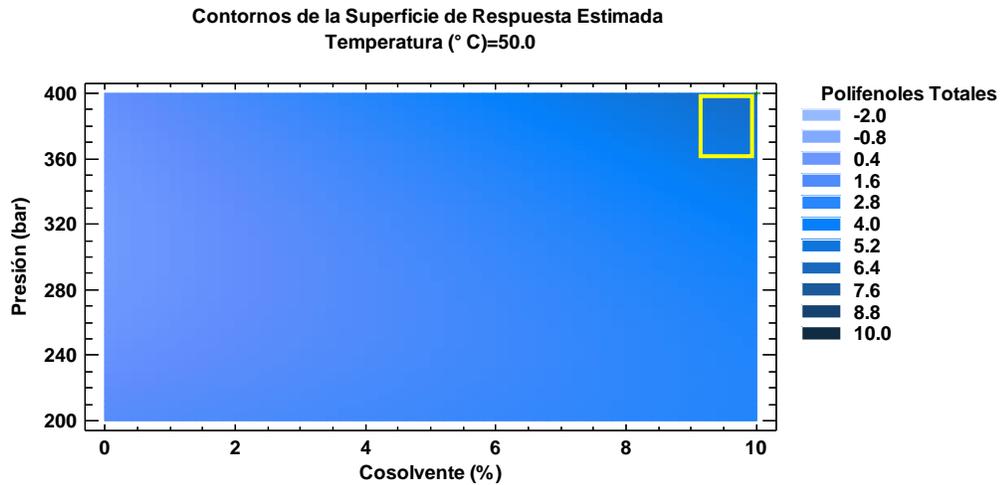


Figura 64. La aplicación de un elevado porcentaje de cosolvente (etanol) y presión muestra como resultado una mayor concentración de polifenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico/g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con extracción CO<sub>2</sub>-SC

## 7.2. Antocianinas Totales

### Análisis de Varianza para Antocianinas Totales (mg EC3G/g de residuo liofilizado)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Cosolvente (%)	26.8278	1	26.8278	35.29	0.0003
B: Temperatura (° C)	0.365513	1	0.365513	0.48	0.5077
C: Presión (bar)	1.0952	1	1.0952	1.44	0.2644
AA	1.09779	1	1.09779	1.44	0.2638
AC	2.41803	1	2.41803	3.18	0.1123
BB	6.78279	1	6.78279	8.92	0.0174
Error total	6.08123	8	0.760154		
Total (corr.)	45.1006	14			

R-cuadrada = 86.5163 %

Diagrama de Pareto Estandarizada para Antocianinas Totales (mg EC3G/g)

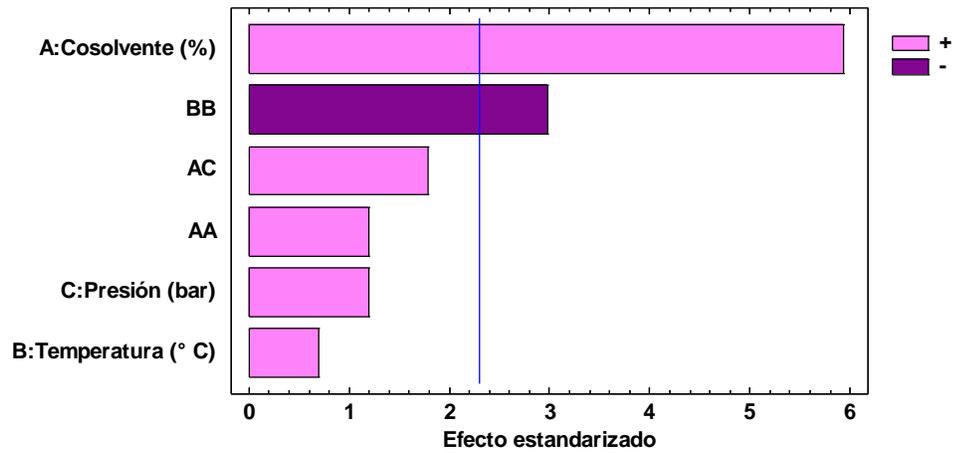


Figura 65. Diagrama de Pareto Estandarizada para Antocianinas Totales

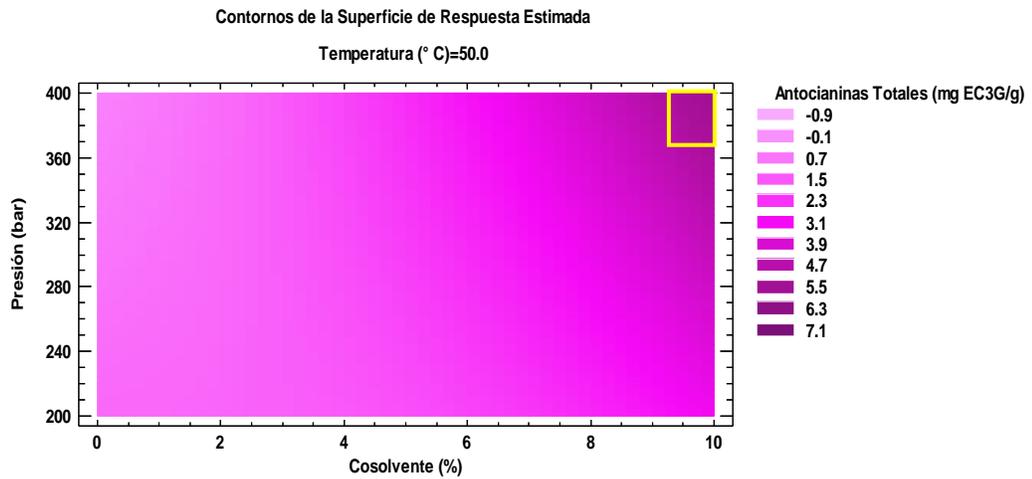


Figura 66. La interacción entre presiones elevadas y cosolvente superiores muestra como resultado una mayor concentración de Antocianinas Totales (mg equivalentes de cianidin-3 glucósido / g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con Extracción CO<sub>2</sub>-SC

### 7.3. FRAP

#### Análisis de Varianza para FRAP (umol ET/g de residuo liofilizado)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Cosolvente (%)	1572.48	1	1572.48	23.17	0.0019

B: Temperatura (° C)	7.66361	1	7.66361	0.11	0.7467
C: Presión (bar)	38.764	1	38.764	0.57	0.4745
AA	104.894	1	104.894	1.55	0.2538
AC	87.516	1	87.516	1.29	0.2935
BB	313.367	1	313.367	4.62	0.0687
CC	90.9283	1	90.9283	1.34	0.2851
Error total	475.107	7	67.8724		
Total (corr.)	2732.84	14			

R-cuadrada = 82.6149 %

Diagrama de Pareto Estandarizada para FRAP (umol ET/g)

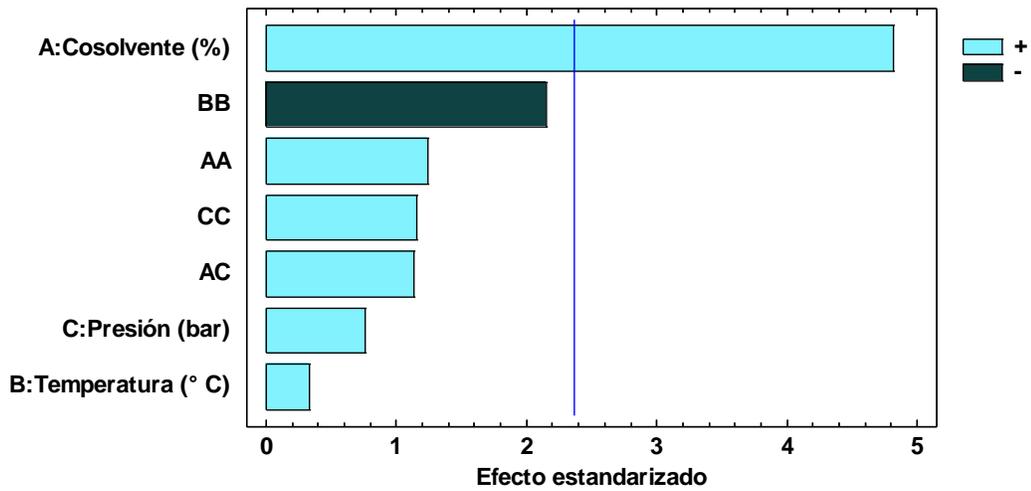


Figura 67. Diagrama de Pareto Estandarizada para FRAP

**Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada  
Temperatura (° C)=50.0**

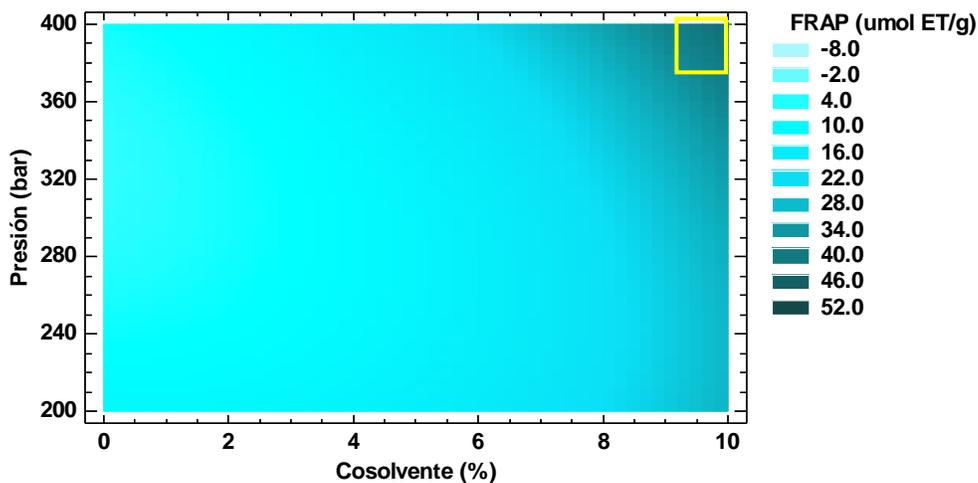


Figura 68. Las concentraciones de etanol como cosolvente al 10 % muestran como resultado una mayor actividad antioxidante FRAP ( $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/ g de residuo de arándano de arándanos *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con  $\text{CO}_2\text{-SC}$

#### 7.4. DPPH

##### Análisis de Varianza para DPPH ( $\mu\text{mol ET/g}$ de residuo liofilizado)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Cosolvente (%)	744.208	1	744.208	24.47	0.0017
B: Temperatura (° C)	14.553	1	14.553	0.48	0.5114
C: Presión (bar)	18.5745	1	18.5745	0.61	0.4601
AA	58.6715	1	58.6715	1.93	0.2075
AC	39.3129	1	39.3129	1.29	0.2930
BB	130.333	1	130.333	4.28	0.0772
CC	31.6711	1	31.6711	1.04	0.3415
Error total	212.918	7	30.4168		
Total (corr.)	1268.38	14			

R-cuadrada = 83.2134 %

Diagrama de Pareto Estandarizada para DPPH (umol ET/g)

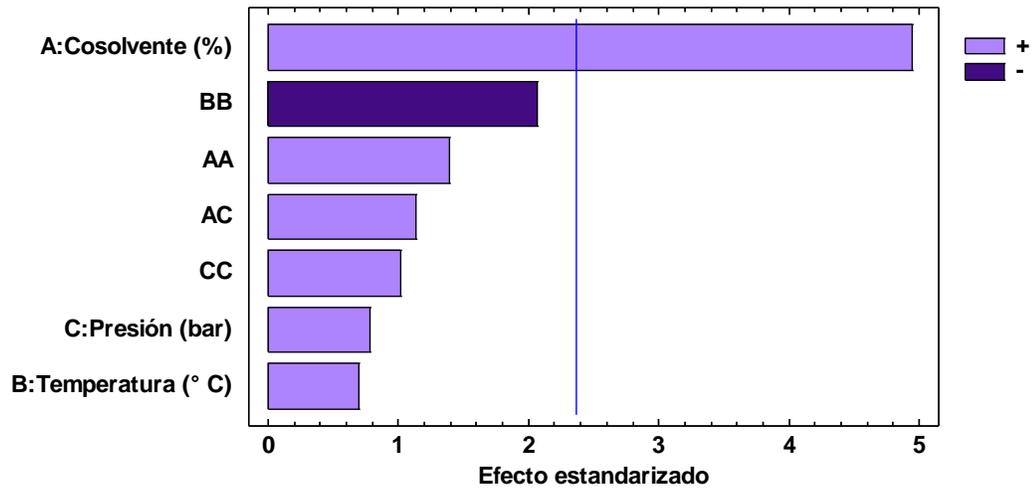


Figura 69. Diagrama de Pareto Estandarizada para Polifenoles Totales

Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada

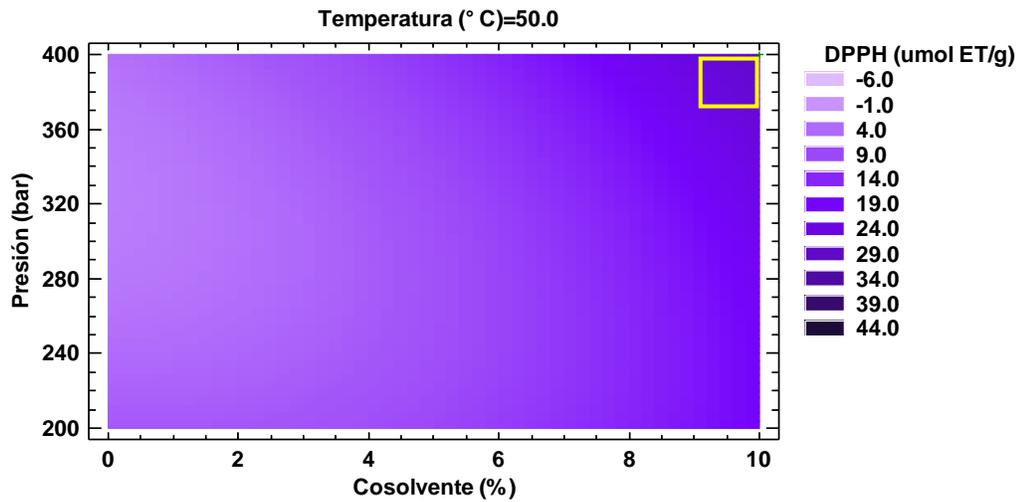


Figura 70. La concentración de etanol como cosolvente igual al 10 % muestra como resultado una mayor actividad antioxidante DPPH (µmol equivalente de Trolox/ g de residuo de arándano *Vaccinium corymbosum* L. cv. Legacy) con CO<sub>2</sub>-SC

## Anexo 8

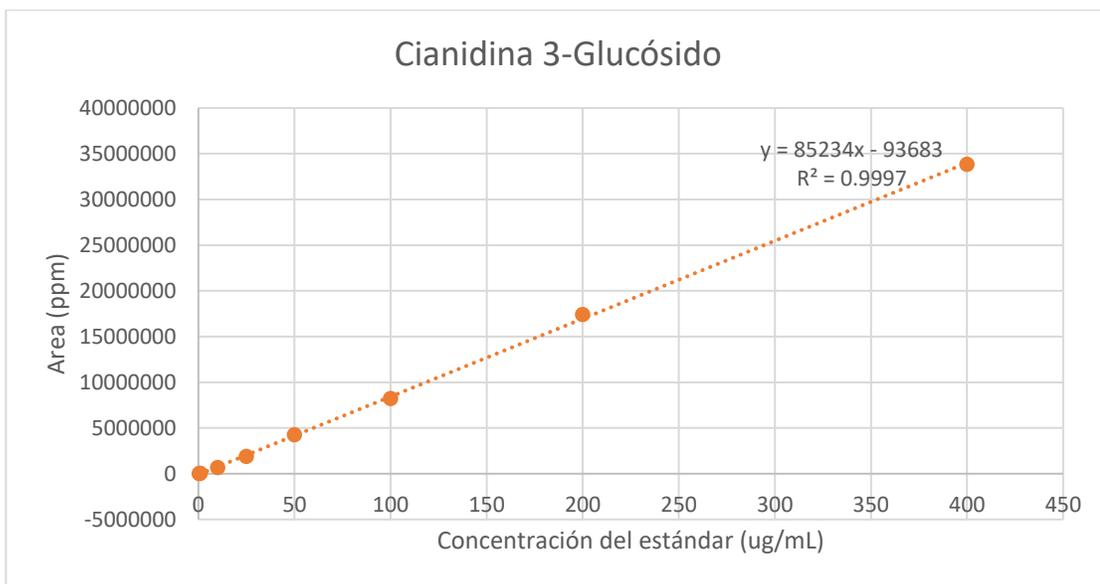


Figura 71. Curva de calibración con concentraciones conocidas de cianidina 3-O-glucósido

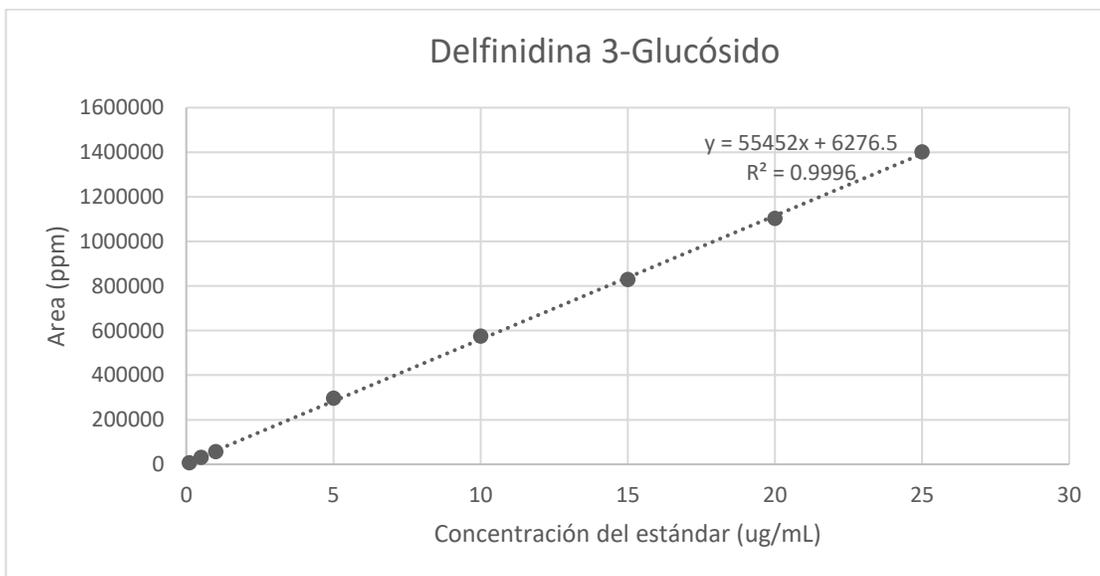


Figura 72. Curva de calibración con concentraciones conocidas de delfinidina 3-O-glucósido

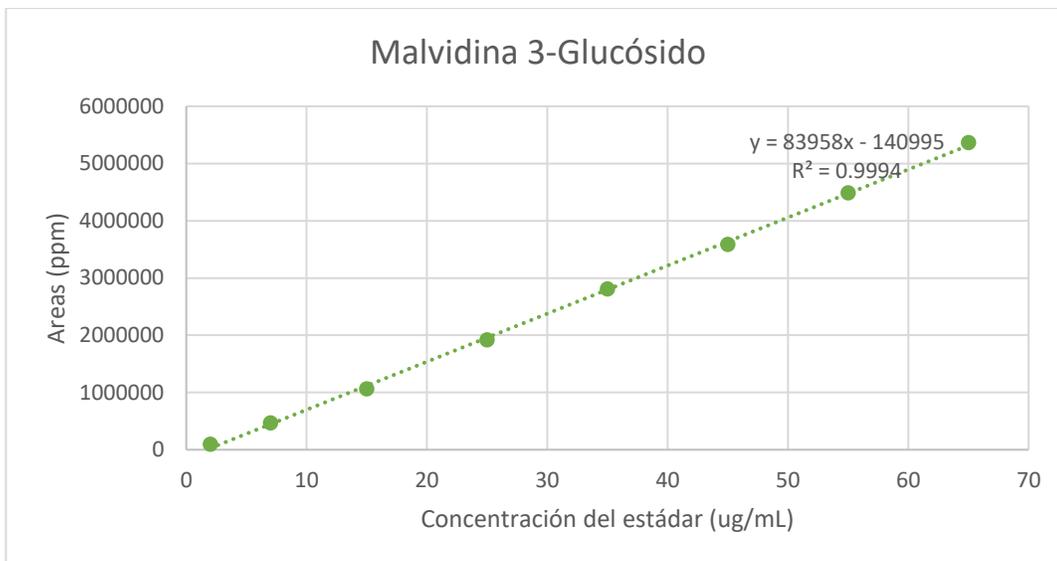


Figura 73. Curva de calibración con concentraciones conocidas de malvidina 3-O-glucósido

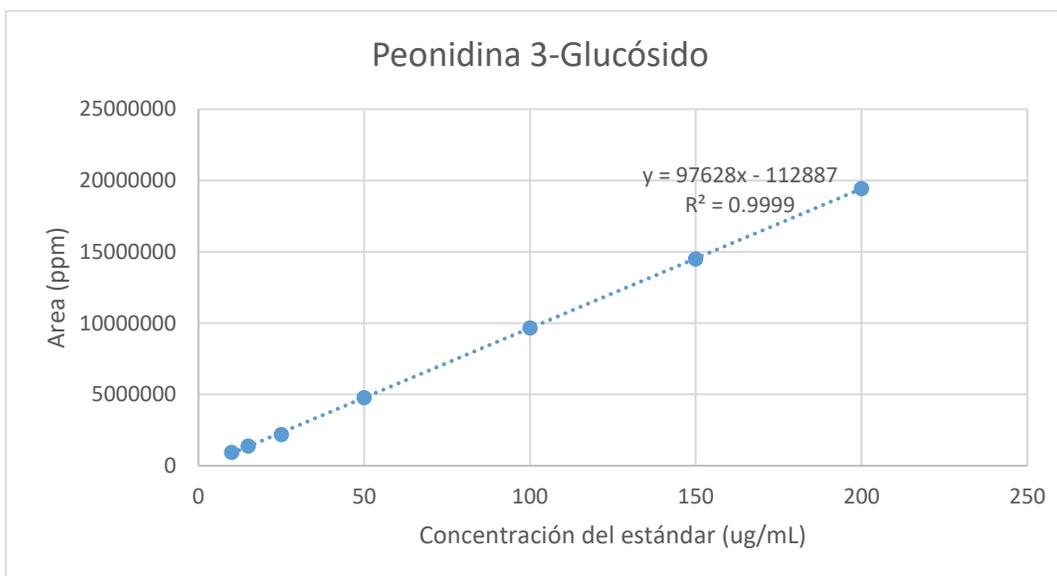


Figura 74. Curva de calibración con concentraciones conocidas de peonidina 3-O-glucósido

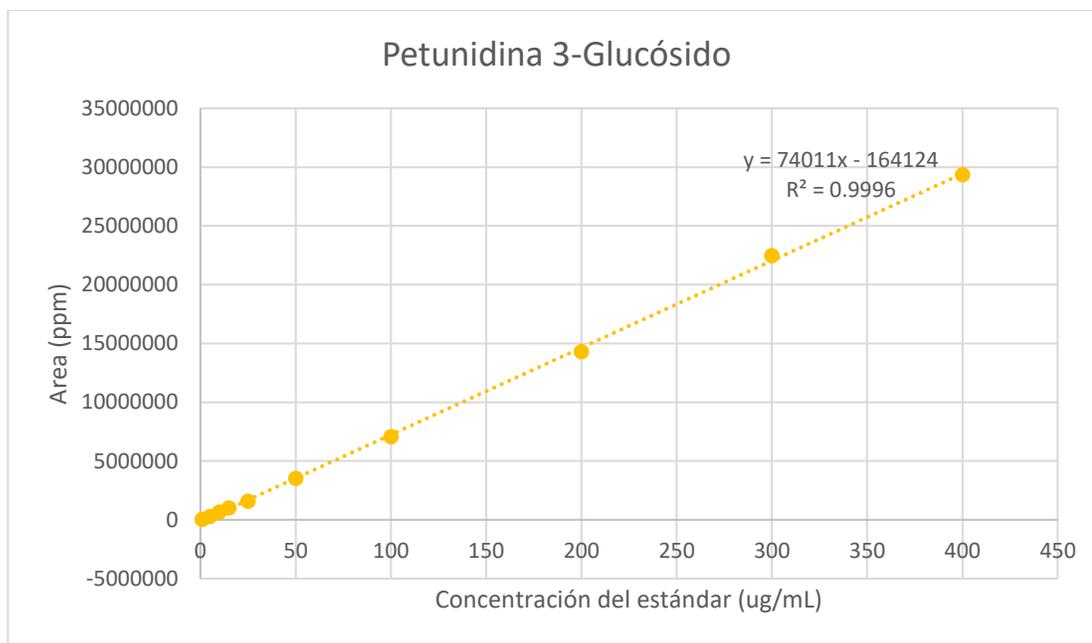


Figura 75. Curva de calibración con concentraciones conocidas de petunidina 3-O-glucósido

## Anexo 10.

Tabla 51. Identificación de peks de antocianinas en muestras de arándanos mediante HPLC-DAD-MS

Compuesto	Fórmula	Masa exacta	Masa encontrada	Difere, (ppm)	Métodos de Extracción			
					Conv,	ASE	CO <sub>2</sub> -SC	EAU
<b>Cianidina -3-O-arabinósido</b>	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	419,0973	419,0969	-0,9	+	+	+	+
<b>Cianidina -3-O-xilósido</b>	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	419,0973	419,0970	-0,6	+	+	+	+
<b>Cianidina -3-O-galactósido</b>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449,1078	449,1073	-1,2	+	+	+	+
<b>Cianidina -3-O-glucósido</b>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449,1078	449,1075	-0,8	+	+	+	+
<b>Cianidina -3-O-(6''-succinil-glucósido)</b>	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> O <sub>14</sub>	549,1239	549,1239	0,0	+	+	+	+
<b>Cianidina -3,5-O-diglucósido</b>	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub>	611,1607	611,1605	-0,3	+	+	+	+
<b>Cianidina -3-O-(6''-cafeoil-glucósido)</b>	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>14</sub>	611,1395	611,1396	0,1	+	+	+	+
<b>Delfinidina-3-O-arabinósido</b>	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	435,0922	435,092	-0,4	+	+	+	+
<b>Delfiniidina-3-O-galactósido</b>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	465,1028	465,1028	0,1	+	+	+	+

<b>Delfinidina-3-O-glucósido</b>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	465,1028	465,1028	0,1	+	+	+	+
<b>Malvidina-3-O-arabinósido</b>	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>	463,1235	463,1231	-0,8	+	+	+	+
<b>Malvidina-3-O-galactósido</b>	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	493,1341	493,1339	-0,3	+	+	+	+
<b>Malvidina-3-O-glucósido</b>	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	493,1341	493,1339	-0,3	+	+	+	+
<b>Malvidina-3-O-(6''-acetil-galactósido)</b>	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>13</sub>	535,1446	535,1447	0,1	+	+	+	+
<b>Malvidina-3-O-(6''-acetil-glucósido)</b>	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> O <sub>13</sub>	535,1446	535,1445	-0,2	+	+	+	+
<b>Malvidina-3-O-(6''-p-coumaroil-glucósido)</b>	C <sub>32</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub>	639,1708	639,1705	-0,5	+	+	+	+
<b>Malvidina-3-O-(6''-cafeoil-glucósido)</b>	C <sub>32</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub>	655,1658	655,1652	-0,8	+	+	+	+
<b>Pelargonidin-3-O-arabinósido</b>	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub>	403,1024	403,1021	-0,64	+	+	+	+
<b>Pelargonidina-3-O-galactósido</b>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	433,1129	433,1125	-0,97	+	+	+	+
<b>Pelargonidina-3-O-glucósido</b>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	433,1129	433,1129	-0,05	+	+	+	+
<b>Pelargonidina-3-O-(6''-succinil-glucósido)</b>	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> O <sub>13</sub>	533,1290	533,1265	-4,63	+	+	+	+
<b>Peonidina-3-O-arabinósido</b>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449,10784	449,1064	-3,21	+	+	+	+
<b>Peonidina-3-O-galactósido</b>	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>	463,12349	463,1220	-3,22	+	+	+	+
<b>Peonidina-3-O-glucósido</b>	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>	463,12349	463,1220	-3,22	+	+	+	+
<b>Peonidin-3-O-(6-acetil-glucósido)</b>	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	505,13405	505,1324	-3,27	+	+	+	+
<b>Peonidin-3-O-(6-acetil-galactósido)</b>	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>	505,13405	505,1324	-3,27	+	+	+	+
<b>Peonidina-3-O-(6''-p-coumaroil-glucósido)</b>	C <sub>31</sub> H <sub>29</sub> O <sub>13</sub>	609,16027	609,1601	-0,28	+	+	+	+
<b>Petunidina-3-O-arabinósido</b>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449,10784	449,1075	0,76	+	+	+	+
<b>Petunidina-3-O-galactósido</b>	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	479,1184	479,1183	0,21	+	+	+	+
<b>Petunidina-3-O-glucósido</b>	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	479,1184	479,1182	0,42	+	+	+	+

<b>Petunidina- 3-O- (6''-acetil- galactósido)</b>	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> O <sub>13</sub>	521,1290	521,1290	-0,06	+	n/d	+	+
<b>Petunidina- 3-O- (6''-acetil- glucósido)</b>	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> O <sub>13</sub>	521,1290	521,1289	0,13	+	+	+	+

n/d: No detectado. Difere: diferencia. Conv: extracción convencional. ASE: extracción acelerada de solventes. EAU: extracción asistida por ultrasonido. CO<sub>2</sub>-SC: extracción con CO<sub>2</sub> supercrítica.