



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**Departamento de Tecnología de  
Alimentos**

---

**OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE  
ARÁNDANOS PARA SER UTILIZADO COMO ANTIOXIDANTE Y  
COLORANTE EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

---

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada por:**

**Luz Marina Zapata**

**Dirigida por:**

**Dr. Juan A. Cárcel Carrión**

**Dra. Gabriela Clemente Polo**

**Abril de 2014**

*Quiero dedicar el esfuerzo invertido en este trabajo:*

*A Dios,  
que con su amor infinito me regala tanto en esta vida.*

*A mi esposo Omar,  
por su amor y por hacer que este largo camino sea más fácil.*

*A mis dos hijos Jazmín y Facundo,  
por ser tan dulces, cariñosos, vitales y puros.*

## AGRADECIMIENTOS

*Al reflexionar y desandar el camino recorrido para la realización de esta tesis doctoral reconozco que el mérito de este trabajo no sólo me corresponde a mí, sino que es el fruto del esfuerzo y de la colaboración de muchas personas. Es por ello que en este momento quiero, desde lo más profundo de mi corazón, expresar mi agradecimiento:*

*Al Dr. Juan Carcel Carrión y a la Dra. Gabriela Clemente Polo, por su dedicación y por haberme enseñado tanto.*

*A mis compañeros de laboratorio, Micaela, Fabio, Darío y a los becarios que me acompañaron en el trabajo diario y pusieron su granito de arena.*

*A mis amigas Cristina y Liliana, por compartir la vida y por estar siempre.*

*A las Dras. Maria del Carmen Schwab y María Mercedes Ferreyra, que me introdujeron en el mundo de la investigación científica.*

*A la comunidad de la institución a la que pertenezco, la Facultad de Ciencias de la Alimentación, a quienes en diferentes situaciones, inherentes a este trabajo, colaboraron conmigo generosamente.*

*A las autoridades de la Facultad de Ciencias de la Alimentación y de la Universidad Nacional de Entre Ríos, especialmente al Ing. Jorge Gerard, por haberme dado la oportunidad de aprender un poco más en mi vida profesional.*

*A mi familia, a mi esposo Omar que me acompañó cada minuto, a mis dos ojos y razón de ser en esta vida, mis hijos Jazmín y Facundo, que con solo mirarlos me llenaron de felicidad y me animaron a seguir; a mis hermanos y a mis padres que me enseñaron el valor del esfuerzo.*

*A Dios por las personas que puso en mi camino y por haberme dado tanto.*

*A todos ¡muchas gracias!*

---

**RESUMEN/SUMMARY/RESUM**

---

## RESUMEN

Las antocianinas son flavonoides responsables del color de los frutos del arándano. Estos compuestos son interesantes por su impacto sobre las características sensoriales de los alimentos, ya que se pueden utilizar como colorantes alimentarios naturales. Además, debido a su elevada actividad antioxidante, presentan potenciales beneficios para la salud.

En esta Tesis Doctoral se abordó el estudio del proceso de extracción de antocianinas a partir de arándanos frescos y el uso de los extractos obtenidos en un producto alimentario.

En primer lugar se determinó la influencia de las principales variables de proceso en la extracción de antocianinas de arándano fresco: temperatura, pH, tiempo de extracción, tipo de solvente y proporción de materia prima/solvente (MP/S). Se evaluaron dos metodologías de extracción: extracción sólido-líquido (ESLA) y extracción por fermentación (EAF). Para reducir el número de experiencias a realizar, sin que ello influyera en la significación de los resultados obtenidos, se realizaron diferentes diseños experimentales.

Los resultados fueron modelizados mediante superficies de respuesta. Se observó que todas las variables de proceso estudiadas tuvieron una influencia significativa en la extracción de antocianinas de arándanos. Así, en una primera serie de experiencias de ESLA, se estudió la influencia de la temperatura, el pH y el tiempo de proceso en el rendimiento de extracción de antocianinas totales (RAT). En todas estas experiencias se utilizó como solvente una solución de etanol-agua (50:50 %v/v) y una MP/S de 1:3 kg/kg. Los valores óptimos para las variables de proceso fueron: pH 2.1, temperatura 36.6 °C y tiempo de extracción 1h (tiempo más pequeño de los ensayos). En estas condiciones el RAT fue de 51%. Valores superiores e inferiores de dichas variables de proceso resultaron en un menor RAT. Probablemente la disminución del RAT con el incremento del pH, se debió a una degradación del catión flavilio, ya que éste es deficiente en electrones, y por lo tanto, muy reactivo, dando lugar a formación de hemiacetal y chalcona, ambas inestables.

El aumento del RAT con el incremento de la temperatura hasta 36.6 °C podría deberse a que la elevación de la temperatura estaría favoreciendo la extracción al aumentar la solubilidad de los antocianos y el coeficiente de difusión. Sin embargo, por encima de esa temperatura, las antocianinas extraídas se degradaron, posiblemente debido a que el efecto del calor produjo la pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo, con la consecuente producción de chalconas incoloras. Se señaló anteriormente que el mejor RAT se obtuvo para el mínimo tiempo de extracción considerado. Esto podría deberse a que se alcanzó el equilibrio entre la fase sólida y la fase líquida. También podría deberse a que a partir de ese mínimo tiempo, el ritmo de extracción de las antocianinas se vio contrarrestado con una mayor degradación de las mismas, producido por el ataque nucleofílico del agua al catión flavilio y la formación de compuestos incoloros.

En una segunda serie de experiencias de ESLA, se estudió la relación MP/S y, de nuevo, el tiempo de extracción. En todas estas experiencias, el solvente de extracción utilizado fue etanol acidificado con ácido cítrico al 1%, la temperatura de extracción se fijó en  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  y el pH, en  $3.5 \pm 0,1$ . En estas condiciones, la extracción de antocianinas fue máxima (57%) a tiempos de extracción de 2.0 h 12 min y MP/S 1:2.8 kg/kg, mientras que el aumento o disminución de las variables estudiadas provocó una disminución del RAT. El aumento del RAT con el incremento de la MP/S fue atribuido a un mayor gradiente de concentración entre las partículas de arándano y el solvente, lo que favoreció la transferencia de masa. Sin embargo, un aumento de la MP/S por encima del óptimo provocó una disminución en el RAT, debido posiblemente a que al haber una mayor cantidad de solvente, más moléculas de etanol están presentes en el medio. Por lo tanto, existe mayor probabilidad de que el etanol, al igual que el agua, actúe como nucleófilo atacando al catión flavilio y generando estructuras de antocianinas más inestables. De la misma forma, se observó que el RAT fue mayor a medida que aumentó el tiempo de extracción hasta el valor óptimo, mientras que para tiempos de extracción mayores, fue menor. Este hecho se atribuyó a que la extracción aumentó hasta alcanzar un equilibrio en la concentración de antocianinas entre las partículas

de arándanos y el solvente y luego disminuyó debido a que se produjo un deterioro de las mismas.

Por lo tanto, a partir de estas dos series de experiencias se obtuvo que las mejores condiciones para la extracción de antocianinas fueron: agente extractor, etanol acidificado con ácido cítrico al 1%; proporción materia prima/solvente de extracción de 1:3 kg/kg; temperatura de  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  y un tiempo de extracción de 2 h.

En otra serie de experiencias se estudió la EAF. Para ello, se ajustó la concentración de sólidos solubles del sustrato en 12°Brix y se realizó la fermentación con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* durante 72 h. En este caso, los parámetros evaluados fueron la temperatura y el pH. La combinación de factores que permitió obtener el mayor RAT (49%) fue: temperatura  $28^{\circ}\text{C}$  y pH 4.2. Un aumento o disminución de cualquiera de los factores estudiados provocó disminución en el RAT. Para el caso de esta metodología de extracción se consideraron dos aspectos, por un lado los factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas, y por otro, las condiciones que favorecen el crecimiento de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Desde este punto de vista, la temperatura y el pH tienen gran influencia. El incremento de la temperatura hasta el valor óptimo estaría favoreciendo el crecimiento de las levaduras y por lo tanto la producción de etanol en el medio. Esto, a su vez, incrementa la extracción de antocianinas así como también su solubilidad y su coeficiente de difusión. Temperaturas mayores afectaron al crecimiento de las levaduras y, en consecuencia, a la producción de etanol; además de favorecer la producción de chalconas debido a que las reacciones de deterioro de las antocianinas son endotérmicas. En cuanto al pH, hay un efecto contrapuesto. Así, cuanto menor es el pH, más se ve favorecida la estructura del catión flavilio (forma más estable de las antocianinas). A pH 5 se ve favorecida la formación de especies pseudobase carbinol que son incoloras. Por el contrario, pH muy bajos dificultan el desarrollo de las levaduras que crecen mejor a pH de 4.0-4.5. Por lo tanto, para ambas variables, se encontró un valor de compromiso entre los factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas

y las condiciones que favorecen el crecimiento de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. La combinación óptima de dichos factores obtenida en este trabajo fue la señalada anteriormente.

A partir de las condiciones óptimas determinadas para las dos metodologías de extracción (ESLA y EAF) se obtuvieron unos extractos diluidos de antocianinas, que fueron concentrados en rotavapor. Los productos de la concentración se denominaron extracto de antocianinas obtenido por extracción sólido - líquido (ESL) y extracto de antocianinas obtenido por fermentación (EF). Los ESL y EF no presentaron diferencias significativas en cuanto a la concentración de antocianinas totales. Sin embargo, la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante fueron mayores en el extracto obtenido por fermentación.

Posteriormente, se realizó un estudio de degradación de las antocianinas presentes en los extractos ESL y EF. Por un lado se determinó la sensibilidad de los extractos al calentamiento mediante la determinación de las cinéticas de destrucción de antocianinas a diferentes temperaturas de tratamiento (55, 65, 75 y 85°C). Por otro lado, se estudió también dicha cinética de degradación con el tiempo de almacenamiento a dos temperaturas diferentes (5 y 25 °C). A partir de los resultados experimentales obtenidos, se observó que la velocidad de degradación de antocianinas aumentó con el incremento de la temperatura tanto en las experiencias de calentamiento como en las de almacenamiento. En general, todos los datos experimentales se ajustaron adecuadamente a una cinética de primer orden. Aunque, las antocianinas obtenidas por extracción sólido-líquido fueron más estables frente a la temperatura que las extraídas por fermentación, ambos tipos de extracto mostraron sensibilidad frente a este parámetro. Por ello, y de cara a su utilización industrial, se considera que lo más conveniente sería utilizar estos extractos en productos que, si requieren un tratamiento térmico, las temperaturas y los tiempos de tratamiento sean lo más reducidos posible. En caso de tener que almacenar los extractos, la temperatura a utilizar debería ser

de 5°C para que la velocidad de degradación de estos pigmentos-antioxidantes fuera lo más baja posible.

En conclusión respecto al método de extracción, la extracción sólido-líquido fue más adecuada debido a la mayor sencillez y rapidez del proceso, rendimiento más elevado y mayor estabilidad de las antocianinas.

Posteriormente, al extracto obtenido en las condiciones óptimas (extracción sólido-líquido, agente extractor etanol acidificado con ácido cítrico al 1%, proporción materia prima/solvente de extracción 1:3 kg/kg, temperatura de  $36\pm 1^\circ\text{C}$  y tiempo de extracción de 2 h) fue sometido a una doble concentración. Este concentrado (EA) se utilizó para la impregnación a vacío (IV) de cubos de melón. La operación de IV se realizó en 2 etapas: etapa 1 o etapa de vacío o presión reducida ( $IV_1$ ) y etapa 2 o etapa a presión atmosférica ( $IV_2$ ). En la primera etapa se realizaron 3 experiencias diferentes utilizando distintas presiones de vacío: 210, 130 y 53 mbar, por 10 minutos ( $t_1$ ) a  $25^\circ\text{C}$  en cada caso, con el propósito de evaluar el efecto de la presión reducida sobre la concentración de antocianinas totales en los cubos melón impregnados; mientras que en la segunda etapa el conjunto cubos de melón-EA se sometió a presión atmosférica durante 10 minutos ( $t_2$ ) a  $25^\circ\text{C}$ . La respuesta de la IV se cuantificó en términos de: fracción volumétrica (X), deformación volumétrica ( $\gamma$ ), porosidad efectiva ( $\epsilon_e$ ) y concentración de antocianinas totales (AT). En la etapa de vacío se observó una importante disminución del volumen de los cubos de melón, siendo esta respuesta mayor a 130 y 53 mbar. Se obtuvieron valores negativos de fracción volumétrica, que estarían indicando una salida de líquido nativo desde los espacios inter y extra celulares producidos durante la expansión del gas ocluido, siendo esta transferencia de masa mayor a las presiones de 130 y 53 mbar. Durante la etapa a presión atmosférica hubo un aumento del volumen de las muestras, por lo tanto el volumen de los poros se incrementó con respecto al valor inicial, observándose una importante impregnación de los cubos de melón con el EA siendo mayor a medida que aumentó el vacío producido en la cámara de impregnación durante la primera etapa. Referido al proceso global, se observó una alta cantidad de EA

impregnado en los cubos de melón, que aumentó con el grado de desgasificación; mientras que la porosidad efectiva manifestó una alta eficacia del proceso de IV especialmente a 53 mbar. La concentración de AT en los cubos de melón impregnado con EA a 210, 130 y 53 mbar, respectivamente, fue: 3.9, 7.1 y 13.9 mg cianidina-3-glucósido/100g melón. Por lo tanto, la impregnación de cubos de melón con EA, mediante la técnica de IV, fue mejor a presión de vacío de 53 mbar.

A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, se considera que podría ser viable tecnológicamente el desarrollo de alimentos funcionales frescos mediante la incorporación de extracto de antocianina procedente de arándano mediante la técnica de impregnación a vacío. De esta manera se conseguiría dar una salida a los excedentes de arándano fresco y además desarrollar nuevos productos con características funcionales.

## SUMMARY

Anthocyanins are flavonoids responsible for the colour of blueberries. These compounds are interesting due to their impact on food sensory attributes, since they may be used as natural food colorants. In addition, they offer potential health benefits because of their high antioxidant activity.

The objective of this PhD thesis was to study the extraction process of anthocyanins from fresh blueberries and to analyze the use of the extracts in food products formulation.

Firstly, the influence of the major process variables on the anthocyanin extraction from fresh blueberries was determined: temperature, pH, extraction time, type of solvent and raw material / solvent rate (RM/S). Two extraction methodologies were evaluated: solid-liquid extraction (ASLE) and extraction by fermentation (EFP). Different experimental designs were established in order to reduce the number of assays without affecting the significance of results.

These results were modelled by response surface methodology. It was observed that all the studied process variables had a significant influence on the extraction of anthocyanins from blueberries. The influence of temperature, pH and process time on anthocyanin extraction total yield (ATY) was studied in the first series of ASLE experiments. An ethanol-water solution (50:50 %v/v) was used as solvent and the relation RM/S was 1:3 kg/kg. The optimum values for the variables were: pH 2.1, temperature 36.6 °C and extraction time 1 h (the shortest time of all assays). Under these conditions ATY was 51 %, while higher and lower process variable values resulted in a lower ATY. The ATY decreases when pH increases. This fact was probably due to the degradation of the flavylium cation, being electron deficient and highly reactive, with formation of hemiacetal and chalcone, both unstable. ATY increases with a temperature increment up to 36.6 °C, that could be explained by the stimulation of extraction by the temperature increase because anthocyanins solubility and diffusion coefficient are also incremented. However, extracted anthocyanins were degraded above the aforementioned temperature because the heat effect may

have caused glycoside sugar loss at position 3 of the molecule and ring opening with subsequent production of colourless chalcone. The best ATY was obtained with the minimum time extraction. This may be attributed either to a solid-liquid phases equilibrium or to the counteractive effect of anthocyanin degradation on the anthocyanin extraction rate occurrence caused by water nucleophilic attack on the flavylum cation forming colourless compounds.

During the second series of ASLE experiments, RM/S and extraction time variables were analyzed. The extraction solvent was ethanol acidified with citric acid (1%), the extraction temperature was  $36 \pm 1$  °C and pH  $3.5 \pm 0.1$ . Under these conditions the maximum anthocyanin extraction was obtained (57%) after 2 h 12 min of extraction and using a RM/S of 1:2.8 kg/kg, while an increase or decrease of the studied variables caused ATY decrease. The ATY increase due to RM/S increment was ascribed to a higher concentration gradient between blueberry particles and the solvent thus mass transfer process was enhanced. Nevertheless, an increase of the RM/S above the optimum caused a ATY decrease, probably due to the higher amount of ethanol molecules in the medium. Ethanol, as well as water, can attack the flavylum cation thus generating more unstable anthocyanin structures. Likewise, it was observed that the longer the extraction time, the higher the ATY value obtained. In the same way, extraction decreased with longer extraction times. This fact suggests that extraction yield incremented until reaching anthocyanin concentration equilibrium between blueberry particles and solvent, and then, the yield decreased due to anthocyanin deterioration.

The two series of assays showed that the best conditions for anthocyanin extraction were: acidified ethanol with citric acid (1 %) as extractant, 1:3 kg/kg as raw material / extraction solvent rate, temperature  $36 \pm 1$  °C and extraction time of 2 h.

In the AEF experiments, soluble solids concentration of the substrate was adjusted to 12 °Brix and fermentation was carried out using *Saccharomyces cerevisiae* strains during 72 h. In this case, temperature and pH were the studied parameters. The combination of a temperature of 28 °C

and pH 4.2 yielded the highest ATY value (49 %). An increase or decrease of any of the studied factors decreased ATY values. Two aspects were considered for this extraction methodology: factors that affect anthocyanin stability and conditions that favour the growth of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. Temperature and pH are very important in this aspect. Temperature increase to the optimum value enhanced yeast growth and ethanol production in the medium. As a result, anthocyanin extraction was increased as well as solubility and diffusion coefficient. Temperatures above optimum affected yeast growth and, therefore, ethanol production was reduced. In addition chalcone production is enhanced since anthocyanin deterioration is an endothermic reaction. Regarding pH, there is an opposite effect. Lower pH values are more beneficial for the flavylium cation structure, which is the most stable anthocyanin. At pH 5 the colourless carbinol pseudobase species formation is favoured, while low pH inhibits yeast development that proliferates within 4.0-4.5 pH range. Consequently, a compromise value between factors affecting anthocyanins stability and favourable conditions for *Saccharomyces cerevisiae* yeast growth was determined. The aforementioned combination of factors was the optimum obtained in this study.

The anthocyanin extracts obtained under the conditions determined for both extraction methods (ASLE and AEF) were diluted extracts and were concentrated using a rotary evaporator. Concentrated products were defined as anthocyanin extract obtained by solid-liquid extraction (SLEP) and anthocyanin extract obtained by fermentation (EFP). No significant differences in total anthocyanin concentration were found between SLEP and EFP. However, total phenols concentration and antioxidant activity were higher in the EFP than in the SLEP.

A study of degradation of anthocyanin in SLEP and EFP extracts was performed. Firstly, extract susceptibility to heating was established by determination of destruction kinetics of anthocyanins at different temperature treatments (55, 65, 75 and 85 °C). Next, degradation kinetics during storage at two different temperatures (5 and 25 °C) was also studied. The experimental

results showed that anthocyanin degradation rate increased with temperature rise during heating as well as during storage experiments. In general, all experimental data fit adequately to first-order kinetics. Although anthocyanins obtained by solid-liquid extraction were more stable than those extracted by fermentation during temperature assays, both extracts were temperature susceptible. Therefore, results suggest that these extracts could be used for products that require low temperature and short time heat treatments. With regard to storage conditions of extracts, 5 °C should be the adequate temperature to keep degradation rate of the antioxidant pigments as low as possible

In conclusion, the solid-liquid extraction method was the most adequate due to the simplicity and the speed of the process, the higher yield obtained and the higher stability of the anthocyanin extracted.

The extract obtained under the optimum conditions (solid-liquid extraction, ethanol extractant acidified with citric acid 1 %, 1:3 kg/kg raw material / extraction solvent, temperature  $36 \pm 1$  °C and 2 h of extraction time) was then double concentrated. The concentrated (AE) was used for vacuum impregnation (IV) of melon cubes. Vacuum impregnation (IV) was performed in two stages: stage 1, vacuum or reduced pressure stage (IV<sub>1</sub>), and stage 2, atmospheric pressure stage (IV<sub>2</sub>). In the first stage three experiments were performed using different vacuum pressures: 210, 130 y 53 mbar for 10 min (t<sub>1</sub>) at 25°C in order to evaluate the effect of reduced pressure on total anthocyanin concentration in the impregnated melon cubes. In the second stage the set of melon cubes –AE was submitted to atmospheric pressure for 10 min (t<sub>2</sub>) at 25 °C. The response to IV was measured and expressed as volumetric fraction (X), volumetric deformation (Y), effective porosity ( $\epsilon_e$ ) and total anthocyanin concentration (TA). During the vacuum stage, a significant volume decrease was observed and the decrease was higher at 130 and 53 mbar. The negative values of the volumetric fraction suggested the exit of native liquid from inter and extra cellular spaces during expansion of the occluded gas, and this mass transfer process was greater at 130 and 53 mbar. Samples increased their

volume during the atmospheric pressure stage. Consequently, pore volume increased compared to the initial value and a significant impregnation of melon cubes with AE was observed. These values were higher as the vacuum in the impregnation chamber increased during stage 1. Regarding to the global process, a large amount of AE impregnating melon cubes was observed, and increased with the degree of degasification. In addition, effective porosity demonstrated the IV process efficacy particularly at 53 mbar. The AT concentration in AE impregnated melon cubes at 210, 130 and 53 mbar, was 3.9, 7.1 and 13.9 mg cyanidin-3-glucoside/100g melon, respectively. Therefore, AE melon cubes impregnation using IV methodology showed the best response to vacuum pressure at 53 mbar.

The results obtained in this PhD thesis suggest the feasibility of developing functional fresh foods using the vacuum impregnation method to incorporate anthocyanin extract from blueberries. Thus, the surplus of fresh blueberry could be used in the development of new food products with functional characteristics.

## RESUM

Les antocianines són flavonoides responsables del color dels fruits del nabiu. Aquests compostos són interessants per l'impacte que tenen sobre les característiques sensorials dels aliments, ja que es poden utilitzar com a colorants alimentaris naturals. A més, a causa de la seua elevada activitat antioxidant, presenten beneficis potencials per a la salut.

En aquesta tesi doctoral s'aborda l'estudi del procés d'extracció d'antocianines a partir de nabius frescos i l'ús dels extractes obtinguts en un producte alimentari.

En primer lloc, es va determinar la influència de les principals variables del procés en l'extracció d'antocianines de nabiu fresc: temperatura, pH, temps d'extracció, tipus de solvent i proporció de matèria primera/solvent (MP/S). Es van avaluar dues metodologies d'extracció: extracció sòlid-líquid (ESLA) i extracció per fermentació (EAF). Per a reduir el nombre d'experiències a realitzar sense que això influïra en la significació dels resultats obtinguts, es van realitzar diferents dissenys experimentals.

Els resultats van ser modelitzats mitjançant superfícies de resposta. S'hi va observar que totes les variables de procés estudiades van tenir una influència significativa en l'extracció d'antocianines de nabius. Així, en una primera sèrie d'experiències d'ESLA, es va estudiar la influència de la temperatura, el pH i el temps de procés en el rendiment d'extracció d'antocianines totals (RAT). En totes aquestes experiències es va utilitzar com a solvent una solució d'etanol-aigua (50:50 %v/v) i una MP/S d'1:3 kg/kg. Els valors òptims per a les variables de procés van ser: pH 2,1, temperatura 36,6 °C i temps d'extracció 1 h (el temps més breu dels assajats). En aquestes condicions, el RAT va ser de 51%. Valors superiors i inferiors d'aquestes variables de procés van resultar en un menor RAT. Probablement, la disminució del RAT amb l'increment del pH es va deure a una degradació del catió flavili, ja que aquest és deficient en electrons, i per tant molt reactiu, motiu pel qual dóna lloc a formació d'hemiacetal i calcona, ambdues inestables.

L'augment del RAT amb l'increment de la temperatura fins a 36,6 °C podria ser causat perquè l'elevació de la temperatura estaria afavorint l'extracció en augmentar la solubilitat dels antocians i el coeficient de difusió. No obstant això, per a temperatures superiors, les antocianines extretes es van degradar, possiblement perquè l'efecte de la calor va produir la pèrdua del sucre glicosilat en la posició 3 de la molècula i l'obertura d'anell, amb la conseqüent producció de calcones incolores. Anteriorment, es va assenyalar que el millor RAT es va obtenir per al mínim temps d'extracció considerat. Això podria ser causat pel fet que es va aconseguir l'equilibri entre la fase sòlida i la fase líquida. També podria haver-se degut al fet que a partir d'aquest mínim temps, el ritme d'extracció de les antocianines es va veure contrarestat amb una major degradació d'aquestes, produïda per l'atac nucleofílic de l'aigua al catió flavili i la formació de compostos incoloros.

En una segona sèrie d'experiències d'ESLA, es va estudiar la relació MP/S i, de nou, el temps d'extracció. En totes aquestes experiències, el solvent d'extracció utilitzat va ser etanol acidificat amb àcid cítric a l'1%, la temperatura d'extracció es va fixar en  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  i el pH, en  $3,5 \pm 0,1$ . En aquestes condicions, l'extracció d'antocianines va ser màxima (57%) a temps d'extracció de 2,0 h 12 minuts i MP/S 1:2,8 kg/kg, mentre que l'augment o disminució de les variables estudiades va provocar una disminució del RAT. L'augment del RAT amb l'increment de la MP/S va ser atribuït a un major gradient de concentració entre les partícules de nabiu i el solvent, la qual cosa va afavorir la transferència de massa. No obstant això, un augment de l'MP/S per sobre de l'òptim va provocar una disminució en el RAT, possiblement perquè en haver-hi una major quantitat de solvent, més molècules d'etanol estan presents en el medi. Per tant, hi ha major probabilitat que l'etanol, igual que l'aigua, actue com a nucleòfil i ataque el catió flavili i genere estructures d'antocianines més inestables. De la mateixa forma, s'hi va observar que el RAT era major a mesura que augmentava el temps d'extracció fins al valor òptim, mentre que per a temps d'extracció majors, era menor. Això es va atribuir al fet que l'extracció va augmentar fins a aconseguir un equilibri en la concentració

d'antocianines entre les partícules de nabius i el solvent, i després va disminuir a causa del deteriorament de les antocianines.

A partir d'aquestes dues sèries d'experiències, es va obtenir que les millors condicions per a l'extracció d'antocianines van ser: agent extractor, etanol acidificat amb àcid cítric a l'1%; proporció matèria primera/solvent d'extracció d'1:3 kg/kg; temperatura de  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  i un temps d'extracció de 2 h.

En una altra sèrie d'experiències es va estudiar l'EAF. Per a fer-ho, es va ajustar la concentració de sòlids solubles del substrat en 12° Brix i es va realitzar la fermentació amb ceps de *Saccharomyces cerevisiae* durant 72 h. En aquest cas, els paràmetres avaluats van ser la temperatura i el pH. La combinació de factors que va permetre obtenir el major RAT (49%) va ser: temperatura  $28^{\circ}\text{C}$  i pH 4,2. Un augment o disminució de qualsevol dels factors estudiats va provocar disminució en el RAT. Per al cas d'aquesta metodologia d'extracció es van considerar dos aspectes: d'una banda, els factors que influeixen en l'estabilitat de les antocianines, i d'una altra, les condicions que afavoreixen el creixement dels llevats *Saccharomyces cerevisiae*. Des d'aquest punt de vista, la temperatura i el pH hi tenen una gran influència. L'increment de la temperatura fins al valor òptim estaria afavorint el creixement dels llevats i per tant la producció d'etanol en el medi. Això, al seu torn, incrementa l'extracció d'antocianines i també la solubilitat i el coeficient de difusió d'aquestes. Temperatures majors van afectar el creixement dels llevats i, en conseqüència, la producció d'etanol; a més d'afavorir la producció de calcones, ja que les reaccions de deterioració de les antocianines són endotèrmiques. Respecte al pH, hi ha un efecte contraposat. Així, com menor és el pH, més es veu afavorida l'estructura del catió flavili (forma més estable de les antocianines). A pH 5 es veu afavorida la formació d'espècies pseudobase carbinol, que són incolores. Contràriament, pH molt baixos dificulten el desenvolupament dels llevats, que creixen millor a pH de 4,0-4,5. Per tant, per a ambdues variables, es va trobar un valor de compromís entre els factors que influeixen en l'estabilitat de les antocianines i les condicions que afavoreixen el

creixement dels llevats *Saccharomyces cerevisiae*. La combinació òptima d'aquests factors obtinguda en aquest treball és l'assenyalada anteriorment.

A partir de les condicions òptimes determinades per a les dues metodologies d'extracció (ESLA i EAF), s'hi van obtenir uns extractes diluïts d'antocianines, que van ser concentrats en rotavapor. Els productes de la concentració es van denominar extracte d'antocianines obtingut per extracció sòlid-líquid (ESL) i extracte d'antocianines obtingut per fermentació (EF). Els ESL i EF no van presentar diferències significatives en la concentració d'antocianines totals. No obstant això, la concentració de fenols totals i l'activitat antioxidant van ser majors en l'extracte obtingut per fermentació.

Posteriorment, es va realitzar un estudi de degradació de les antocianines presents en els extractes ESL i EF. D'una banda, es va determinar la sensibilitat dels extractes a l'escalfament mitjançant la determinació de les cinètiques de destrucció d'antocianines a diferents temperatures de tractament (55, 65, 75 i 85°C). D'una altra banda, es va estudiar també aquesta cinètica de degradació amb el temps d'emmagatzematge a dues temperatures diferents (5 i 25 °C). A partir dels resultats experimentals obtinguts, es va observar que la velocitat de degradació d'antocianines va augmentar amb l'increment de la temperatura, tant en les experiències d'escalfament com en les d'emmagatzematge. En general, totes les dades experimentals es van ajustar adequadament a una cinètica de primer ordre. Encara que les antocianines obtingudes per extracció sòlid-líquid van ser més estables davant de la temperatura que les extretes per fermentació, tots dos tipus d'extracte van mostrar sensibilitat davant d'aquest paràmetre. Per això, i de cara a la seua utilització industrial, es considera que el més convenient seria utilitzar aquests extractes en productes que, si requereixen un tractament tèrmic, les temperatures i els temps de tractament siguin el més reduïts possible. En cas d'haver d'emmagatzemar els extractes, la temperatura a utilitzar hauria de ser de 5°C, perquè la velocitat de degradació d'aquests pigments antioxidants fóra el més baixa possible.

En conclusió respecte al mètode d'extracció, l'extracció sòlid-líquid va ser més adequada a causa de la major senzillesa i rapidesa del procés, el rendiment més elevat i la major estabilitat de les antocianines. Posteriorment a l'extracte obtingut en les condicions òptimes (extracció sòlid-líquid, agent extractor etanol acidificat amb àcid cítric a l'1%, proporció matèria primera/solvent d'extracció 1:3 kg/kg, temperatura de  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  i temps d'extracció de 2 h), va ser sotmès a una doble concentració. Aquest concentrat (EA) es va utilitzar per a la impregnació al buit (IV) de cubs de meló. L'operació d'IV es va realitzar en 2 etapes: etapa 1 o etapa de buit o pressió reduïda (IV1) i etapa 2 o etapa a pressió atmosfèrica (IV2). En la primera etapa es van realitzar 3 experiències diferents utilitzant diferents pressions de buit: 210, 130 i 53 mbar, durant 10 minuts ( $t_1$ ) a  $25^{\circ}\text{C}$  en cada cas, amb el propòsit d'avaluar l'efecte de la pressió reduïda sobre la concentració d'antocianines totals en els cubs de meló impregnats; mentre que en la segona etapa, el conjunt cubs de meló - EA es va sotmetre a pressió atmosfèrica durant 10 minuts ( $t_2$ ) a  $25^{\circ}\text{C}$ . La resposta de l'IV es va quantificar en termes de: fracció volumètrica (X), deformació volumètrica ( $\gamma$ ), porositat efectiva ( $\epsilon_i$ ) i concentració d'antocianines totals (AT). En l'etapa de buit es va observar una important disminució del volum dels cubs de meló. Aquesta resposta fou major a 130 i 53 mbar. S'hi van obtenir valors negatius de fracció volumètrica, que estarien indicant una eixida de líquid natiu des dels espais intercel·lulars i extracel·lulars produïts durant l'expansió del gas oclòs. Aquesta transferència de massa va ser major a les pressions de 130 i 53 mbar. Durant l'etapa a pressió atmosfèrica va haver-hi un augment del volum de les mostres, per tant el volum dels porus es va incrementar respecte al seu valor inicial. S'observà una important impregnació dels cubs de meló amb l'EA, que va ser major a mesura que va augmentar el buit produït en la cambra d'impregnació durant la primera etapa. Respecte al procés global, es va observar una elevada quantitat d'EA impregnat en els cubs de meló, que va augmentar amb el grau de desgasificació; mentre que la porositat efectiva va manifestar una alta eficàcia del procés d'IV especialment a 53 mbar. La concentració d'AT en els cubs de meló impregnat amb EA a 210, 130 i 53 mbar, respectivament, va ser 3,9, 7,1 i 13,9 mg cianidina-3-glucòsid /

100 g meló. Per tant, la impregnació de cubs de meló amb EA mitjançant la tècnica d'IV va ser millor a la pressió de buit de 53 mbar.

A partir dels resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral, es considera que podria ser viable tecnològicament el desenvolupament d'aliments funcionals frescos mitjançant la incorporació d'extracte d'antocianina procedent de nabiu mitjançant la tècnica d'impregnació al buit. D'aquesta manera s'aconseguiria donar una eixida als excedents de nabiu fresc i, a més, desenvolupar nous productes amb característiques funcionals.

---

# ÍNDICE

---

---

**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
I.1. El arándano	2
I.1.1. Taxonomía	2
I.1.2. El fruto	3
I.1.3. Valor nutricional	4
I.1.4. Situación actual del cultivo del arándano en Argentina	5
I.2. Las antocianinas	12
I.2.1. Estructura química	13
I.2.2. Factores que afectan su estabilidad	14
I.2.2.1. pH	15
I.2.2.2. Temperatura	17
I.2.2.3. Agua	19
I.2.2.4. Copigmentación	19
I.2.2.5. Oxígeno	23
I.2.2.6. Luz	24
I.2.3. Propiedades colorantes y antioxidantes de las antocianinas	25
I.3. Extracción sólido – líquido	30
I.4. Extracción de antocianinas	36
I.5. Determinación de las condiciones de extracción de antocianinas	39
I.6. Incorporación de antocianinas a matrices alimenticias por impregnación a vacío	41

---

<b>II. OBJETIVOS</b>	46
II.1. Objetivo general	47
II.2. Objetivos específicos	47
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	49
III.1. Materia prima	50
III.2. Obtención de los extractos de antocianina	52
III.2.1. Operaciones previas comunes a la ESLA y a la EAF	54
III.2.2. Diseño experimental	56
III.2.2.1. Diseño experimental para la primera serie de experiencias de extracción sólido-líquido de antocianinas	59
III.2.2.2. Diseño experimental para la segunda serie de experiencias de extracción sólido-líquido de antocianinas	63
III.2.2.3. Diseño experimental para las experiencias de extracción de antocianinas por fermentación	64
III.2.3. Extracción sólido-líquido de antocianinas	66
III.2.3.1. Primera serie de experiencias de extracción sólido-líquido de antocianinas	66
III.2.3.2. Segunda serie de experiencias de extracción sólido-líquido de antocianinas	67
III.2.4. Extracción de antocianinas por fermentación	68
III.3. Estudio de degradación térmica	71
III.3.1. Orden de la cinética de degradación de las antocianinas	73
III.3.2. Constante de velocidad de degradación	74
III.3.3. Tiempo de vida media	74
III.3.4. Coeficiente de temperatura $Q_{10}$	75

---

---

	Índice
III.3.5. Energía de activación	76
III.3.6. Funciones termodinámicas	77
III.4. Estudio de degradación durante el almacenamiento	80
III.5. Utilización de extracto de antocianinas en la industria alimentaria	81
III.5.1. Fracción volumétrica	86
III.5.2. Deformación volumétrica	87
III.5.3. Porosidad efectiva	88
III.6. Determinaciones analíticas	89
III.6.1. Sólidos solubles	90
III.6.2 pH	90
III.6.3 Antocianinas totales	90
III.6.4. Perfil de antocianinas	93
III.6.5. Fenoles totales	94
III.6.6. Actividad antioxidante	95
III.6.6.1. Método ABTS	95
III.6.6.2. Método DPPH	96
III.6.7. Rendimiento de extracción de antocianinas totales	97
III.6.8. Degradación de antocianinas	98
III.6.9. Composición mineral	98
III.6.10. Volumen de melón	100
III.6.11. Densidad del melón y del líquido de impregnación	101
III.7. Análisis estadístico	101
III.7.1. Obtención de las mejores condiciones de extracción de antocianinas	101

---

	Índice
III.7.2. Análisis de comparación de medias	102
III.7.3. Análisis de regresión	102
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>106</b>
IV.1. Primera serie de experiencias de extracción sólido-líquido de antocianinas	107
IV.2. Segunda serie de experiencias de extracción sólido-líquido de antocianinas	116
IV.3. Extracción de antocianinas por fermentación	122
IV.4. Comparación de los extractos de antocianinas obtenidos por ESLA y por EAF. Definición de las mejores condiciones de extracción	126
IV.5. Estudio de degradación térmica de antocianinas	132
IV.5.1. Cinética de la reacción de degradación de antocianinas durante el calentamiento	138
IV.5.1.1. Modelo cinético de orden cero	138
IV.5.1.2. Modelo cinético de orden uno	140
IV.5.1.3. Selección de modelo de mejor ajuste	143
IV.5.2. Análisis de parámetros de modelos empíricos	146
IV.5.2.1. Constante de velocidad de degradación y tiempo de vida media	146
IV.5.2.2. Coeficiente de temperatura	149
IV.5.2.3. Modelo de la ecuación de Arrhenius: Energía de activación	150
IV.5.3. Análisis de parámetros de termodinámica estadística: Modelo de Eyring	152

---

	Índice
IV.6. Estudio de degradación de antocianinas durante el almacenamiento	155
IV.6.1. Cinética de la reacción de velocidad de degradación de antocianinas durante el almacenamiento	160
IV.6.1.1. Modelo cinético de orden cero	160
IV.6.1.2. Modelo cinético de orden uno	162
IV.6.1.3. Selección de modelo de mejor ajuste	165
IV.6.2. Análisis de parámetros de modelos empíricos: Constante de velocidad de degradación y tiempo de vida media	167
IV.7. Proceso de obtención de extracto de antocianinas	170
IV.8. Composición mineral	175
IV.9. Utilización de extracto de antocianinas en la industria alimentaria	176
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>184</b>
<b>VI. BIBLIGRAFÍA</b>	<b>187</b>

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura I.1. Cultivo de arándano de la provincia de Entre Ríos, Argentina	3
Figura I.2. Frutos de arándanos	4
Figura I.3. Distribución de la superficie plantada con arándanos en el mundo	6
Figura I.4. Distribución de la superficie plantada con arándanos en la República Argentina	7
Figura I.5. Distribución varietal de arándanos en el NEA	8
Figura I.6. Arándano exportado por Argentina	10
Figura I.7. Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas	14
Figura I.8. Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH.	16
Figura I.9. Interacciones de antocianinas.	20
Figura I.10. Formación de complejo a través de interacción intermolecular.	21
Figura I.11. Copigmentación como efecto hiperocrómico y desplazamiento batocrómico.	23
Figura I.12. Difusión del soluto en el disolvente	32
Figura I.13. Etapas en el proceso de transferencia de materia en un alimento poroso sumergido en un líquido	43
Figura III.1. Arándanos de la variedad O'Neal	50
Figura III.2. Cultivo de arándano de la variedad O'Neal	51
Figura III.3. Bandejas de polietilentereftalato (clamshells) donde fueron almacenados los arándanos	52
Figura III.4. Diagrama de flujo de obtención de los extractos de antocianina	53

---

Figura III.5. Arándanos de la variedad O'Neal en las bandejas donde se realizó el lavado	54
Figura III.6. Factores y región experimental de las superficies de respuesta empleadas en la extracción de antocianinas	58
Figura III.7. Preparación del inóculo de extracción	69
Figura III.8. Metodología de extracción de antocianinas por fermentación	70
Figura III.9. Cámara de IV	82
Figura III.10. Condiciones de la etapa 1 o etapa de vacío (IV <sub>1</sub> ) de la operación de IV	83
Figura III.11. Condiciones de la etapa 2 o etapa a presión atmosférica (IV <sub>2</sub> ) de la operación de IV	84
Figura IV.1. Superficie de respuesta para el RAT en función de temperatura y el pH (tiempo de extracción=1.0 h) en la primera serie de experiencias de ESLA	110
Figura IV.2. Contornos de la superficie del RAT estimado en función de la temperatura y el pH (tiempo de extracción=1.0 h) en la primera serie de experiencias de ESLA	111
Figura IV.3. Superficie de respuesta para el RAT en función del pH y el tiempo de extracción (temperatura=36.6°C) en la primera serie de experiencias de ESLA	112
Figura IV.4. Contornos de la superficie del RAT estimado en función del pH y el tiempo de extracción (temperatura=36.6°C) en la primera serie de experiencias de ESLA	112
Figura IV.5. Superficie de respuesta para el RAT en función de la temperatura y el tiempo de extracción (pH=2.12) en la primera serie de experiencias de ESLA	114
Figura IV.6. Contornos de la superficie del RAT estimado en	114

---

función de la temperatura y el tiempo de extracción (pH=2.12) en la primera serie de experiencias de ESLA	
Figura IV.7. Superficie de respuesta para el RAT en función del tiempo de extracción y la proporción de materia prima / solvente en la segunda serie de experiencias ESLA	121
Figura IV.8. Contornos de la superficie del RAT estimado en función del tiempo de extracción y la proporción de materia prima / solvente en la segunda serie de experiencias de ESLA	121
Figura IV.9. Superficie de respuesta para el RAT en función de la temperatura y el pH en la serie de experiencias de EAF	124
Figura IV.10. Contornos de la superficie del RAT estimado en función de la temperatura y el pH en la serie de experiencias de EAF	125
Figura IV.11. Degradación de antocianinas en el ESL durante el calentamiento a 55, 65, 75 y 85°C.	134
Figura IV.12. Degradación de antocianinas en el EF durante el calentamiento a 55, 65, 75 y 85°C	134
Figura IV.13. Comparación de la antocianina degradada durante el calentamiento a 55°C en el ESL y el EF	136
Figura IV.14. Comparación de la antocianina degradada durante el calentamiento a 65°C en el ESL y el EF	136
Figura IV.15. Comparación de la antocianina degradada durante el calentamiento a 75°C en el ESL y el EF	137
Figura IV.16. Comparación de la antocianina degradada durante el calentamiento a 85°C en el ESL y el EF	137
Figura IV.17. Degradación de antocianinas en el ESL durante el calentamiento a 55, 65, 75 y 85°C	139
Figura IV.18. Degradación de antocianinas en el EF durante el	139

---

---

calentamiento a 55, 65, 75 y 85°C	
Figura IV.19. Degradación de antocianinas en el ESL durante el calentamiento a 55, 65, 75 y 85°C	141
Figura IV.20. Degradación de antocianinas en el EF durante el calentamiento a 55, 65, 75 y 85°C	141
Figura IV.21. Efecto de la temperatura sobre la constante de velocidad de degradación de las antocianinas presentes en los ESL y EF	151
Figura IV.22. Relación entre la velocidad de degradación de las antocianinas presentes en los ESL y EF en función de la temperatura, basada en la teoría del estado de transición (Ecuación de Eyring)	153
Figura IV.23. Degradación de antocianinas en el ESL durante el almacenamiento a 5 y 25°C	157
Figura IV.24. Degradación de antocianinas en el EF durante el almacenamiento a 5 y 25°C	157
Figura IV.25. Comparación de la antocianina degradada durante el almacenamiento a 5°C en el ESL y el EF	158
Figura IV.26. Comparación de la antocianina degradada durante el almacenamiento a 25°C en el ESL y el EF	159
Figura IV.27. Degradación de antocianinas en el ESL durante el almacenamiento a 5 y 25°C	161
Figura IV.28. Degradación de antocianinas en el EF durante el almacenamiento a 5 y 25°C	161
Figura IV.29. Degradación de antocianinas en el ESL durante el almacenamiento a 5 y 25°C	163
Figura IV.30. Degradación de antocianinas en el EF durante el almacenamiento a 5 y 25°C	163

---

Figura IV.31. Obtención de un extracto de antocianinas de arándanos mediante extracción sólido-líquido y proceso doble de concentración	171
Figura IV.32. Perfil de antocianinas en arándanos	173
Figura IV.33. Perfil de antocianinas en el EA	174
Figura IV.34. Relación entre impregnación y concentración de antocianinas totales en los cubos de melón impregnados con EA, al final de la etapa de vacío (0 → 1) y al final de la etapa a presión atmosférica (1 → 2)	180
Figura IV.35. Impregnación y concentración de antocianinas totales (AT) para las diferentes presiones de trabajo de la primera etapa del proceso de IV	181
Figura IV.36. Cubos de melón impregnados con EA	182

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla I.1. Composición del arándano	5
Tabla III.1. Diseño experimental para la primera serie de experiencias de extracción sólido-líquido de antocianinas	60
Tabla III.2. Diseño experimental para la segunda extracción sólido-líquido de antocianinas	64
Tabla III.3. Diseño experimental para la extracción de antocianinas por fermentación	65
Tabla III.4. Condiciones de análisis y rango de la curva de calibrado para la cuantificación de minerales	100
Tabla IV.1. Rendimiento de extracción de antocianinas totales (RAT) en la primera serie de experiencias de ESLA	108
Tabla IV.2. Rendimiento de extracción de antocianinas totales (RAT) en la segunda serie de experiencias de ESLA	118
Tabla IV.3. Rendimiento de extracción de antocianinas totales (RAT) en la serie de experiencias de EAF	123
Tabla IV.4. Antocianinas totales y fenoles totales de los extractos de antocianinas	129
Tabla IV.5. Actividad antioxidante de los extractos de antocianinas	130
Tabla IV.6. Resumen comparativo de las metodologías de extracción de antocianinas de arándanos estudiadas	131
Tabla IV.7. Porcentaje de degradación de antocianinas después de un tiempo de calentamiento de 24 h a las temperaturas de 55, 65, 75 y 85°C	133
Tabla IV.8. Modelo de regresión de orden cero y parámetros estadísticos de bondad de ajuste	140
Tabla IV.9. Modelo de regresión de orden uno y parámetros estadísticos de bondad de ajuste	142

---

Tabla IV.10. Ajuste de los modelos de orden cero y uno para el ESL a distintas temperaturas de calentamiento	143
Tabla IV.11. Ajuste de los modelos de orden cero y uno para el EF a distintas temperaturas de calentamiento	145
Tabla IV.12. Efecto de la temperatura en la $k$ ( $h^{-1}$ ) de las antocianinas en los ESL y EF a distintas temperaturas de calentamiento	147
Tabla IV.13. Efecto de la temperatura en el $t_{1/2}$ (h) de las antocianinas en los ESL y EF a distintas temperaturas de calentamiento	147
Tabla IV.14. Efecto de la temperatura en el valor de $Q_{10}$ de la degradación de antocianinas en los ESL y EF	149
Tabla IV.15. Ajustes a la ecuación de Arrhenius para la degradación de antocianinas en los ESL y EF	151
Tabla IV.16. Funciones termodinámicas de activación para la degradación de antocianinas presentes en el ESL y EF	154
Tabla IV.17. Modelo de regresión de orden cero y parámetros estadísticos de bondad de ajuste	162
Tabla IV.18. Modelo de regresión de orden uno y parámetros estadísticos de bondad de ajuste	164
Tabla IV.19. Ajuste de los modelos de orden cero y uno para el ESL a distintas temperaturas de almacenamiento	166
Tabla IV.20. Ajuste de los modelos de orden cero y uno para el EF a distintas temperaturas de almacenamiento	166
Tabla IV.21. Efecto de la temperatura en la $k$ ( $días^{-1}$ ) de las antocianinas en los ESL y EF a distintas temperaturas de almacenamiento	167
Tabla IV.22. Efecto de la temperatura en el $t_{1/2}$ (días) de las	169

antocianinas en los ESL y EF a distintas temperaturas de almacenamiento

Tabla IV.23. Concentración de antocianinas totales y perfil de antocianinas individuales identificadas en bayas de arándanos y en el EA 172

Tabla IV.24. Composición mineral del EA y de las bayas de arándanos 175

Tabla IV.25. Respuestas de la impregnación a vacío 177

---

# **NOMENCLATURA**

---

Símbolo	Descripción	Unidades
A	Superficie de contacto partícula – disolución	m <sup>2</sup>
ABTS	2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) o radical ABTS <sup>•+</sup>	
APAMA	Asociación de Productores de Arándanos de la Mesopotamia Argentina	
AT	Antocianinas totales	
AT <sub>arándanos</sub> ó AT <sub>a</sub>	Concentración de antocianinas totales en los arándanos	mg cyn-3-gluc./100g arándano
AT <sub>EDA</sub>	Antocianinas totales presentes en el EDA	mg cyn-3-gluc./100gEDA
C	Concentración de antocianinas al tiempo t	mg cyn-3-gluc./100mL
C	Concentración de soluto de la disolución	kg/m <sup>3</sup>
C <sub>0</sub>	Concentración inicial de antocianinas	mg cyn-3-gluc./100 mL
C <sub>d</sub>	Concentración del soluto en el seno de la disolución	kg/m <sup>3</sup>
C <sub>i</sub>	Concentración del soluto en el solvente en la interfase sólido-líquido	kg/m <sup>3</sup>
D <sub>L</sub>	Difusividad del soluto a través del disolvente	m <sup>2</sup> /s

---

---

DPPH	2,2-difenil-1-picril hidrazilo o radical DPPH*	
DW	Durbin-Watson	
Ea	Energía de activación	kJ/mol
EA	Extracto de antocianinas. Dado que el ESL, fue el producto obtenido con la metodología de extracción seleccionada como la más adecuada para recuperar los fitonutrientes, se lo concentró por segunda vez y se denominó EA	
EAA	Equivalente de ácido ascórbico	
EAF	Extracción de antocianinas por fermentación. Se denominó como EAF a la metodología de extracción que consistió en el proceso fermentativo	
EDA	Extracto diluido de antocianinas. Es el extracto, obtenido por extracción sólido-líquido o a través del proceso fermentativo, que no ha sido concentrado	
EF	Extracto de antocianinas obtenido por fermentación. El producto obtenido en el proceso fermentativo y concentrado se llamó EF	
ESL	Extracto de antocianinas obtenido por extracción sólido-líquido. El producto obtenido en el proceso ESLA y concentrado se llamó ESL.	
ESLA	Extracción de antocianinas mediante extracción sólido-líquido. Se denominó como ESLA a la	

---

---

---



---

	metodología de extracción.	
FD	Factor de dilución	
GAE	Equivalente de ácido gálico	
h	Constante de Planck ( $6.626 \cdot 10^{-34}$ )	J s
IV	Impregnación a vacío	
IV <sub>1</sub>	Etapas de vacío o presión reducida de la operación de IV	
IV <sub>2</sub>	Etapas de a presión atmosférica de la operación de IV	
k	Constante de velocidad de degradación de antocianinas	h <sup>-1</sup> o días <sup>-1</sup>
k <sub>0</sub>	Factor de frecuencia o factor preexponencial	min
k <sub>B</sub>	Constante de Boltzmann ( $1.381 \cdot 10^{-23}$ )	J/K
k <sub>L</sub>	Coefficiente de transferencia de materia	m/s
k <sup>o</sup>	Número de factores analizados	
k <sub>T</sub>	Constante de velocidad del proceso a la temperatura T	h <sup>-1</sup>
k <sub>T+10</sub>	Constante de velocidad a una temperatura 10°C mayor	h <sup>-1</sup>
l	Longitud de paso de celda	cm
LI	Líquido de impregnación	

---



---

---

---

M	Masa de soluto transferida	kg
M <sub>1</sub>	Masa de melón luego de la etapa de vacío	kg
M <sub>a</sub>	Masa de arándanos	g
MEA	Media del error absoluto	
M <sub>EDA</sub>	Masa del extracto	g
M <sub>f</sub>	Masa de melón después del proceso de IV	kg
MHD	Mecanismo hidrodinámico	
M <sub>i</sub>	Masa de melón inicial	kg
M <sub>LI</sub>	Masa del líquido de impregnación	kg
MP/S	Proporción de materia prima / solvente de extracción	Kg/kg
MRS	Metodología de superficie de respuesta	
NEA	Noreste argentino	
NOA	Noroeste argentino	
N <sub>s</sub>	Densidad de flujo de materia	kg/(m <sup>2</sup> s)
P <sub>1</sub>	Presión de vacío en el proceso de IV	mbar
P <sub>2</sub>	Presión atmosférica en el proceso de IV	mbar
pH	Potencial de hidrógeno	
PM	Masa molecular para cianidina-3-glucósido (449.2)	g/mol

---

---

---



---

PS	Proporción de solvente utilizado para 1 parte de materia prima (MP)	
$Q_{10}$	Coeficiente de temperatura	
R	Constante universal de los gases (8.314)	J/mol K
r	Relación de compresión	
r	Coeficiente de correlación	
$R^2$	Coeficiente de determinación	
RAT	Rendimiento de extracción de antocianinas totales	%
T	Temperatura	°C ó K
t	Tiempo (en extracción sólido-líquido, ecuación I.2)	s
t	Tiempo de extracción (en ecuaciones IV.1 y IV.2 de superficie de respuesta)	h
t	Tiempo de calentamiento o almacenamiento	h ó días
$t_1$	Tiempo de la etapa de vacío en el proceso de IV	min
t	Tiempo de extracción (en ecuaciones III.1 y III.2)	h
$T_1$	Temperatura de la etapa de vacío en el proceso de IV	°C
$t_{1/2}$	Tiempo de vida medio	h ó días
$t_2$	Tiempo de la etapa a presión atmosférica en el proceso de IV	min

---



---

---



---

$T_2$	Temperatura de la etapa a presión atmosférica en el proceso de IV	$^{\circ}\text{C}$
TM	Toma de muestra	
$V_1$	Volumen de melón después de la etapa de vacío en el proceso de IV	$\text{m}^3$
$V_f$	Volumen de melón después del proceso de IV	$\text{m}^3$
$V_i$	Volumen de melón sin impregnar	$\text{m}^3$
$V_{LI}$	Volumen del líquido de impregnación	$\text{m}^3$
$V_{LI1}$	Volumen del líquido de impregnación en la etapa de vacío	$\text{m}^3$
$V_{LI2}$	Volumen del líquido de impregnación en la etapa a presión atmosférica	$\text{m}^3$
X	Fracción volumétrica de impregnación al final del proceso de IV (volumen de solución impregnada/volumen de melón sin impregnar)	$\text{m}^3/\text{m}^3$
x	Variable independiente	
$X_1$	Fracción volumétrica de impregnación en la etapa de vacío (volumen de solución impregnada/volumen de melón sin impregnar)	$\text{m}^3/\text{m}^3$
$X_2$	Fracción volumétrica de impregnación en la etapa a presión atmosférica (volumen de solución impregnada/volumen de melón sin impregnar)	$\text{m}^3/\text{m}^3$
Y	Variable dependiente o variable respuesta	

---



---

$z$	Distancia en el interior de poro	m
$\rho_{LI}$	Densidad de la solución de impregnación	kg/m <sup>3</sup>
$\epsilon$	Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido, 26900	
$\beta_0$	Ordenada en el origen	
$\beta_1$	Pendiente	
$\beta_i$	Coeficiente de regresión i lineal	
$\beta_{ij}$	Coeficiente de regresión de la interacción ij	
$\gamma$	Deformación global (volumen de deformación en la muestra/volumen de la muestra inicial)	m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup>
$\gamma_1$	Deformación de la etapa de vacío (volumen de deformación en la muestra/volumen de la muestra inicial)	m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup>
$\gamma_2$	Deformación durante la etapa a presión atmosférica (volumen de deformación en la muestra/volumen de la muestra inicial)	m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup>
$\Delta A$	Cambio en la absorbancia	
$\Delta G^*$	Energía libre de Gibbs de activación	kJ/mol
$\Delta H^*$	Entalpía de activación	kJ/mol
$\Delta S^*$	Entropía de activación	J/mol K
$\Delta V$	Volumen de deformación de la muestra al final de	m <sup>3</sup>

---

paso de presión atmosférica

$\Delta V_1$	Volumen de deformación de la muestra al final de la etapa de vacío	$m^3$
$\varepsilon_a$	Error aleatorio	
$\varepsilon_e$	Porosidad efectiva (volumen de aire/volumen de melón sin impregnar)	$m^3/m^3$

---

---

# I. INTRODUCCIÓN

---

## I.1. El arándano

### I.1.1. Taxonomía

El arándano es un arbusto que pertenece a la familia de las Ericáceas, género *Vaccinium*. Las especies de mayor importancia que se producen son los “arándanos altos del norte” (*V. corymbosum*), “arándanos altos del sur” (híbridos inter - específicos de *V. corymbosum* y *V. darrowi*), “arándanos bajos” (*V. angustifolium*) y “arándanos ojo de conejo” (*V. virgatum*, ex *V. ashei*). Existe además el “arándano de altura media”, un híbrido entre *V. corymbosum* y *V. angustifolium*.

Cada variedad de arándanos tiene características particulares y necesidades climáticas y edafológicas específicas. Así, entre otras, es importante mencionar los diferentes requerimientos de frío invernal, es decir, el número de horas con temperaturas inferiores a 7°C (el cero fisiológico de los frutales de hoja caduca) necesarias para romper el receso invernal y permitir un crecimiento vigoroso de las yemas vegetativas y reproductivas.

El arándano Alto del Norte (*Northern Highbush*), cuya especie es la que se utilizó en la presente investigación, es nativo de la zona noroeste de Norte América. Esta especie representa el 75% del total de arándano cultivado a nivel mundial. Las plantas pueden medir entre 1.5 y 2.5 metros (Figura I.1). Tienen un requisito de frío que oscila entre las 800 y las 1200 horas, pudiendo resistir temperaturas extremas de hasta - 30 °C en el invierno. Son auto fértiles, se cultivan en suelos de pH entre 4.5 y 5.0 y presentan un período variable de flor a fruto de 30 a 90 días.



**Figura I.1.** Cultivo de arándano de la provincia de Entre Ríos, Argentina.

### **I.1.2. El fruto**

El fruto del arándano es una baya casi esférica, que según la especie y cultivar, puede variar en tamaño, de 0.7 a 1.5 centímetros de diámetro, y en color, desde azul claro hasta negro (Figura I.2).

La epidermis del fruto está cubierta por secreciones cerosas, que le dan una terminación muy atractiva, lo que tiene gran importancia a la hora de su comercialización.



**Figura I.2.** Frutos de arándanos.

Tiene un sabor dulce y ligeramente ácido a la vez. Los frutos verdes tienen aproximadamente un 7% de azúcares y los maduros un 15%. Durante la maduración, se producen cambios en la pared celular que provocan un ablandamiento de los frutos. Esto mejora su sabor, pero los vuelve más vulnerables a los daños físicos y microbiológicos.

Los arándanos maduros tienen una vida poscosecha muy corta. Para prolongarla se requiere controlar la temperatura y la humedad de almacenamiento. Así, para la comercialización en fresco no deben ser expuestos a temperaturas superiores a 10°C y, preferiblemente, deben almacenarse entre -0.5 y 0°C con una humedad relativa de 90-95% (Nunes, 2008; Kader 2002). En estas condiciones tienen una vida útil de aproximadamente 1 mes.

### **I.1.3. Valor nutricional**

En la Tabla I.1 se presenta la composición del arándano fruto (Nunes, 2008; Pritts y Hancock, 1992). Estas bayas tienen pocas calorías y muy bajo contenido en grasas y sodio, mientras que poseen un alto contenido en fibra dietética y son ricas en minerales como potasio, manganeso y magnesio.

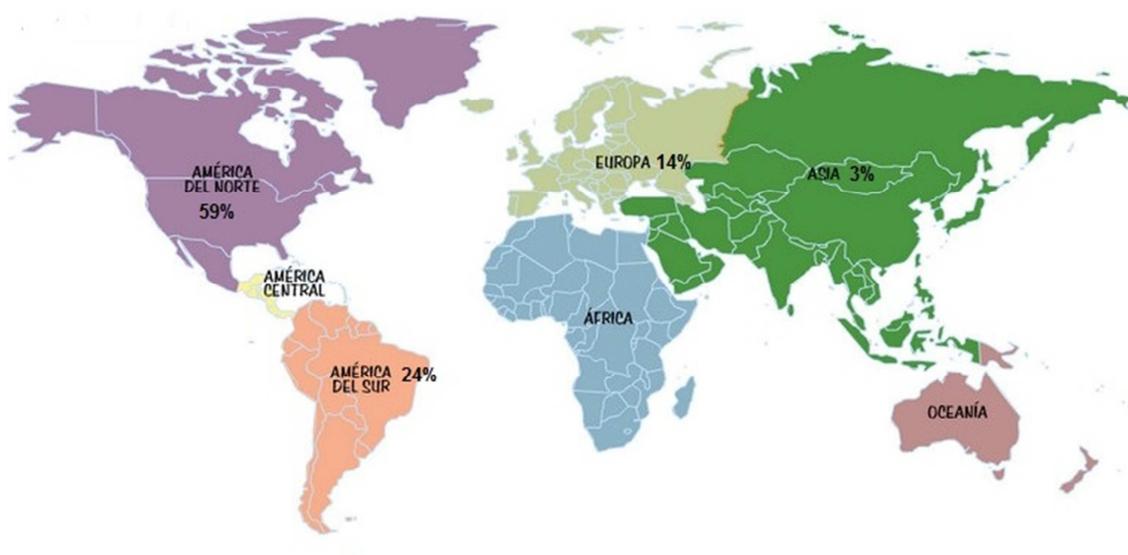
Además, son una fuente de antioxidantes naturales, tales como compuestos fenólicos y antocianinas (Nunes, 2008).

**Tabla I.1.** Composición del arándano (Nunes, 2008; Pritts y Hancock, 1992).

Constituyente	Cant. por 100 g	Constituyente	Cant. por 100 g
Agua	82-85g	Zinc	0.11 mg
Calorías	55 kcal	Cobre	0.06 mg
Proteínas	0.7 g	Manganeso	0.27 mg
Grasas	0.37 g	Ácido ascórbico	13 mg
Carbohidratos	14 g	Tiamina	0.05 mg
Fibras	1.3 g	Rivoflavina	0.05 mg
Calcio	6 mg	Niacina	0.35 mg
Hierro	0.16 mg	Ácido pantoténico	0.09 mg
Magnesio	4.7 mg	Vitamina B <sub>6</sub>	0.03 mg
Fósforo	10 mg	Ácido fólico	6.2 mg
Potasio	86 mg	Vitamina A	97 IU
Sodio	6 mg		

#### I.1.4. Situación actual del cultivo del arándano en Argentina

A nivel mundial, la superficie destinada al cultivo del arándano se encuentra alrededor de las 74.000 hectáreas. En la Figura I.3 se puede observar la distribución de esa superficie.



**Figura I.3.** Distribución de la superficie plantada con arándanos en el mundo (Brazelton, 2009).

En el año 2008 se produjeron 174.000 toneladas de arándanos (Brazelton, 2009). El principal país productor es Estados Unidos, que es al mismo tiempo, el mayor importador y consumidor. Canadá es el segundo país en producción. A diferencia de Estados Unidos, la mayor parte de la producción canadiense procede de la recogida de frutos silvestres. Canadá es también el primer país exportador de arándanos congelados. Chile es el tercer país productor del mundo y a él le siguen Argentina, Nueva Zelanda y Australia.

Según la información suministrada por la Asociación de Productores de Arándanos de la Mesopotamia Argentina (APAMA), en el año 2013 hay cultivadas 3100 hectáreas. Un análisis de la superficie plantada durante del período 2003 – 2013 permite señalar que hasta el año 2008 hubo un aumento de la superficie plantada, pero luego disminuyó aproximadamente en 500 hectáreas. Esta bajada se puede atribuir a los elevados costos de producción y a que a medida que aumenta la oferta, los precios bajan y los productores no alcanzan a cubrir los costos de cosecha, por lo que algunos abandonan el cultivo.

Entre las regiones con mayor superficie plantada se encuentran el noroeste argentino (NOA) y el noreste argentino (NEA). En el NEA se destaca la provincia de Entre Ríos y en ella particularmente el Departamento Concordia, donde se realizó la presente investigación (Figura I.4), como así también la provincia de Corrientes.



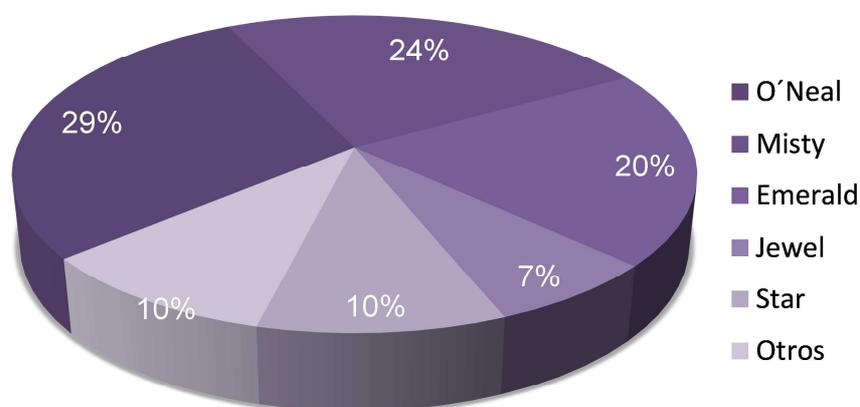
**Figura I.4.** Distribución de la superficie plantada con arándanos en la República Argentina (APAMA, 2013).

La tercera región productora de arándanos es la provincia de Buenos Aires. Además hay otras provincias donde existen algunas hectáreas cultivadas como Santa Fe, San Luis, Córdoba y Río Negro.

En Argentina, la difusión del arándano comenzó a principios de la década del 90 del siglo XX. Sin embargo, fue a partir de 1994, año en que EE.UU. permitió la importación del producto argentino, cuando comenzaron a analizarse con mayor interés las posibilidades de producción y exportación.

En el NEA las principales variedades implantadas son: O'Neal, Misty, Emerald, Jewel, Star, Snowchaser y Sprinhigh. En esta región, las tres últimas son variedades extra-tempranas, Emerald y Jewel presentan una maduración temprana; O'Neal, intermedia y Misty, tardía.

En la Figura I.5. se representan las distintas variedades de arándanos cultivadas en el NEA. Se puede ver que las variedades que se producen en mayor proporción son O'Neal y Misty.



**Figura I.5.** Distribución varietal de arándanos en el NEA (APAMA, 2013).

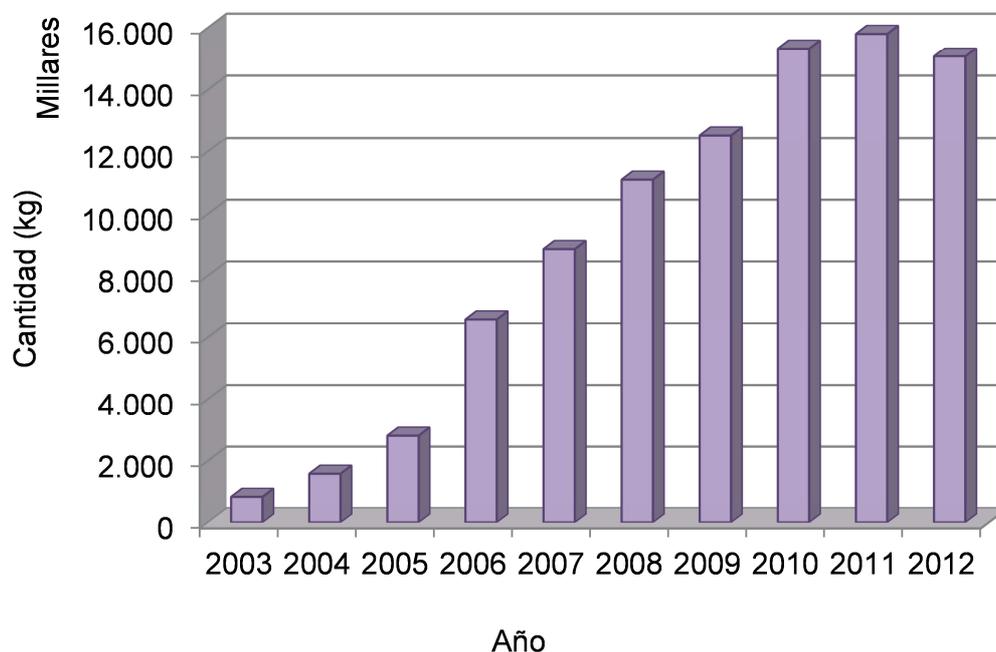
En la presente investigación se trabajó con la variedad O'Neal. Esta variedad presenta una elevada productividad, baja acidez y alta incidencia de microorganismos en el periodo postcosecha. O'Neal es una variedad cuya

recolección coincide, en gran parte, con el pico de producción nacional y, precisamente, cuando se produce la caída del precio de comercialización. Por este motivo, sólo se justifica su exportación a EE.UU. y Europa mediante transporte marítimo y no aéreo, por su menor costo. Sin embargo, al ser una variedad muy susceptible al ataque de microorganismos, cuando la cantidad de inóculo en campo es elevada, las bayas tienen una alta incidencia de microorganismos que provocan la putrefacción de las mismas, especialmente durante el transporte. Por este motivo, y porque es una de las variedades que tiene alta concentración de antocianinas (Zapata et al., 2010), se decidió trabajar con esta variedad y plantear alternativas de industrialización de las bayas.

Entre los años 2003 y 2012 la producción total de arándanos en Argentina pasó de 845 t a 20300 t. Este incremento de la producción se debió tanto a que hubo nuevos productores que se dedicaron a plantar arándanos, y por lo tanto, aumentó la superficie de cultivo, como también al incremento de la producción de las plantaciones más antiguas por el crecimiento de las plantas que provocó un aumento del rendimiento por hectárea. Así, en el año 2011 el rendimiento medio por hectárea de fruta exportada en el área NEA fue de 7 t.

En el año 2008, Divo de Sesar observó que entre el 80 y 85% del arándano producido se destinó a la exportación, el 3% a mercado interno para consumo en fresco e industrialización y el resto se descartó. En el año 2013, según datos brindados por la APAMA, un 85% se destina a exportación de fruto fresco, 10% para mercado interno, tanto para consumo en fresco como industrialización y el 5% se descarta.

En cuanto a la cantidad de bayas exportadas (Figura I.6), hubo un claro crecimiento hasta el año 2010, luego se mantuvieron las exportaciones prácticamente constantes durante los años 2010 – 2011, tras lo que se produjo una ligera disminución en 2012.



**Figura I.6.** Arándano exportado por Argentina (APAMA, 2013).

La baja demanda de las bayas en el mercado interno se debe a que éstas no forman parte de los hábitos de consumo de la población argentina (Consejo Federal de Ciencia y Tecnología, 2007). Además, no se han desarrollado campañas que promuevan el consumo de arándanos en el país. Por otra parte, del arándano destinado a industria, la mayor parte se destina a obtener arándanos congelados (Individual Quick Freezing, IQF) y a la obtención de algunos productos como mermeladas, jugos y vinos artesanales, entre otros.

El elevado descarte, que en el año 2012 alcanzó aproximadamente las 900 t, se debe a múltiples factores, entre los que destaca, como se comentó anteriormente, el aumento de la productividad, lo que provoca una disminución del precio de venta y por lo tanto un menor retorno al productor. De hecho, llega un momento en que el retorno al productor es tan bajo que a éste ya no le

conviene continuar la recolección de las bayas ya que no alcanza a cubrir los costos de recolección, quedando los frutos en las plantas. Otros factores que inciden en la proporción de descarte son la selectividad de la demanda y problemas eventuales como enfermedades, granizo o la presencia de defectos, por ejemplo, bayas con falta de color, con restos de hojas y presencia de pedicelo, frutas con bajo calibre, etc.

Si bien en Estados Unidos se comercializan diversos productos derivados del arándano (dulces, jugos, vinos, salsas, pasas, mezclas para tortas y masas, barras de cereales, productos de cosmética natural y otros), en Argentina sólo pueden encontrarse las elaboraciones artesanales que se mencionaron anteriormente. Por ello, sería interesante desarrollar productos cuya originalidad y alta calidad permitieran acceder al mercado internacional. Asimismo, la calidad nutricional de los productos industrializados debería estar directamente relacionada con la calidad nutricional de los frutos frescos de los cuales provienen (Divo de Sesar et al., 2008).

El casi inexistente mercado interno de arándano fresco y las escasas posibilidades de industrialización, han provocado impactos socioeconómicos y ambientales adversos al no contar con alternativas para la obtención de productos que agreguen valor a la materia prima. Además ha habido campañas en las que algunos productores se deshicieron de las bayas no comercializadas en campos a cielo abierto, lo que ocasionó una elevada contaminación ambiental.

El Consejo Federal de Ciencia y Tecnología (2007) ha expresado que posibles soluciones para disminuir la cantidad de arándano descartado podría ser:

- fomentar la vinculación del sector con empresas que desarrollen productos alimenticios en base a frutas finas y

➤ establecer un centro que promueva la investigación y desarrollo de productos que agreguen valor a los productos agroalimentarios primarios.

Estas observaciones del Consejo Federal de Ciencia y Tecnología estarían de acuerdo con considerar también al arándano como fuente de compuestos de origen natural como es la obtención de colorantes naturales y compuestos bioactivos. En general, estos frutos son reconocidos por sus potenciales efectos beneficiosos en la salud, ya que contienen altas concentraciones de antocianinas, que podrían ser extraídas y utilizadas en la industria alimentaria como colorante y antioxidante (Faria et al., 2005).

Por todo lo expuesto, se considera imperante buscar alternativas de industrialización de las bayas de arándanos. En el Departamento de Concordia hay algunas investigaciones orientadas a la obtención de productos de arándanos como jugo concentrado, pasas de arándanos o bebidas isotónicas (Larrocca, 2010; Vuarant et al., 2010). Además, se venden en el mercado local algunas producciones artesanales de vino de arándano y mermeladas. Sin embargo, estas producciones no han sido significativas en cuanto a la cantidad de bayas industrializadas. Además, se necesita mejorar mucho la calidad sensorial, nutricional y el contenido de fitonutrientes de los productos elaborados.

### **I.2. Las antocianinas**

Las antocianinas están presentes en los frutos de arándanos. Estos compuestos son colorantes naturales que han suscitado interés debido a su carácter no tóxico y porque al ser hidrosolubles, se pueden utilizar como colorantes en productos alimenticios. Además, debido a sus propiedades antioxidantes, se pueden encontrar numerosas publicaciones que les atribuyen propiedades beneficiosas para la salud, como la prevención de enfermedades

cardiovasculares, neuronales, cáncer y diabetes, entre otras (Castañeda-Ovando et al., 2009a; Moldovan et al., 2012).

Estos atributos de las antocianinas, colorantes y antioxidantes, resultan de interés a efectos de estudiar metodologías de extracción para poder utilizar posteriormente el producto en aplicaciones tecnológicas, especialmente como ingrediente en la industria alimentaria e incorporarlo a alimentos y bebidas (Castañeda-Ovando et al., 2009a; Faria et al., 2005).

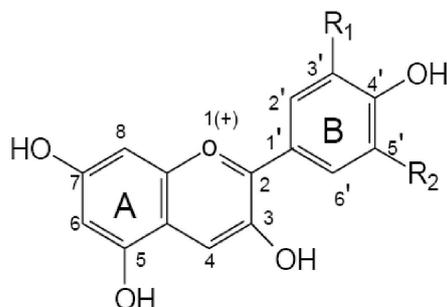
Para abordar este desafío es conveniente estudiar primero la estructura química de estos compuestos y los distintos factores que pudieren afectar su estabilidad.

### **I.2.1. Estructura química**

Las antocianinas son los compuestos químicos responsables de conferir los colores rojo, azul y violeta (Wang y Xu, 2007; Kalt et al., 2003) en hojas, flores y frutos, y son especialmente importantes en arándano (Kong et al., 2003). Estos compuestos pertenecen a la familia de los flavonoides. Son glucósidos de antocianidinas, es decir, que están constituidos por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, también llamado 2-fenil-benzopirilio, que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); ambos unidos por una cadena de tres átomos de carbono (Aguilera Ortíz et al., 2011). Variaciones estructurales del anillo B producen las seis antocianidinas conocidas (Figura I.7).

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas.

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad.



Aglicona	Substitución		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	508 (azul-rojo)
Malvinidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	510 (azul-rojo)

**Figura I.7.** Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas (Garzón, 2008).

### I.2.2. Factores que afectan su estabilidad

Existen diversos factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas. La estructura de éstas puede verse afectada en cualquier etapa de un proceso tecnológico, como por ejemplo un proceso de extracción de antocianinas de un material vegetal, como así también durante un tratamiento térmico o durante el almacenamiento de un producto que las contiene. A

continuación se exponen los factores más relevantes que afectan a la estabilidad de las antocianinas.

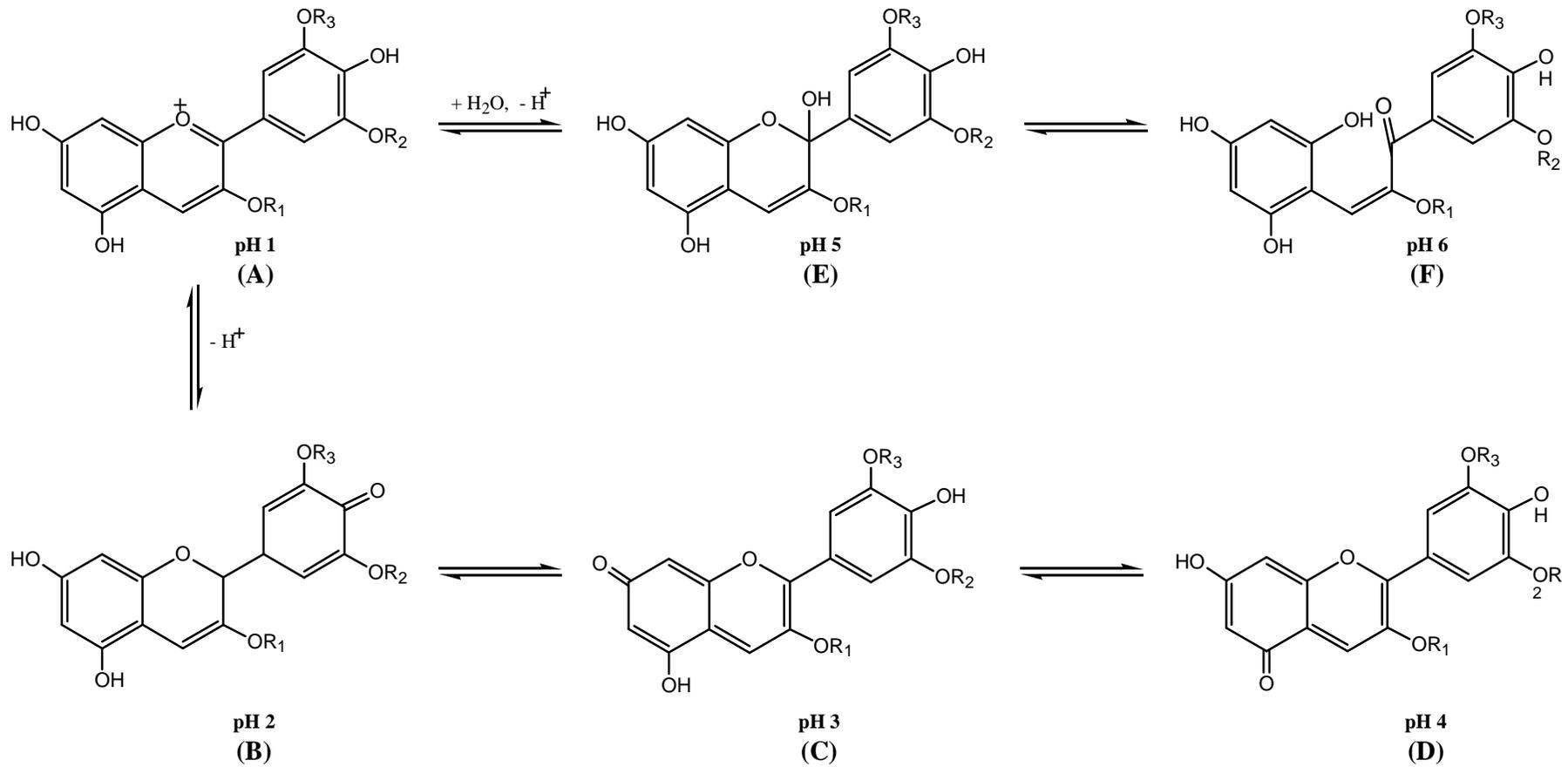
### *1.2.2.1. pH*

Las antocianinas pueden encontrarse en diferentes formas químicas dependiendo del pH, es decir que este factor influye en su estructura y por lo tanto en su estabilidad (Figura 1.8). A pH 1 predomina el catión flavilio que es de color rojo y es la forma más estable de las antocianinas (Figura 1.8.A), a valores de pH entre 2 y 4 ocurre la pérdida de un protón y adición de agua, encontrándose las antocianinas preferentemente bajo la formas quinodales (Figura 1.8.B. C y D) de color azul. A pH entre 5 y 6 se observan las especies pseudobase carbinol, que es incolora (Figura 1.8.E), y chalcona, de color amarillo (Figura 1.8.F), ambas bastante inestables. A pH superiores a 7 se produce la degradación rápida de las antocianinas por oxidación con el aire. Esta reacción se ve afectada, además del pH, por la presencia de sustituyentes presentes en el anillo B (Moldovan et al., 2012; Castañeda-Ovando et al., 2009a; Garzón, 2008).

A pH entre 4 y 6, pH característico de las frutas y hortalizas frescas o procesadas, se observa una mezcla en equilibrio de las formas catión flavilio, bases quinodales y carbinol, como así también de la forma chalcona (Moldovan et al., 2012).

Bordignon et al. (2009) estudiaron la extracción de antocianinas de frutillas en el rango de pH de 1.0 a 13.0 y obtuvieron que la mejor extracción fue al valor más bajo de pH.

En el estudio de cinética de degradación de antocianinas presentes en extractos de arándanos agrios (*Viburnum opulus* L.) durante el almacenamiento a los pH 3 y 7, Moldovan et al. (2012), obtuvieron que la menor degradación se produjo con el valor más bajo de pH.



**Figura I.8.** Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH. Dónde  $R_1 = H$  o glúcido,  $R_2$  y  $R_3 = H$  o metilo (Castañeda-Ovando et al., 2009a).

También Laleh et al. (2006) investigaron sobre la influencia del pH en extractos de antocianinas de 4 especies de berberies, observando que cuanto más bajo fue el pH menor fue el deterioro de las antocianinas.

De lo expuesto se puede señalar que la acidez tiene un efecto protector sobre la estructura de las antocianinas, mientras que, cuanto más elevado es el pH, aparecen estructuras inestables que se degradan con rapidez. Es por esto que las aplicaciones de las antocianinas en los sistemas alimenticios son preferentemente usadas en alimentos de acidez intermedia para que predomine el catión flavilio (Aguilera Ortíz et al., 2011).

### *1.2.2.2. Temperatura*

La temperatura es otro de los factores críticos que influyen en la degradación de antocianinas (Min-Sheng y Po-Jung, 2007). Las conversiones estructurales de las antocianinas son reacciones endotérmicas. Resisten bien procesos térmicos a altas temperaturas durante cortos periodos de tiempo. Por efecto del calor (a temperaturas por encima de los 60°C) se degradan según una cinética de primer orden. En general las características estructurales que conducen a una mayor estabilidad al pH son las mismas que conducen a una mayor estabilidad térmica. Por lo tanto las antocianinas altamente hidroxiladas son menos estables térmicamente que las metiladas, glicosidadas o acetiladas (Fennema, 2000). Incrementos de temperatura provocan pérdidas del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo, con la consecuente producción de chalconas incoloras (Garzón, 2008).

Gorriti Gutierrez et al. (2009a y 2009b) investigaron la extracción de antocianinas de maíz morado a temperaturas entre 25 y 90°C. Así, obtuvieron que el mayor rendimiento de extracción se produjo a temperaturas entre 75°C y 90°C, dependiendo de las demás condiciones de extracción. Fan et al. (2008a) trabajaron en la optimización de las condiciones de extracción de antocianinas

de batata morada donde el rango de temperatura ensayada fue entre 40 y 80°C, logrando la mejor extracción a la última temperatura. En la extracción de antocianinas de grosellas negras Cacace y Mazza (2003) investigaron el efecto de la temperatura de extracción en el rango de 6 y 74°C, obteniendo los mayores rendimientos a 30-35°C. Laleh et al. (2006) obtuvieron extractos de antocianinas de 4 especies de berberies y lo almacenaron durante 84 días a temperaturas entre 5 y 35°C, observando que el deterioro de las antocianinas aumentó con el incremento de la temperatura. También Devi et al. (2012) llegaron a la misma conclusión al estudiar la estabilidad de antocianinas extraídas de salvado de sorgo rojo y almacenadas en botellas entre 0 y 70°C.

Por otra parte, un estudio sobre la cinética de degradación de antocianinas durante el tratamiento térmico de jugo de arándanos, entre las temperaturas de 40 y 80°C, señaló que ésta fue de primer orden y que la degradación fue mayor a valores más altos de temperatura (Pereira Kechinski et al., 2010). Wang y Xu (2007) estudiaron también la cinética de degradación de antocianinas, en este caso en jugo de mora, durante el tratamiento térmico y el almacenamiento y llegaron a la misma conclusión que Pereira Kechinski et al. (2010). Hubo una pérdida de antocianinas, tanto durante el tratamiento térmico como durante el almacenamiento. Esta pérdida siguió una cinética de primer orden. Además, la degradación de antocianinas aumentó con el incremento de la temperatura. Por su parte, los autores Moldovan et al. (2012) publicaron un estudio de cinética de degradación de antocianinas presentes en extractos de arándanos agrios (*Viburnum opulus* L.) durante el almacenamiento a temperaturas entre 2 y 75°C, señalando que la cinética de degradación fue de primer orden, siendo el deterioro de las antocianinas más bajo a 2°C.

De lo expuesto se puede decir que, en términos generales, la bibliografía señala que las temperaturas más elevadas provocan un efecto adverso sobre la estructura de las antocianinas, especialmente durante un tratamiento térmico o el almacenamiento. Sin embargo, los mejores rendimientos de extracción de antocianinas de un determinado producto fueron a temperaturas altas.

Probablemente, este último efecto se deba a la mayor transferencia de antocianinas desde la matriz que lo contiene hacia el seno de la disolución extractiva. Por lo tanto, en un proceso de extracción de antocianinas de arándano habría que buscar una temperatura de compromiso que favoreciera el proceso de extracción pero no perjudicara a la calidad del extracto.

### *1.2.2.3. Agua*

El agua puede actuar como nucleófilo y atacar el catión flavilio en el C-2 formando la base carbinol incolora según el mecanismo que se explicó en el apartado 1.2.2.1. Sin embargo, esta degradación puede variar, dependiendo de la concentración de azúcares o con el fenómeno denominado copigmentación.

Cuando los azúcares se encuentran a altas concentraciones, la actividad de agua es baja, por lo que las moléculas de agua tienen menores posibilidades de atacar el catión flavilio para formar la base carbinol. Sin embargo, cuando los azúcares están en bajas concentraciones la actividad de agua no se ve afectada, por lo que sus productos de degradación (hidroximetilfurfural y furfural) aceleran la degradación de las antocianinas (Kopjar y Piližota, 2009; Lewis y Walker, 1995).

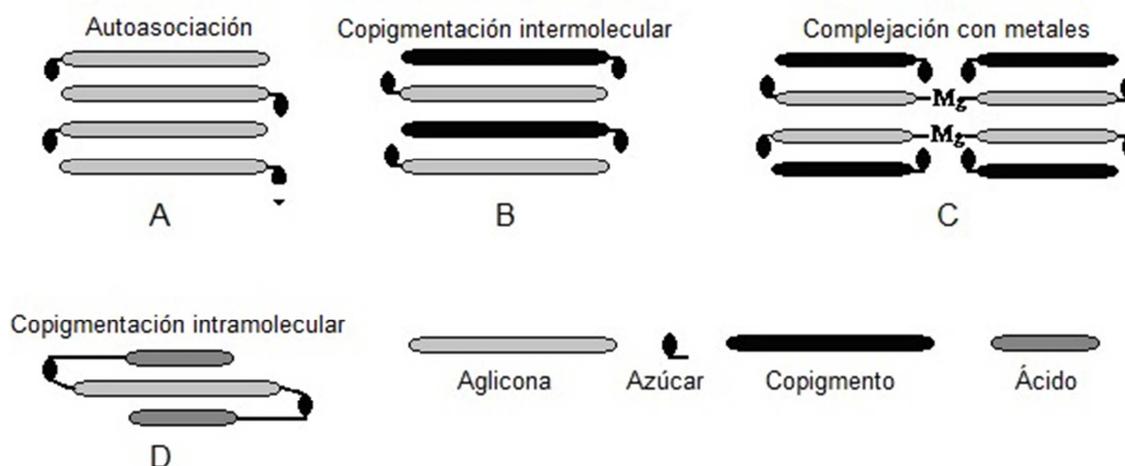
Dado que la molécula de agua interviene en reacciones que deterioran las antocianinas, resulta conveniente su eliminación para disminuir las probabilidades de ataque nucleofílico al catión flavilio.

### *1.2.2.4. Copigmentación*

La copigmentación es uno de los principales factores de estabilización de la estructura del catión flavilio in vivo (Sari et al., 2012; Kopjar et al., 2011; Gradinaru et al., 2003). Las formas coloreadas de las antocianinas pueden estabilizarse por interacción con componentes, llamados copigmentos, que

existen en las células de las flores, frutas y berries (Rein, 2005). Los copigmentos pueden ser flavonoides, polifenoles, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos y grupos acilo aromáticos, entre otros (Sari et al., 2012; Lewis y Walker, 1995).

La copigmentación se lleva a cabo en un rango de pH ácido (Mazza, 1995) y puede ocurrir a través de una serie de interacciones. Los mecanismos más importantes son las: copigmentación intermolecular, copigmentación intramolecular, autoasociación y formación de complejos de metales (Figura I.9).

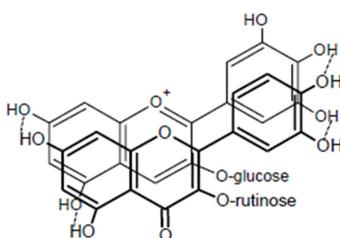


**Figura I.9.** Interacciones de antocianinas (Rein, 2005).

En la copigmentación intermolecular se sugiere que las antocianinas y los copigmentos, que pueden ser flavonoides incoloros y otros compuestos fenólicos, interactúan a través de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas débiles, formando complejos. Este tipo de copigmentación puede producirse tanto con el catión de flavilio como con las formas de base quinonoidal de la antocianina. Dado que estas dos formas de equilibrio de las antocianinas son casi planas y con electrones  $\pi$  deslocalizados, las

interacciones de estas con copigmentos, que tengan características estructurales similares, son mucho más fáciles y probables (Rein, 2005).

La disposición solapada de las dos moléculas (antocianina y copigmento) (Figura I.10), previene el ataque nucleofílico de moléculas de agua en la posición 2 del catión flavilio, evitando la formación de la pseudobase no coloreada (Rein, 2005).



**Figura I.10.** Formación de complejo a través de interacción intermolecular.

En la copigmentación intramolecular el copigmento es parte de la molécula de antocianina y consiste en un grupo acilo que está unido covalentemente a un resto de glucósido de la antocianina. En esta última, los residuos aromáticos de grupos acilo interactúan con el catión flavilio cargado positivamente, a través de interacciones hidrofóbicas, formando una conformación apilada tipo sándwich. En esta conformación tipo sándwich, los residuos de glucósidos son considerados como espaciadores, que permiten el plegado del grupo acilo en la aglicona (Sari et al., 2012; Rein, 2005).

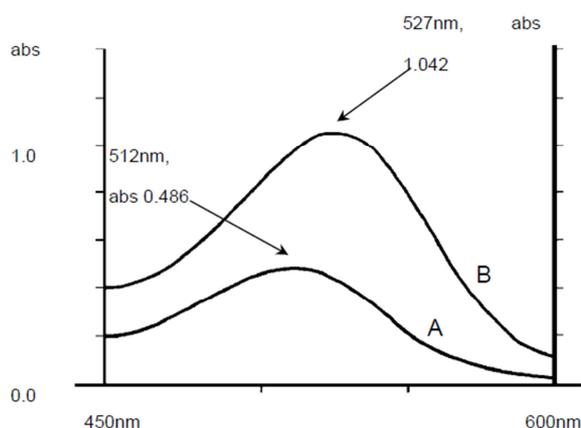
Esta disposición hace que el ataque nucleofílico, de moléculas de agua por ejemplo, en el C-2 y en el C-4 de la antocianina, esté obstaculizado (Rein, 2005).

El número de grupos acilo, su estructura y la posición de unión a residuos de glucósidos, así como la estructura y el número de sacáridos afecta a la copigmentación intramolecular. Las antocianinas poliaciladas son más estables que las monoaciladas. En estas últimas las moléculas de agua pueden atacar a los sitios no protegidos de la aglicona, por lo que la estabilización es parcial (Rein, 2005).

La autoasociación y formación de complejos de metal son también medios a través del cual se produce la copigmentación (Sari et al., 2012; Rein, 2005; Lewis y Walker, 1995). Garzón (2008) señala que cuando la concentración de antocianinas alcanza valores altos, se presentan fenómenos de autoasociación entre dos cationes flavilio, dos formas hemiacetal, dos bases quinoidales, e inclusive, entre una base quinoidal y un catión flavilio, protegiendo la molécula de antocianina.

Cuando las antocianinas se encuentran en solución acuosa, el efecto de la copigmentación es dependiente del tipo y la concentración de la misma, del copigmento, la temperatura, el pH y la composición del medio (Rain, 2005; Baulis et al., 1994).

El fenómeno de copigmenación se observa como un cambio batocrómico o como un efecto hiperacrómico. El cambio batocrómico ( $\Delta\lambda_{\text{máx}}$ ), consiste en un cambio de la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) en el rango visible hacia una mayor longitud de onda. Este efecto también se denomina “efecto de azulado”, ya que el color de la antocianina cambia de rojo a tonalidades azules. En el efecto hiperacrómico ( $\Delta\lambda$ ) la intensidad del color de la antocianina (A) es reforzada por la copigmentación. La Figura I.11 muestra el cambio en la longitud de onda máxima de absorción (desplazamiento batocrómico) y en la intensidad de color (efecto hiperacrómico) para cianidina 3-glucósido copigmentada con ácido rosmarínico (Rein, 2005).



**Figura I.11.** Copigmentación como efecto hiperacrómico y desplazamiento batocrómico. A) Cianidina-3-glucósido, B) Cianidina-3-glucósido + ácido rosmarínico (Rain, 2005).

De lo expuesto se puede señalar que resulta interesante buscar alternativas de copigmentación para evitar el ataque nucleofílico de agua al catión flavilio, impidiendo así la decoloración del pigmento antocianico. Entre las alternativas podría considerarse mantener una alta concentración de antocianinas para aumentar las posibilidades de autoasociación, o bien incorporar algún compuesto que actúe como copigmento.

#### 1.2.2.5. Oxígeno

Las antocianinas pueden oxidarse por reacción directa con oxígeno, o bien a través de una oxidación indirecta en la que éstas reaccionan con compuestos que han sido previamente oxidados, dando lugar a la formación de productos de color marrón o incoloro. También, pueden reaccionar con radicales de oxígeno actuando como antioxidantes. Estos mecanismos de oxidación se ven favorecidos cuando se eleva la temperatura (Rein, 2005).

Además se ha observado que en presencia de oxígeno, el ácido ascórbico destruye a las antocianinas, formando peróxido de hidrógeno. Esta reacción se acelera en presencia de cobre y es inhibida en presencia de flavonoles como la quercetina. El peróxido de hidrógeno actúa rompiendo el anillo de pirilio de la antocianina por un ataque nucleofílico en C-2 produciendo ésteres incoloros y derivados de la cumarina. Estos productos de degradación son totalmente destruidos y polimerizados para formar precipitados de color café (Fennema, 2000).

Garzón (2008) publicó que las condiciones que favorecen la oxidación aeróbica del ácido ascórbico en jugo de fresa y en sistemas modelo que contenían pelargonidina-3-glucósido, proveniente de la fresa, causaban grandes pérdidas de antocianinas, pero cuando el oxígeno era excluido del sistema no se observaba deterioro del color. También señaló un efecto sinérgico entre el ácido ascórbico y el oxígeno sobre la degradación de la pelargonidina-3-glucósido en solución. Las investigaciones de Garzón y Wrolstad (2002), confirmaron la existencia de una mayor pérdida de antocianinas de fresa cuando está presente el ácido ascórbico, tanto en sistemas naturales como en sistemas modelo. El efecto del ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas ha sido explicado como una posible reacción de condensación entre el ácido y los pigmentos (Garzón, 2008).

Por lo tanto, para reducir las posibilidades de deterioro de las antocianinas es importante eliminar el oxígeno del medio.

### *1.2.2.6. Luz*

La luz es un factor que acelera la degradación de las antocianinas. Se ha observado que la sustitución del hidroxilo en el C-5 hace que la antocianina sea más susceptible a la fotodegradación cuando ésta se presenta con

flavonas polihidroxiladas, isoflavonas y auronas sulfonadas (Delgado-Vargas et al., 2000).

Ferreira Ozela et al. (2007), al estudiar el efecto de la luz sobre la estabilidad de las antocianinas en extracto de frutos de espinaca blanca, concluyeron que la luz ejerce un efecto adverso sobre su estabilidad. Laleh et al. (2006) llegaron a la misma conclusión en su investigación referida a la estabilidad de antocianinas presentes en extractos de frutos de 4 especies de berberies, como así también Devi et al. (2012) al estudiar la estabilidad de antocianinas extraídas de salvado de sorgo rojo.

Por lo tanto, resulta importante proteger, no solo del oxígeno, sino también de la luz a los productos ricos en antocianinas.

### **I.2.3. Propiedades colorantes y antioxidantes de las antocianinas**

El color de un alimento es una de las características de calidad que el consumidor primero percibe y que más influye en la elección del mismo. En la actualidad colorear los alimentos es una práctica común, ya sea para resaltar, recuperar o uniformar su color original o simplemente para hacerlos más atractivos.

Existen, en el mercado, colorantes naturales y sintéticos. Estos últimos presentan como principales ventajas que proporcionan mayor intensidad de coloración (por lo que se requiere menor cantidad de colorante para obtener el mismo efecto), suministran una mayor gama de colores, son más estables a la luz, pH y temperatura, es más fácil lograr la reproducibilidad de obtención del color deseado y presentan menores probabilidades de interactuar con otros aditivos (Astiasarán et al., 2003). Sin embargo, tienen importantes desventajas entre las que hay destacar que los colorantes sintéticos ocasionan, en ciertas personas, gastroenteritis alérgica. También se les ha relacionado con la hiperactividad en niños (Prado-Lobato et al. 2012). Además, y de forma

genérica se puede afirmar que la mayoría de los colorantes sintéticos presentan problemas de toxicidad a altas dosis, por lo que su empleo está siendo restringido (Astiasarán et al., 2003).

La preocupación de los consumidores acerca de la seguridad de los colorantes sintéticos ha aumentado el interés por el uso de colorantes naturales como aditivos (Gil, 2010). A la hora de seleccionar un colorante surgen preguntas sobre las características tecnológicas, toxicológicas y legales acerca del uso del mismo. Si bien los colorantes sintéticos poseen mejores características funcionales y tecnológicas que los naturales, existe una marcada tendencia hacia el consumo de productos más naturales, libres de compuestos químicos sintéticos y con potenciales efectos beneficiosos sobre la salud (Restrepo Gallego, 2007). Es por ello que se están desarrollando investigaciones enfocadas a buscar pigmentos coloreados obtenidos de materias primas de origen animal, mineral y fundamentalmente vegetal.

En este sentido, los colorantes naturales son menos tóxicos y menos nocivos para la salud, además tienen un menor impacto sobre el medio ambiente (Siva, 2007). Sin embargo, son más caros, menos potentes y menos estables (Gil, 2010). Están formados por dos grupos químicos: cromóforo y auxocromo. El cromóforo, usualmente es un anillo aromático y está asociado a la propiedad colorante. Tiene enlaces insaturados como  $-C=C$ ,  $=C=O$ ,  $-C-S$ ,  $=C-NH$ ,  $-CH=N$ ,  $-N=N-$  y  $-N=O$ , cuyo número define la intensidad del color. Los grupos auxocromos son sustituyentes del cromóforo que intensifican la intensidad del color (Riva, 2007).

Como se mencionó anteriormente, las antocianinas son las responsables de conferir los colores rojo, azul y violeta en vegetales, granos de cereales, flores y frutos (Bridgers et al., 2010), especialmente en arándano, uva y manzana. Las antocianinas son colorantes interesantes por su impacto sobre las características sensoriales de los alimentos, ya que por sus colores atractivos se las puede utilizar como colorantes alimentarios naturales, y por

sus potenciales beneficios a la salud (Aguilera Ortíz et al., 2011; Bridgers et al., 2010; Castañeda-Ovando et al., 2009a). De hecho, el empleo de antocianinas como colorantes se encuentra contemplada en el Código Alimentario Argentino (2012), como así también en la lista de colorantes alimentarios autorizados en la Unión Europea (Astiasarán et al., 2003).

Dentro de las posibles fuentes de antocianinas para su utilización como colorantes, se encuentran las uvas, los arándanos, los arándanos agrios y algunas otras plantas como la perilla (Faria et al., 2005; Francis y Markakis, 1989). Estos pigmentos naturales representan un potencial importante en la industria, ya que, se podrían usar como aditivo, en competencia con los colorantes sintéticos utilizados en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos. Sin embargo, para su aplicación queda mucho por investigar. Así, por ejemplo, es necesario profundizar sobre su estabilidad en matrices específicas, la relación entre su estructura y la actividad biológica de metabolitos bioactivos, los efectos sinérgicos y las dosis efectivas (Garzón, 2008; Vargas-Simón et al., 2002).

El interés en los pigmentos antociánicos ha aumentado debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. En el paso del sistema digestivo al sistema circulatorio, las antocianinas permanecen intactas y ejercen efectos terapéuticos que influyen en la prevención de enfermedades coronarias, cancerígenas, neurológicas, circulatorias, inflamatorias y diabéticas; además de mejorar la agudeza visual y el comportamiento cognitivo. Estos efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante (Aguilera Ortíz et al., 2011; Castañeda-Ovando, et al., 2009a; Wang y Mazza, 2002; Sánchez-Moreno, 2002). Por lo tanto, las propiedades bioactivas de las antocianinas abren una nueva perspectiva para la obtención de productos coloreados con valor agregado para el consumo humano (Garzón, 2008).

La actividad antioxidante de las antocianinas radica en el hecho de que pueden reaccionar con radicales libres. Estos últimos, entre los que se encuentran los radicales  $\text{OH}^\bullet$  (hidroxilo) y  $\text{O}_2^\bullet$  (superóxido), son capaces de atacar a proteínas, carbohidratos, grasas y ADN del cuerpo, ejerciendo un efecto oxidativo que daña las células (Youngson, 2004). Así, cuando un radical reacciona con una molécula, la molécula resultante de esta reacción se convierte en un nuevo radical libre, originándose una reacción en cadena, que provoca un daño en los tejidos, que a su vez, derivan en enfermedades degenerativas disminuyendo la calidad de vida (Youngson, 2004). Esta acción oxidante de los radicales libres puede ser controlada, o incluso prevenida, por una serie de sustancias denominadas antioxidantes. Se llama "antioxidante" a "cualquier sustancia que retarda, previene o elimina el daño oxidativo hacia una molécula" o bien, "a la capacidad que tienen determinados compuestos para neutralizar los radicales libres" (López-Alarcón y Denicola, 2013). Las antocianinas se caracterizan por tener una deficiencia de electrones, debido a su particular estructura química, que las hace muy reactivas frente a los radicales libres presentes en el cuerpo, por consiguiente, pueden ser potentes antioxidantes naturales (Bridgers et al., 2010). Las propiedades atribuidas a las antocianinas para mejorar la salud están asociadas a esta capacidad de actuar como antioxidantes y secuestrar radicales libres en sistemas biológicos (Bagchi et al., 2004; Kay et al., 2004; Meyers et al., 2003; Wang y Mazza 2002). Pueden donar hidrógenos (Miller y Rice-Evans, 1997; Wang et al., 1997) o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática (Ramirez-Tortosa et al., 2001). Wang y Jiao (2000) y Wang y Lin (2000) han demostrado que los frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y contra radicales peróxido, ( $\text{ROO}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ), hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) y oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ).

Actualmente, existe un interés considerable en aumentar el consumo de antioxidantes en la dieta humana. Una forma de lograrlo es mediante el enriquecimiento de alimentos con antioxidantes (Yean-Yean y Barlow, 2004).

---

Por sus características hidrosolubles, las antocianinas podrían incorporarse a alimentos acuosos. Los arándanos, comparados con otras frutas y vegetales, tienen un elevado contenido de estos compuestos y, a priori, una capacidad antioxidante muy alta (Faria et al., 2005; Prior et al., 1998). Sin embargo, existen factores que pueden afectar la actividad antioxidante de los frutos, tales como el grado de madurez en la cosecha, estación, diferencias genéticas, condiciones ambientales previas a la cosecha, condiciones de almacenamiento posteriores a la cosecha y procesamiento (Connor et al., 2002). Dentro de las sustancias con capacidad antioxidante que se encuentran en arándano se pueden señalar, no solamente a las antocianinas, sino también fenoles y vitamina C, entre otros (Sapers et al., 1984). Por lo tanto, a partir de arándanos, se podría obtener un producto rico en antioxidantes, especialmente en antocianinas que podría ser incorporado a ciertos alimentos, tales como cremas, helados, bebidas, frutos, etc; impartiendoles la característica de alimento funcional. Además, dado que el color juega un rol importante en la preferencia y aceptabilidad de un alimento, este producto también podría ser utilizado como colorante natural.

Resumiendo, la obtención de un producto rico en antocianinas derivado de arándano podría tener un impacto positivo, dado que:

- Se obtendría un colorante natural, constituyendo una alternativa a los cuestionados colorantes sintéticos.
- Se dispondría de una fuente de antioxidantes de origen natural, cuyo aporte a distintos alimentos les impartiría la característica de funcionales.
- Se ofrecería una alternativa de industrialización de las bayas que no puedan introducirse, por distintos motivos, en el mercado de consumo en fresco, contribuyendo a una mejor rentabilidad del sector arandano.

### **I.3. Extracción sólido – líquido**

La extracción sólido – líquido es una operación básica cuya finalidad es la separación de uno o más componentes contenidos en una fase sólida, mediante la utilización de una fase líquida o disolvente. El componente o los componentes que se transfieren de la fase sólida a la líquida reciben el nombre de soluto, mientras que el sólido insoluble se denomina inerte.

La extracción sólido – líquido recibe distintos nombres según la finalidad del proceso (lavado, percolación, etc.). Así, se denomina lixiviación cuando se desea obtener un componente valioso que está contenido en un sólido, disolviéndolo con un líquido (Ibarz y Barbosa - Cánovas, 2005).

En la industria de procesos biológicos y alimenticios, muchos productos se separan de su estructura natural original por medio de este tipo de procesos (Geankoplis, 1999). Algunos ejemplos podrían ser la etapa de maceración del proceso de extracción de sacarosa de la caña de azúcar o la extracción de aceites esenciales de cítricos, entre otros.

La forma en que el soluto está contenido en el sólido inerte puede ser diversa. Se puede dar el caso de un sólido disperso en el material insoluble o que esté recubriendo su superficie. También puede tratarse de un líquido que esté adherido o retenido en el sólido, o bien que esté contenido en su estructura molecular (Ibarz y Barbosa – Cánovas, 2005). Este es el caso, por ejemplo, de las antocianinas que se encuentran acumuladas en las vacuolas de las células de frutas, vegetales y cereales (Leguizamón et al., 2005; Wagner, 1982).

La extracción sólido-líquido se lleva a cabo en una sola o en múltiples etapas. Una etapa es una unidad de equipo en la que se ponen en contacto las fases durante un tiempo determinado, de forma que se realiza la transferencia de materia entre los componentes de las fases. Esta transferencia tiene lugar hasta alcanzarse el equilibrio. En este contexto, el equilibrio se puede definir

como aquella situación lograda cuando la disolución adherida al residuo tiene la misma composición que la del flujo líquido (Brennan et al., 1980). Una vez alcanzado dicho equilibrio se procedería a la separación mecánica de las fases. Sin embargo, en un proceso real es difícil alcanzar el equilibrio teórico ya que se necesitaría un tiempo de proceso muy largo. Es por esto, que para el cálculo de las etapas reales es preciso considerar una eficacia. Ésta se define para una etapa como el cociente entre el cambio en la composición que se logra realmente y el que debería haber tenido lugar en una situación de equilibrio teórico bajo las mismas condiciones de trabajo (Ibarz y Barbosa – Cánovas, 2005).

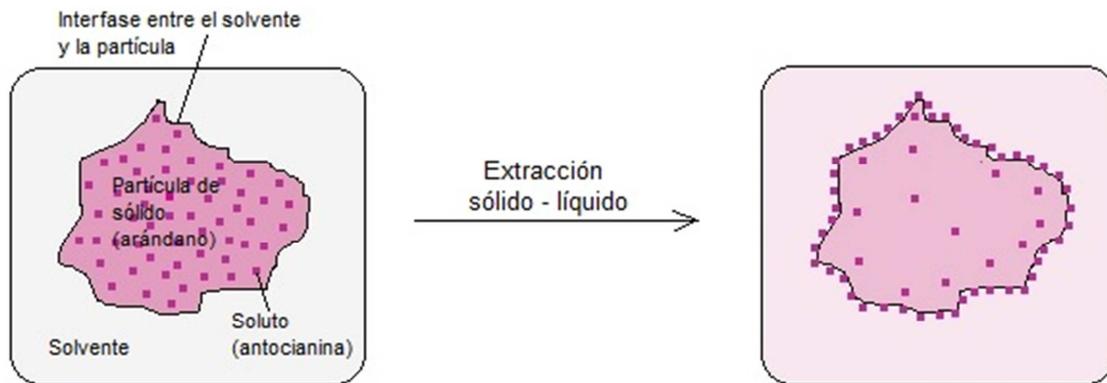
En cuanto al mecanismo de la extracción de un soluto contenido en una partícula sólida mediante un líquido, se puede considerar que ocurre en tres periodos sucesivos hasta alcanzar el equilibrio (Ibarz Ribas et al., 2000). Estos periodos son los siguientes:

1) Transferencia de solvente desde el seno de la solución extractiva hacia el sólido.

En la extracción sólido-líquido, inicialmente el disolvente penetra y difunde en la matriz sólida llenando sus poros.

2) Difusión del soluto en el disolvente contenido en los poros del sólido.

Dado que generalmente el soluto se encuentra en el interior de las partículas sólidas es necesario que el soluto entre en contacto con el disolvente, que se disuelva y que la mezcla soluto-disolvente difunda hasta la superficie de la partícula (Figura I.12).



**Figura I.12.** Difusión del soluto en el disolvente.

La transferencia del soluto desde el interior de la partícula sólida hasta su superficie se realiza debido al gradiente de concentración que existe entre la interfase disolvente - partícula. En el interior del poro, se considera que el disolvente permanece prácticamente estacionario, por lo que la transferencia de soluto desde las zonas de mayor concentración hacia el exterior se realiza únicamente por difusión molecular. La expresión de la velocidad de transferencia de materia en esta etapa vendrá dada por la Ecuación I.1. El signo negativo es como consecuencia de que la difusión ocurre hacia una concentración menor del soluto transferido (Ibarz Ribas et al., 2000; Farid, 2010).

$$N_S = -D_L \frac{dC}{dz} \quad (I.1)$$

Dónde:

$N_S$ : Densidad de flujo de materia en  $\text{kg} / (\text{m}^2 \text{ s})$ .

$D_L$ : Difusividad del soluto a través del disolvente en  $\text{m}^2 / \text{s}$ .

C: Concentración de soluto la disolución en kg / m<sup>3</sup>.

z: Distancia en el interior de poro en m.

Dado que la difusividad es una propiedad del material que depende de la temperatura, un aumento de ésta podría mejorar la transferencia de materia. Si también se disminuye el tamaño de partícula, además de presentar una mayor área interfacial respecto a su volumen, la distancia de difusión del soluto en su interior es más pequeña, por lo que aumenta la transferencia de masa (Ullauri, 2010).

3) Transferencia del soluto desde la superficie de las partículas hasta el seno de la disolución.

Una vez que el soluto ha alcanzado la superficie de la partícula, se transfiere desde este punto hasta el seno de la disolución gracias al gradiente de concentración. Esta transferencia de materia se realiza por transporte molecular y turbulento de forma simultánea. En esta etapa la velocidad de transferencia de materia viene dada por la expresión (Ibarz Ribas et al., 2000):

$$N_S = - \frac{dM}{A dt} = k_L (C_i - C_d) \quad (1.2)$$

Dónde:

M: Masa de soluto transferida en kg.

A: Superficie de contacto partícula – disolución en m<sup>2</sup>.

t: Tiempo en s.

$C_i$ : Concentración del soluto en el solvente en la interfase sólido-líquido en  $\text{kg} / \text{m}^3$ .

$C_d$ : Concentración del soluto en el seno de la disolución en  $\text{kg} / \text{m}^3$ .

$k_L$ : Coeficiente de transferencia de materia en  $\text{m} / \text{s}$ .

Se mencionó anteriormente, que desde el punto de vista teórico, la transferencia de materia tiene lugar hasta que se llega al equilibrio, el cual se alcanza cuando el soluto se disuelve totalmente en el disolvente y se obtiene una disolución de concentración uniforme. En el caso de que el contenido de soluto en el sólido sea suficientemente elevado, se considera que se ha llegado al equilibrio cuando la disolución que se halla en contacto con el sólido esté saturada.

Para aumentar la velocidad global de transferencia de materia suele actuarse sobre distintos factores como la reducción del tamaño de partícula, el aumento de la temperatura de extracción, la agitación del fluido, la proporción de sólido-líquido y el tipo de disolvente utilizado. En este punto cabe destacar que resulta muy importante la elección de un disolvente que sea selectivo con el soluto que se desea extraer y que presente una viscosidad lo suficientemente baja para que pueda penetrar y moverse con facilidad por el interior de sólido (Ibarz Ribas et al., 2000).

Silva et al. (2007), evaluaron la influencia de la temperatura, el tiempo y la proporción de etanol utilizado en la solución extractiva etanol-agua, en la extracción de compuestos fenólicos de hojas de *Inga edulis*, que es un árbol leguminoso que crece en América del Sur y Central. Obtuvieron los mejores rendimientos a  $58.2^\circ\text{C}$ , 46.8 minutos y 86.8% de etanol.

Sayyar et al. (2009), estudiaron el efecto de los factores temperatura (entre  $25$  y  $82^\circ\text{C}$ ), tiempo (entre 6 y 9 h), relación solvente/sólido (entre 4:1 y

7:1) y tamaño de partícula (<0.5 mm, entre 0.5 y 0.75 mm y >0.75 mm) en la extracción de aceite a partir de semillas de una planta nativa de América Central denominada *Jatropha* (*Jatropha curcas* L). La cantidad de aceite extraído aumentó con el incremento de la temperatura hasta los 68°C debido a que aumentó el coeficiente de difusión y la solubilidad del aceite en el solvente de extracción. Sin embargo, por encima de esta temperatura disminuyó la cantidad de aceite extraído, lo que fue atribuido a la evaporación del solvente utilizado, que fue hexano. También hubo una mayor cantidad de aceite extraído a medida que aumentó el tiempo de extracción hasta aproximadamente un tiempo de 8 h. A tiempos mayores no observaron un aumento significativo en la extracción. Esta última se vio favorecida con el aumento de la proporción solvente/sólido hasta la relación 6:1. El gradiente de concentración entre el sólido y la fase líquida favoreció la transferencia de masa en ese sentido. Sin embargo, una mayor proporción solvente/sólido no mejoró de forma significativa el rendimiento de la extracción. En cuanto al tamaño de partícula, la mayor extracción se observó cuando éste estuvo comprendido entre 0.5 y 0.75 mm. Partículas más grandes tienen menor área superficial de contacto por lo que ofrecen mayor resistencia a la entrada de solvente y a la difusión del aceite. Esto hizo que fuera menor la cantidad de aceite transferido desde el interior de las partículas al seno del solvente. Por su parte, para las partículas demasiado pequeñas (<0.5 mm), si bien ofrecieron una mayor área de transferencia, no se observó un aumento en la extracción, lo que fue atribuido a la aglomeración de partículas finas, provocando una reducción del área superficial efectiva disponible para el libre flujo del solvente al sólido.

Banik y Pandey (2008) estudiaron la extracción de ácido oleanólico de raíces de *Lantana cámara*, una planta ornamental que crece en India. Los factores considerados fueron: temperatura (35-70°C), tiempo (15-75 minutos), relación solvente/sólido (15:1-75:1 mL/g), tamaño de partícula (0.3-1.5 mm) y proporción de metanol en la mezcla metanol-acetato de etilo (17.5-87.5). Las mejores condiciones de extracción que obtuvieron fueron: temperatura 35°C,

55 minutos, relación solvente/sólido 55:1 mL/g, tamaño de partícula 0.5 mm y 52.5% de metanol en la mezcla metanol-acetato de etilo.

De lo expuesto se puede señalar que son muchos los factores que influyen en la extracción sólido-líquido. Por ello, en el momento de plantear un estudio sobre la extracción de un determinado soluto presente en una matriz se deben definir aquellas variables que se consideren más influyentes en este proceso. Además, esto también va a depender de la estructura química del soluto a extraer y de los factores que pueden influir en su estructura.

#### **I.4. Extracción de antocianinas**

Las antocianinas se pueden extraer de diferentes tejidos vegetales (Francis y Markakis, 1989; Wrolstad, 2000). El método usual de extracción es la extracción sólido-líquido. Sin embargo, es de destacar la existencia de otros métodos. Así, científicos japoneses desarrollaron una metodología alternativa que consiste en extraer las antocianinas mediante la fermentación de las matrices que las contienen (Fan et al., 2008b).

A nivel comercial, las antocianinas se obtienen principalmente de los subproductos industriales de la uva. En la actualidad existe la tendencia de utilizar los extractos antociánicos sin necesidad de realizar la separación de los distintos componentes, debido a que todos ellos, no sólo los colorantes, presentan propiedades antioxidantes (Fennema, 2000).

En relación a la extracción, Rodríguez y Wolstrad (2001) señalan que el carácter polar de la molécula de antocianina permite su solubilidad en variados solventes, tales como alcoholes, acetona y agua. Su estabilidad es afectada fácilmente por modificaciones estructurales con grupos hidroxilo, metoxilo, glucósidos y, especialmente, grupos acilos, además de por factores como la temperatura y la luz (Francis y Markakis, 1989; Wrolstad, 2000).

El método de extracción debe ser el más adecuado para cada aplicación concreta. Así, en el caso de las antocianinas, se debe maximizar la extracción de pigmentos, minimizar los compuestos adjuntos extraídos y limitar la degradación o alteración del estado natural del extracto. El conocimiento de los factores involucrados en su estabilidad y de los mecanismos de degradación es sumamente vital para una eficiente extracción, purificación y uso de las antocianinas como colorantes de alimentos.

En este sentido, Gorriti Gutierrez et al (2009a) estudiaron las mejores condiciones de extracción de antocianinas a partir de corontas de maíz morado. Ensayaron extracciones con soluciones etanólicas al 20 % y pH 2 acondicionadas según un diseño factorial con los factores temperatura y tiempo de extracción. Los resultados obtenidos indicaron que las mejores condiciones de extracción correspondieron a una temperatura de 75°C y un tiempo de extracción de entre 120 y 240 minutos, mientras que las condiciones más desfavorables fueron 25°C y 30 minutos. También estudiaron la influencia de otras variables de proceso como el solvente, el pH, la temperatura y el tiempo de extracción (Gorriti Gutierrez et al. 2009 b). Concluyeron que la extracción se vio favorecida por la utilización de un medio etanólico al 20% como agente de extracción y un pH entre 2 y 4.

Cacace y Mazza (2003) publicaron un trabajo que consistió en la optimización de la extracción de antocianinas y compuestos fenólicos de grosellas negras usando etanol acuoso como solvente de extracción. Las variables independientes seleccionadas por estos investigadores fueron: concentración de etanol, temperatura y relación solvente-sólido. Dos de las respuestas evaluadas fueron la concentración de polifenoles totales y la concentración de antocianinas. Los resultados obtenidos mostraron que los mejores resultados se obtuvieron con una concentración de etanol de 60%, una relación solvente-sólido 19 L:1kg de frutos y una temperatura de 30°C. La elevación de la temperatura de extracción no afectó la extracción de fenoles, sin embargo, provocó una disminución en el rendimiento de extracción de

antocianinas debido a la degradación de las mismas. Se identificó la existencia de una temperatura crítica a partir de la cual la degradación fue mayor. Esta temperatura aumentó con la concentración de etanol. Así, para una concentración de etanol de 20% la temperatura crítica fue 25°C, mientras que para una concentración de etanol de 95%, la temperatura crítica fue 35 °C. En general, hubo una fuerte disminución en la concentración de las antocianinas extraídas a temperaturas superiores a 45 °C.

También Fan et al. (2008a) investigaron sobre las condiciones de extracción de antocianinas presentes en batata morada. Trabajaron con etanol como solvente de extracción acidificado con ácido clorhídrico, cuyas variables independientes fueron: temperatura de extracción, tiempo y relación sólido-líquido y como respuesta evaluaron el rendimiento de extracción de antocianinas. La temperatura de extracción y la relación sólido-líquido aumentaron el rendimiento de extracción, mientras que el tiempo no tuvo efecto significativo. Estos autores obtuvieron que la mejor combinación de las variables fue temperatura de 80°C, relación sólido-líquido 1:32 y tiempo de extracción 60 minutos.

Bordignon et al. (2009), investigaron sobre la extracción de antocianinas de frutillas con una solución etanólica en el rango de pH de 1.0 a 13.0 y fue a pH 1 cuando obtuvieron la mejor extracción de antocianina.

En cuanto a la extracción de antocianinas por fermentación de una matriz, es una técnica relativamente novedosa que no ha sido todavía muy estudiada. Kousuke et al. (1990) estudiaron la obtención de antocianinas a partir de la fermentación de batata morada mezclada con arroz. Estos autores señalaron que las antocianinas extraídas de esta forma fueron más puras que las obtenidas por métodos extracción sólido-líquido, sin embargo, no aportaron datos de los componentes de las antocianinas extraídos y de su estabilidad (Fan et al., 2008b). Por otro lado, durante la fermentación, las levaduras producen a partir de los azúcares presentes, además de etanol y dióxido de

carbono, metabolitos secundarios tales como alcoholes superiores, éter etílico y ácidos grasos. Estos metabolitos secundarios se pueden combinar con las antocianinas y formar proantocianinas que son más estables que las primeras (Pretorius, 2000). Dado que esta última metodología constituye una alternativa a la extracción con solventes, se considera muy interesante profundizar en las posibilidades que presenta.

### **I.5. Determinación de las condiciones de extracción de antocianinas**

En apartados anteriores se describió cómo distintos factores afectan la estructura de las antocianinas, como así también factores que influyen en una operación de extracción sólido-líquido. Para poder determinar cómo afectan estos factores a la extracción de antocianinas de arándanos y encontrar las condiciones que maximicen su extracción, es importante aplicar una estrategia experimental y de análisis que facilite esta actividad.

Numerosos autores señalan que la metodología de superficie de respuesta (MRS) ha sido utilizada con éxito para modelar y optimizar procesos de extracción. Así, Cacace y Mazza (2003) utilizaron la MRS al investigar la optimización del proceso de extracción de antocianinas y compuestos fenólicos de grosellas negras. La misma metodología utilizaron Fan et al. (2008a) para optimizar las condiciones de extracción de antocianinas presentes en batata morada. En la optimización de la extracción de compuestos fenólicos de hojas de *Inga edulis* los autores Silva et al. (2007) utilizaron la MRS, aplicando un modelo polinomial de segundo orden para explicar los datos experimentales obtenidos. Banik y Pandey (2008), utilizaron también esta metodología para optimizar la extracción de ácido oleanólico de raíces de *Lantana cámara*.

La MSR es una estrategia experimental que busca resolver las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir aquellas que dan por resultado “valores óptimos” (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar, 2008). En la

presente investigación se buscó obtener valores de variables del proceso de extracción sólido-líquido de antocianinas que posibiliten extraer la mayor cantidad de antocianinas de arándanos. Dado que generalmente son muchas las variables independientes que influyen en una variable dependiente, para que el análisis sea lo menos complejo posible conviene elegir cuidadosamente aquellas variables independientes que pudieran llegar a tener un efecto significativo en la variable dependiente o respuesta.

Antes de aplicar la MRS, primero es necesario elegir un diseño experimental que defina las experiencias a realizar y en las que se van a combinar los diferentes niveles de las variables estudiadas (Bezerra et al., 2008). Para ello es importante definir la región experimental que se va a estudiar, esto es el espacio delimitado por los rangos de experimentación utilizados con cada factor (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar, 2008). En el caso de la investigación de Cacace y Mazza (2003) uno de los factores cuyo efecto en la extracción de antocianinas de grosellas negras investigaron fue la temperatura, definiendo un rango de experimentación entre 6 y 74°C. Dentro la región experimental cada variable puede tomar distintos valores, que se denominan niveles de la variable (Bezerra et al., 2008). En el caso de la investigación de Cacace y Mazza (2003) para la variable tomada como ejemplo, la temperatura, los valores fueron 6, 20, 40, 60 y 74°C.

Seleccionadas las variables independientes a estudiar, la variable respuesta a medir y definidos el diseño y la región experimental para cada variable independiente, se tendrá una tabla que señale las condiciones en las que deben realizarse los experimentos y así medir en cada uno la variable respuesta. De esta forma se obtiene un conjunto de datos experimentales.

Luego, los datos experimentales se ajustan a una ecuación polinómica que describa el comportamiento del conjunto de datos con el objetivo de hacer previsiones estadísticas (Ecuación 1.3). Esta metodología se puede aplicar

cuando varias variables influyen en una respuesta (Bezerra et al., 2008; Gutiérrez Pulido y Vara Salazar, 2008; Cacace y Mazza, 2003).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k^{\circ}} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k^{\circ}} \sum_{j=1}^{k^{\circ}} \beta_{ij} x_i x_j \quad (1.3)$$

En la ecuación 1.3,  $x$  son los factores o variables independientes, como por ejemplo temperatura, pH, relación sólido:solvente o tiempo;  $Y$  es la variable respuesta, como por ejemplo el rendimiento del proceso de extracción de antocianinas de arándanos;  $\beta_0$ , ordenada en el origen,  $\beta_i$  coeficiente de regresión  $i$  lineal,  $\beta_{ij}$ , coeficiente de regresión de la interacción  $ij$  y  $k^{\circ}$ , número de factores analizados.

Dado que se busca encontrar, dentro de la región experimental, las mejores condiciones operativas y analizar la influencia de cada factor, puede ser útil visualizar los datos experimentales en gráficos de superficie de respuesta y buscar allí el punto óptimo. Para el caso de la extracción de antocianinas de arándanos, las mejores condiciones operativas (punto óptimo) sería aquella combinación de niveles de factores que consiga el máximo rendimiento en la extracción. Para esto existen varios programas informáticos de estadística que facilitan este análisis.

### **1.7. Incorporación de antocianinas a matrices alimenticias por impregnación a vacío**

La ingeniería de matrices es una metodología de obtención de alimentos funcionales que utiliza la técnica de impregnación a vacío (IV) para incorporar componentes con actividad biológica en la estructura de los alimentos porosos

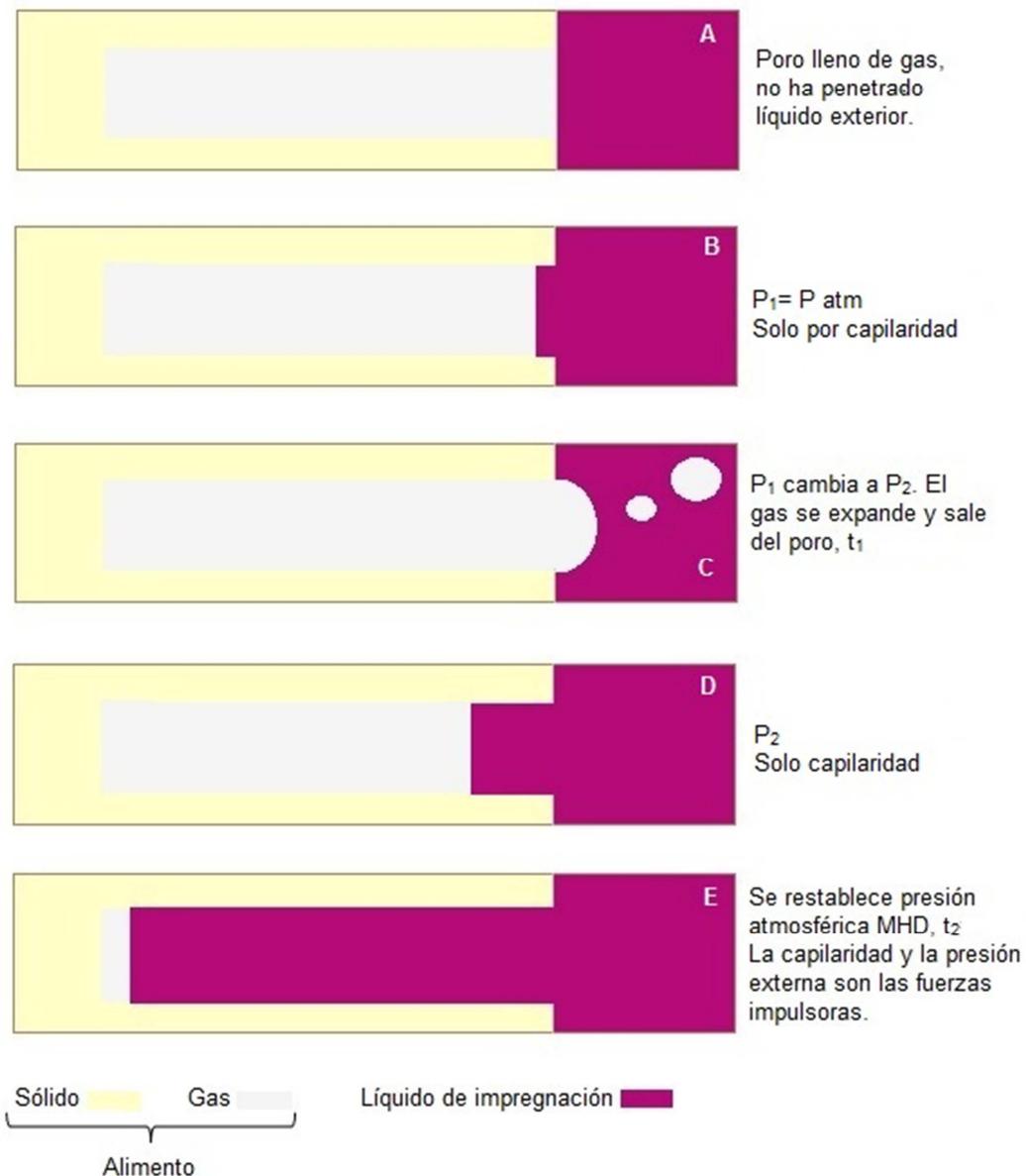
(Cortés et al., 2007). Varios investigadores han utilizado esta técnica para obtener diferentes productos, por ejemplo batatas enriquecidas con ácido ascórbico (Hironaka et al., 2011), hongos enriquecidos con calcio, selenio y vitamina C (Cortés et al., 2007); cáscaras de naranja enriquecidos con potasio, sodio y vitaminas B1, B6 y B9 (Restrepo Duque et al., 2012); apio fortificado con vitamina E (Martelo Castaño et al., 2011) o mango fortificado con calcio (Ostos et al., 2012).

La IV es un método de procesamiento mínimo que aprovecha la microestructura porosa de las matrices de los alimentos, para reemplazar el gas ocluido en su estructura celular por solutos contenidos en un líquido de impregnación mediante acción capilar y gradientes de presión impuestas en el sistema (Ostos et al., 2012).

Al someter a un producto, inmerso en un líquido (Figura I.13.A,B), a presiones subatmosféricas ( $P_2$ ) durante un período de tiempo ( $t_1$ ), el gas contenido en los poros del producto sufre en primer lugar una expansión para equilibrarse con la presión impuesta al sistema, lo que implica, por una parte un nivel de desgasificación de la estructura porosa del alimento en función de la presión aplicada (Figura I.13.C), y por otra, una penetración de líquido por capilaridad una vez alcanzado el equilibrio de presiones en el sistema (Figura I.13.D).

En segundo lugar, la restauración de la presión atmosférica ( $P_1$ ) durante un período ( $t_2$ ) provoca un nuevo gradiente de presiones que va a actuar como fuerza impulsora y que hará que los espacios intercelulares se llenen parcialmente de líquido por mecanismo hidrodinámico (MHD). (Figura I.13.E) (Sanzana Ramos, 2010). La cantidad de líquido que impregne la estructura, dependerá del nivel de desgasificación, y por tanto de la presión de trabajo, así como de las características intrínsecas del producto como su porosidad, tamaño de los poros, características viscoelásticas del material, entre otros (Pérez Cabrera, 2003; Sanzana Ramos, 2010). Esta penetración de líquido,

producida por gradientes de presión, que actúan como fuerzas impulsoras, es reversible y está controlada por la compresión o expansión del gas ocluido en los espacios intercelulares.



**Figura I.13.** Etapas en el proceso de transferencia de materia en un alimento poroso sumergido en un líquido (Adaptado de Fito, 1994).

Restrepo et al. (2012) utilizaron la IV en el desarrollo de cáscaras de naranja mínimamente procesadas fortificadas con potasio, sodio y vitaminas B1, B6 y B9. Para ello cortezas de naranja, a las que previamente se eliminaron los bioflavonoides que les confieren sabor amargo, fueron sumergidas en un líquido de impregnación, que contenía los compuestos bioactivos, durante 5 minutos a una presión de vacío de 20 mm Hg y después se restableció la presión atmosférica y se mantuvieron sumergidas durante 10 minutos más. Los parámetros respuesta estudiados fueron: fracción volumétrica de impregnación,  $X$ , y porosidad efectiva,  $\epsilon_e$ , cuyos valores fueron 8.1% y 34%, respectivamente. Estos autores concluyeron que las cortezas de naranja fueron buenas matrices alimentarias para la obtención de nuevos productos alimenticios enriquecidos con componentes biológicamente activos.

Restrepo et al. (2009) también utilizaron esta técnica de ingeniería de matrices para obtener un producto de frutilla mínimamente procesado y fortificado con vitamina E. Estos autores trabajaron a una presión de vacío de 213.4 mm Hg durante 10 minutos, mientras que el tiempo en que las frutillas estuvieron sumergidas a presión atmosférica fue de 5 minutos. Los parámetros respuesta obtenidos para las muestras impregnadas fueron:  $X= 3\%$  y  $\epsilon_e= 4.9\%$ .

Martelo Castaño et al. (2011) trabajaron en el desarrollo de un producto mínimamente procesado fortificado con vitamina E mediante IV, a partir de apio (*Apium graveolens* L. var. dulce). Para ello, las muestras de apio fueron sumergidas en un líquido de impregnación que contenía vitamina E y fueron sometidas a un vacío de 150 mm Hg durante 5 minutos, posteriormente se restableció la presión atmosférica y se mantuvieron en esas condiciones durante 5 minutos. Como respuesta de impregnación calcularon la fracción volumétrica,  $X$  y la deformación volumétrica en la etapa de vacío  $\gamma$ , cuyos valores fueron 13.49 y -1.40 %, respectivamente. Estos autores concluyeron que el nivel de fortificación con vitamina E alcanzada en apio fue alta.

Dado que las antocianinas son de interés particular para la industria debido a su capacidad para ser utilizadas como colorantes naturales (Konczack y Zhang, 2004) así como por su capacidad antioxidante (Aguilera Ortíz et al., 2011), resulta de interés el estudio de la incorporación de las mismas en la estructura porosa de diferentes frutas y hortalizas como una forma de mejorar sus propiedades físico – químicas y sensoriales mediante, por ejemplo, la técnica de IV. Sin embargo, no se han encontrado publicaciones referidas a la incorporación de estos pigmentos – antioxidantes, mediante IV, a matrices alimenticias, por lo que resulta interesante plantear una investigación en este sentido con el objetivo de elaborar un alimento con propiedades funcionales.

---

## **II. OBJETIVOS**

---

### **II.1 Objetivo general**

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es caracterizar del proceso de extracción de antocianinas a partir de arándanos y estudiar el uso potencial de los extractos como antioxidante y colorante natural en la industria alimentaria.

### **II.2. Objetivos específicos**

El objetivo general se alcanzará con la consecución de los siguientes objetivos específicos.

1. Determinar la influencia de las variables de proceso (temperatura, pH, tiempo de extracción, tipo y proporción de disolvente) en la extracción de antocianinas a partir de arándanos durante un proceso convencional de extracción sólido-líquido.

2. Establecer los valores de las variables del proceso de extracción sólido-líquido que maximicen la recuperación de antocianinas de arándanos.

3. Determinar la influencia de las variables de proceso (temperatura y pH) en el proceso de extracción de antocianinas de arándanos por fermentación.

4. Establecer los valores de las variables del proceso de extracción por fermentación que maximicen la recuperación de antocianinas de arándanos.

5. Caracterizar los extractos de antocianinas obtenidos en las mejores condiciones de extracción según las dos metodologías utilizadas (sólido-líquido y por fermentación).

6. Determinar la degradación de las antocianinas presentes en los extractos obtenidos mediante extracción sólido-líquido y por fermentación en función de la temperatura.

7. Elegir la mejor metodología de extracción y evaluar la potencial aplicación del extracto de antocianina obtenido en la impregnación a vacío de cubos de melón.

---

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

#### III.1. Materia prima

En este estudio se trabajó con arándanos de la variedad O'Neal (Figura III.1) procedentes de la provincia de Entre Ríos (Argentina), por ser esta variedad la de mayor producción en la zona y la que tiene mayores problemas de comercialización en fresco. Esto último es debido principalmente a su rápida pérdida de calidad después de la recolección, especialmente por la disminución de su firmeza y por la elevada proliferación de microorganismos. Por otra parte, esta variedad es una de las que presenta una mayor concentración de antocianinas totales (Zapata et al., 2010) con lo que posee un gran potencial para la obtención de extractos ricos en este componente.



**Figura III.1.** Arándanos de la variedad O'Neal.

Las muestras fueron recolectadas de campos de productores locales y pertenecen a la cosecha de los años 2008, 2009 y 2010. En la Figura III.2 se muestra uno de los campos en los que se recolectaron arándanos para la realización del presente estudio.



**Figura III.2.** Cultivo de arándano de la variedad O'Neal.

Los arándanos utilizados en el presente estudio no cumplieron con el estándar de tamaño para su comercialización en fresco (Resolución SAGPyA N° 201/2007), por lo que estarían dentro de lo que se considera descarte.

Para reducir el deterioro postcosecha, los frutos, inmediatamente después de ser recolectados, se colocaron en bandejas de polietilentereftalato del tipo clamshells (Figura III.3). Después se almacenaron a  $3\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  hasta ser transportados al laboratorio. Allí se introdujeron en una cámara de refrigeración ( $0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ) hasta el momento de utilizarlos en las diferentes experiencias planificadas. El tiempo transcurrido entre el momento de la recolección y la realización de las experiencias no superó una semana, por lo que los frutos utilizados conservaron adecuadamente sus características.



**Figura III.3.** Bandejas de polietilentereftalato (clamshells) donde fueron almacenados los arándanos.

#### **III.2. Obtención de los extractos de antocianina**

Para la extracción de antocianinas de arándanos se emplearon dos metodologías. Una consistió en una extracción con solvente y se la identificó como “Extracción sólido-líquido de antocianinas” (ESLA) y la otra consistió en un proceso fermentativo, que se denominó “Extracción de antocianinas por fermentación” (EAF).

La Figura III.4 esquematiza la metodología de trabajo. Durante el proceso de obtención de los extractos de antocianinas se tomaron muestras (TM) para realizar las determinaciones analíticas señaladas en la figura.

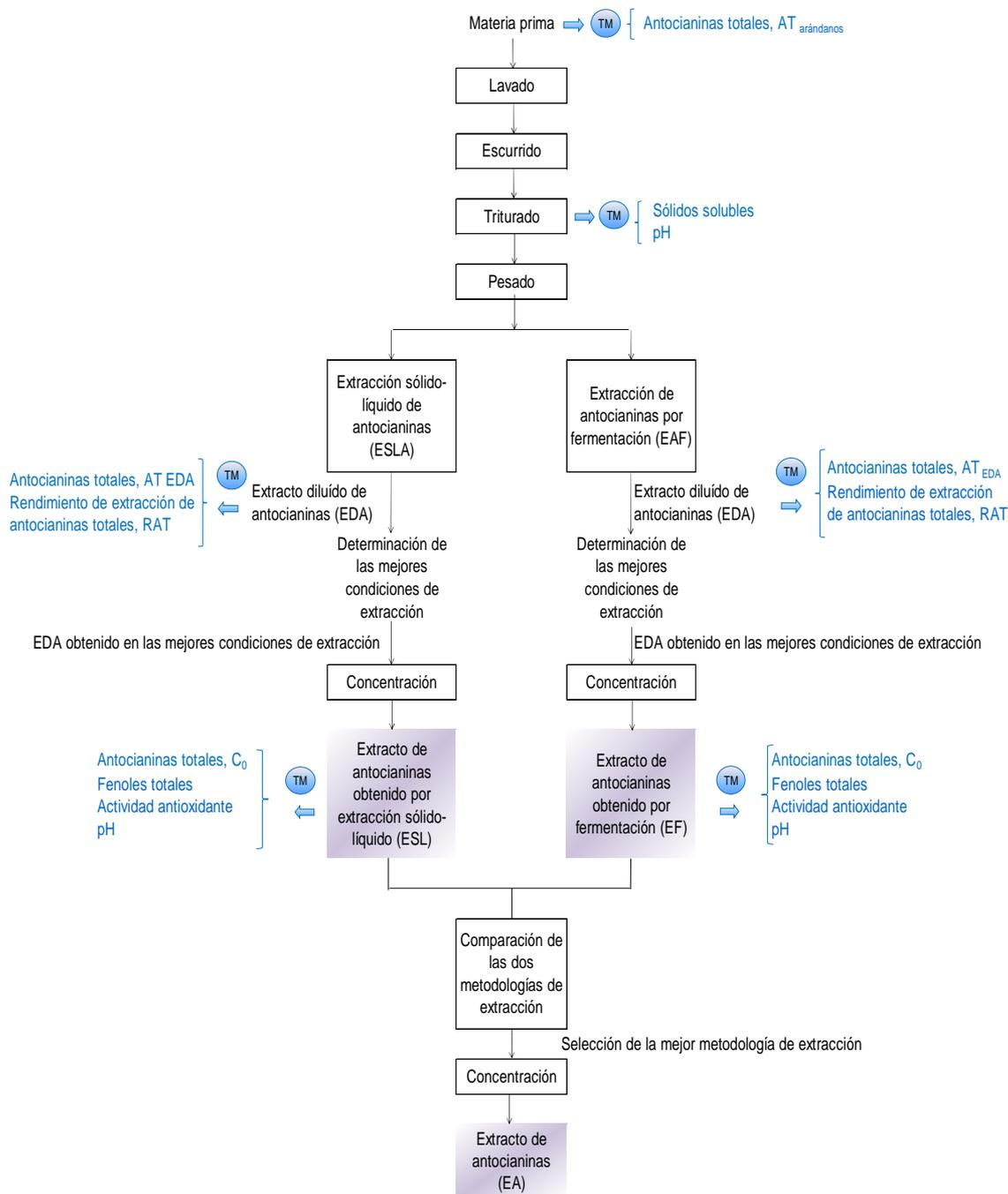


Figura III.4. Diagrama de flujo de obtención de los extractos de antocianina.

### III.2.1. Operaciones previas comunes a la ESLA y a la EAF

Previamente al proceso de extracción de antocianinas, hubo una serie de operaciones comunes a ambas metodologías de extracción que se describen a continuación.

En primer lugar se cuantificaron las antocianinas totales presentes en la materia prima según se describe en el apartado III.6.3. Posteriormente, los arándanos se lavaron en bandejas (Figura III.5) bajo un chorro de agua potable y se escurrieron realizando suaves movimientos del recipiente.



**Figura III.5.** Arándanos de la variedad O'Neal en las bandejas donde se realizó el lavado.

A continuación, los frutos se trituraron con una miniprocadora de mano modelo MR 400 Plus marca Braun (España). En esta etapa de triturado se

tomó una muestra y se determinó la concentración de sólidos solubles y el pH de acuerdo a los apartados III.6.1 y III.6.2.

Posteriormente, los arándanos triturados se pesaron en una balanza marca Moretti, Serie NJW (Argentina) de 1500 g  $\pm$  0.05 g de capacidad. Una parte de la muestra triturada se destinó a la realización de la ESLA y la otra a la EAF. Para ambas metodologías de extracción se emplearon distintas combinaciones de variables de proceso según el correspondiente diseño experimental (Apartado III.2.2).

Como producto de ambos tipos de extracción, se obtuvo un sobrenadante al que se denominó extracto diluido de antocianinas (EDA). En el EDA se cuantificaron las antocianinas totales presentes (Apartado III.6.3) y se calculó el porcentaje de extracción de antocianinas totales, al que se denominó rendimiento de extracción de antocianinas totales (RAT) (Apartado III.6.7). A partir de los datos experimentales obtenidos en los diferentes ensayos previstos se determinaron las mejores condiciones de extracción. Para ello se obtuvieron los valores de las variables de proceso que permitieron obtener un mayor RAT (Apartado III.7.1).

A partir de esta etapa se trabajó, para cada metodología de extracción, únicamente con el EDA que se obtuvo en las mejores condiciones de extracción (mayor RAT). Dicho EDA fue concentrado en rotavapor, Marca Yamato Modelo RE-46 (Japón), a la temperatura de 59  $\pm$  2°C hasta reducir 6 veces su volumen. Al producto resultante se le denominó extracto de antocianinas, ESL cuando se obtuvo por ESLA y EF cuando se realizó la EAF.

Los ESL y EF se caracterizaron mediante determinaciones analíticas de pH (Apartado III.6.2), contenido de antocianinas totales (Apartado III.6.3), contenido de fenoles totales (Apartado III.6.5) y actividad antioxidante (Apartado III.6.6). Los valores obtenidos se compararon estadísticamente para determinar la existencia de diferencias significativas (Apartado III.7.2).

A continuación se estudió la degradación de las antocianinas presentes en los ESL y EF en función de la temperatura de calentamiento y de la temperatura de almacenamiento (Apartados III.3 y III.4). A partir de ahí se seleccionó la mejor metodología de extracción de antocianinas de arándanos (ESLA ó EAF), teniendo en cuenta la metodología de extracción que proporcionó el mejor RAT y el extracto cuyas antocianinas presentaron mayor resistencia a la degradación frente a las temperaturas de calentamiento y almacenamiento.

El producto obtenido con la mejor metodología de extracción (ESL ó EF) fue concentrado, nuevamente, en rotavapor, Marca Yamato Modelo RE-46 (Japón), a la temperatura de  $59 \pm 2^{\circ}\text{C}$  hasta reducir aproximadamente 7 veces su volumen. Al producto resultante de la concentración se lo llamó extracto de antocianinas (EA) que es el que se utilizó en las experiencias de impregnación a vacío de melón.

#### **III.2.2. Diseño experimental**

Con el fin de estudiar la influencia de los factores experimentales en los diferentes tipos de extracciones considerados, se realizó un diseño de experimentos, a partir del cual se generaron tres superficies de respuesta, dos correspondieron a ESLA y una a EAF.

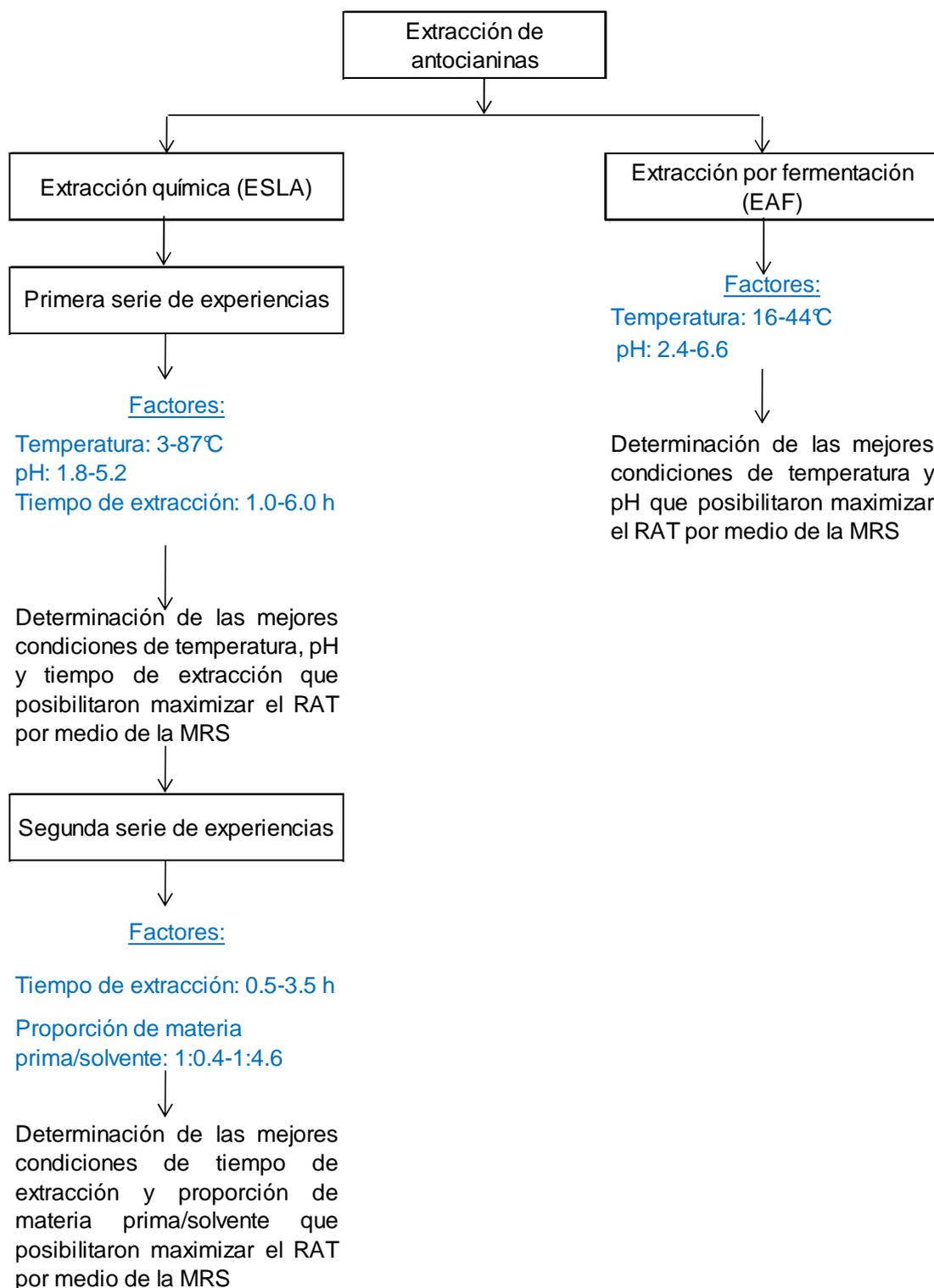
Como variable respuesta del diseño experimental, se tomó el RAT. Cabe aclarar que también podría haberse tomado la concentración de antocianinas presentes en el EDA como variable de respuesta. Sin embargo, la concentración de antocianinas en los frutos de arándanos fue distinta en cada campaña lo que hizo que, independientemente de las condiciones de extracción ensayadas, la concentración presente en los extractos también lo fuera. Por lo tanto, para poder comparar los resultados de diferentes

campañas, se tomó como variable respuesta el rendimiento de extracción de antocianinas totales, RAT.

En la Figura III.6 se muestran los factores estudiados en cada extracción con sus correspondientes regiones experimentales, esto es, los rangos en los que se trabajó cada factor.

Inicialmente se realizó una primera serie de experiencias de ESLA donde los factores experimentales considerados fueron temperatura, pH y tiempo de extracción. En el apartado III.2.3.1 se señalan los niveles de trabajo de cada uno de los factores experimentales. Realizadas las experiencias, se buscó a través de la metodología de superficie de respuesta (MRS) la combinación de niveles de los factores que maximizaron el RAT (Apartado III.7.1).

Posteriormente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la primera serie de experiencias de ESLA, se efectuó un reajuste de las condiciones experimentales que derivó en una segunda serie de experiencias de ESLA. En esta oportunidad se aplicaron los valores de temperatura y pH que en la primera serie de experiencias se identificaron como los que proporcionaron mayor valor de RAT. Los factores experimentales ensayados en esta segunda serie de experiencias fueron el tiempo de extracción y la proporción materia prima / solvente de extracción (MP/S), cuyos niveles de trabajo se indican en el apartado III.2.3.2. Nuevamente realizadas las experiencias, a través de la MRS se obtuvo la mejor combinación de los niveles de los factores que dio por resultado el máximo RAT.



**Figura III.6.** Factores y región experimental de las superficies de respuesta empleadas en la extracción de antocianinas.

Por otra parte, en el caso de las EAF, los factores experimentales considerados fueron la temperatura y el pH, cuyos valores ensayados se indican en el apartado III.2.4. Finalizadas las experiencias, a través de la MRS se obtuvo la combinación de niveles de factores que maximizaron el RAT.

La formulación de los diseños experimentales se realizó con la ayuda del software STATGRAPHICS Centurión XV. Con el planteamiento de estos diseños se pretendió:

- Determinar cómo influyeron los factores estudiados en el RAT.
- Reducir al máximo el número de pruebas experimentales a realizar sin reducir la información proporcionada por las mismas.
- Encontrar las condiciones de extracción que permitieran maximizar el RAT.

#### *III.2.2.1. Diseño experimental para la primera serie de experiencias de extracción sólido-líquido de antocianinas*

En la primera serie de experiencias de ESLA se estudiaron tres factores: temperatura, pH y tiempo de extracción todos ellos a 5 niveles cada uno (Tabla III.1).

**Tabla III.1.** Diseño experimental para la primera serie de experiencias de extracción sólido-líquido de antocianinas.

Bloque	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (h)
1	45	3.5	1.0
1	87	3.5	3.5
1	70	2.5	2.0
1	20	2.5	5.0
1	45	3.5	3.5
1	45	3.5	6.0
1	45	3.5	3.5
1	3	3.5	3.5
1	20	4.5	2.0
1	70	4.5	2.0
1	45	1.8	3.5
1	45	3.5	3.5
1	45	5.2	3.5
1	20	2.5	2.0
1	70	4.5	5.0
1	20	4.5	5.0
1	70	2.5	5.0
2	45	3.5	1.0
2	87	3.5	3.5
2	70	2.5	2.0
2	20	2.5	5.0
2	45	3.5	3.5
2	45	3.5	6.0
2	45	3.5	3.5
2	3	3.5	3.5
2	20	4.5	2.0
2	70	4.5	2.0
2	45	1.8	3.5
2	45	3.5	3.5
2	45	5.2	3.5
2	20	2.5	2.0
2	70	4.5	5.0
2	20	4.5	5.0
2	70	2.5	5.0

Dependiendo del pH las antocianinas pueden encontrarse en distintas formas química (Moldovan et al., 2012; Bordignon et al., 2009). En los estudios consultados sobre el efecto del pH en la estabilidad de las antocianinas, los rangos de experimentación van desde 1.0 a 13.0. En general se puede señalar que bajos valores de pH posibilitaron la obtención un mayor rendimiento en la extracción, lo que probablemente se debió a que valores altos de acidez favorecieron la formación del catión flavilio, que es la forma más estable de las antocianinas. En la presente investigación se decidió trabajar entre los pH 1.8 y 5.2. No se trabajó a valores más bajos de pH dado que el objetivo de extraer antocianinas de arándanos es poder obtener un extracto que pueda incorporarse a alguna matriz alimenticia. Un extracto obtenido con pH muy bajo podría afectar a las características sensoriales del producto en el que fuera añadido. Por otro lado, valores de pH más altos de 5.2 podrían producir una degradación rápida de las antocianinas, por lo que es probable que gran parte de éstas se perdieran en el proceso extractivo (Castañeda-Ovando et al., 2009a).

Como se mencionó en la introducción, la temperatura es otro de los factores que influye en la extracción de antocianinas, pudiendo afectar a la difusividad de las antocianinas en la matriz sólida lo que influye en el proceso de transferencia de materia global. Además, las conversiones estructurales de las antocianinas, al ser reacciones endotérmicas, podrían verse afectadas por la temperatura y provocar un deterioro de las mismas. En trabajos publicados anteriormente se ha visto que, en general, los ensayos se realizaron en un rango de temperatura entre 6 y 90°C. Sin embargo, hay que destacar que en estos casos, los investigadores no llegan a presentar una uniformidad de criterio en cuanto a la temperatura que permitió obtener los mejores rendimientos de extracción. Por todo esto, en el presente trabajo, la temperatura considerada en el diseño experimental estuvo comprendida entre 3 y 87°C.

El tiempo de extracción debe ser el adecuado como para que el solvente utilizado en la extracción ingrese y se difunda en las partículas sólidas de arándanos, llene sus poros, las antocianinas entren en contacto y difundan hacia el solvente y se produzca la transferencia de éstas desde la superficie de la partícula de arándano hacia el seno del solvente extractivo. Además conviene recordar que la transferencia de masa se producirá hasta que el conjunto (partícula – solvente) alcance una concentración de antocianinas uniforme (Ullauri et al., 2010; Brennan et al., 1980). Por otro lado, Fan et al. (2008a) y Gorriti Gutierrez et al. (2009a), estudiando el efecto del tiempo en la extracción de antocianinas de batata morada y de las corontas del maíz morado, respectivamente, trabajaron con un tiempo máximo de 2 h. Teniendo en cuenta todo esto, se planteó efectuar los ensayos de la presente investigación en el rango de tiempo entre 1.0 y 6.0 h. La decisión de realizar ensayos hasta tiempos de 6.0 h fue para considerar un tiempo suficientemente largo para que las estructuras de las antocianinas se vean deterioradas y así el máximo de extracción esté localizado dentro del rango de experimentación.

Definido el rango de estudio de cada uno de los factores, se elaboró un un diseño de superficie de respuesta, compuesto central:  $2^3$ +principal, rotatable y aleatorio. Se decidió trabajar con esta metodología dado que, tal como se señaló en la introducción, es una técnica estadística efectiva para la optimización de variables de proceso (Fan et al., 2008a; Cacace y Mazza, 2003).

Las superficies de respuesta se caracterizan ajustando un modelo a los datos experimentales (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar, 2008). El modelo polinomial que describe las relaciones entre la respuesta medida y los niveles cuantitativos de los factores es el señalado en la Ecuación I.3. En esa ecuación k factores analizados en la primera serie de experiencias de extracción de ESLA fueron 3, definidos por las variables independientes temperatura ( $x_1$ ), pH ( $x_2$ ) y tiempo de extracción ( $x_3$ ) y la variable respuesta fue el RAT (Y).

#### *III.2.2.2. Diseño experimental para la segunda serie de experiencias de extracción sólido-líquido de antocianinas*

En la segunda serie de experiencias de extracción sólido-líquido, se estudiaron dos factores: tiempo de extracción y la proporción de materia prima / solvente de extracción, ambos a 3 niveles (Tabla III.2). Se utilizó también un diseño de superficie de respuesta, compuesto central:  $2^2$ +principal, rotable y aleatorio.

En el apartado anterior se explicó la influencia del tiempo en el rendimiento de extracción de antocianinas de arándanos. Teniendo en cuenta esto y los resultados de la primera serie de experiencias de ESLA, para esta segunda serie de experiencias se decidió trabajar en el intervalo de 0.5 – 3.5 h.

Referido a la proporción de materia prima / solvente de extracción, hay que tener en cuenta, como ya se explicó en el apartado III.2.2.1, que la transferencia de antocianinas hacia el seno del solvente se producirá hasta alcanzar un equilibrio en la concentración de antocianinas en todo el conjunto del sistema de extracción. Por lo tanto, cuanto mayor sea la proporción de materia prima / solvente, mayor será el gradiente de concentración entre las partículas de arándanos y la solución extractiva y así la velocidad de difusión de las antocianinas aumentará (Cacace y Mazza, 2003). Sin embargo, conviene hacer también el análisis desde un punto de vista económico, ya que trabajar con mayor cantidad de solvente, no solo significa un mayor consumo de éste (aunque parte podría llegar a recuperarse), sino que también, se requerirá mayor tiempo para su eliminación a efectos de conseguir un extracto concentrado de antocianinas.

Por todo lo expuesto, en la presente investigación se formuló un diseño en el que la proporción materia prima / solvente estuvo comprendida entre 1:0.4 y 1:4.6 kg/kg.

**Tabla III.2.** Diseño experimental para la segunda extracción sólido-líquido de antocianinas.

Bloque	Tiempo (h)	Proporción materia prima / solvente
1	3.5	1:0.4
1	2.0	1:2.5
1	2.0	1:0.4
1	0.5	1:2.5
1	0.5	1:0.4
1	3.5	1:4.6
1	2.0	1:4.6
1	0.5	1:4.6
1	3.5	1:2.5
1	2.0	1:2.5
1	2.0	1:2.5
2	3.5	1:0.4
2	2.0	1:2.5
2	2.0	1:0.4
2	0.5	1:2.5
2	0.5	1:0.4
2	3.5	1:4.6
2	2.0	1:4.6
2	0.5	1:4.6
2	3.5	1:2.5
2	2.0	1:2.5
2	2.0	1:2.5

*III.2.2.3. Diseño experimental para las experiencias de extracción de antocianinas por fermentación*

En las experiencias de EAF se estudiaron dos factores: temperatura y pH ambos a 5 niveles (Tabla III.3). De nuevo se empleó un diseño de superficie de respuesta, compuesto central:  $2^2$ +principal, rotable y aleatorio.

**Tabla III.3.** Diseño experimental para la extracción de antocianinas por fermentación.

Bloque	Temperatura (°C)	pH
1	30	4.5
1	30	4.5
1	40	3.0
1	30	4.5
1	44	4.5
1	20	3.0
1	16	4.5
1	40	6.0
1	30	2.4
1	20	6.0
1	30	6.6
2	30	4.5
2	30	4.5
2	40	3.0
2	30	4.5
2	44	4.5
2	20	3.0
2	16	4.5
2	40	6.0
2	30	2.4
2	20	6.0
2	30	6.6

En el apartado III.2.2.1 se analizó cómo afectan la temperatura y el pH a la estabilidad de las antocianinas. Sin embargo, dado que la EAF se trata de un proceso fermentativo, no se puede dejar de considerar, a la hora de definir el rango de trabajo de estos dos factores, la influencia de éstos en las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Estas levaduras crecen bien a temperaturas entre

25 y 30°C y dejan de crecer entre los 35-47°C; mien tras que el pH que favorece su desarrollo es 4.0-4.5 y tienen escaso desarrollo en medio alcalino (Pitt y Hocking, 2009).

Por estos motivos se planteó que el intervalo de trabajo para los ensayos fuera de 2.4 – 6.6 para el pH y de 16 - 44°C para temperatura.

#### **III.2.3. Extracción sólido-líquido de antocianinas**

Para las extracciones solido-líquido se mezcló, en erlenmeyer de 250 mL, 100 g de arándanos, previamente triturados con una miniprocadora de mano Braun modelo MR 400 Plus (España), con el solvente de extracción considerado y se agitó al abrigo de la luz y el aire para evitar la degradación de las antocianinas. Posteriormente, la mezcla se centrifugó en centrífuga ALRESA Modelo Digicen Álvarez Redondo S.A. (España), a 4000 rpm durante 20 minutos, con lo que se obtuvieron dos fases, el sobrenadante y el residuo. El residuo se desechó y el sobrenadante obtenido se denominó extracto diluido de antocianinas (EDA).

##### *III.2.3.1. Primera serie de experiencias de extracción sólido-líquido de antocianinas*

En la primera serie de experiencias de ESLA se utilizó como solvente una solución de etanol-agua (50:50 %v/v). Al igual que en la investigación de Miranda (2005) que trabajó en la extracción de antocianinas de cereza, mora y saúco, se utilizó etanol, debido a que es un solvente no tóxico y económico; y agua, para mejorar la extracción de antocianinas hidrofílicas. La relación materia prima / solvente de extracción fue de 1:3 kg/kg.

Las variables de proceso estudiadas y los niveles de trabajo de cada una de ellas fueron:

- temperatura: 3, 20, 45, 70 y 87°C. La temperatura se midió con sensor de temperatura Pt100 marca Wika (España)
- pH: 1.8, 2.5, 3.5, 4.5 y 5.2. El ajuste de dichos valores se realizó con ácido cítrico o hidróxido de sodio utilizando pH-metro Crison Instruments S.A. modelo GLP 21-22 (España)
- tiempo de extracción: 1.0, 2.0, 3.5, 5.0 y 6.0 h. El tiempo se midió con temporizador electrónico de laboratorio marca Marienfeld (Alemania)

El número total de experiencias realizadas fue de 34 y las combinaciones de las variables estudiadas se especificaron en la Tabla III.1.

#### *III.2.3.2. Segunda serie de experiencias de extracción sólido-líquido de antocianinas*

En la segunda tanda de experiencias ESLA realizadas se usó como solvente de extracción etanol acidificado con ácido cítrico al 1%. La decisión de cambiar el solvente se debió al gran contenido de agua que naturalmente tienen los arándanos (85-90 kg de agua/100 kg fruto) lo que produce un efecto de dilución en el extracto obtenido que dificulta su posterior concentración. Además, como se trató en la introducción, el agua puede reaccionar como nucleófilo con el catión flavilio en el C-2 formando la base carbinol incolora, lo que constituye una degradación de las antocianinas y, en consecuencia, un deterioro de su atributo como colorante y antioxidante. Si bien el etanol por tener, al igual que el agua, dos pares de electrones de no enlace podría actuar como nucleófilo, éste presenta mayor impedimento estérico para atacar al C-2 del catión flavilio, lo que estaría disminuyendo la efectividad de los ataques. La

temperatura de trabajo fue de  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  y el pH de 3.5. Se fijaron estos valores porque, como se verá en el apartado de resultados y discusión (Apartado IV), estos fueron los valores de temperatura y pH que se obtuvieron a partir de las superficies de respuesta de la primera serie de experiencias de ESLA y que posibilitaron la obtención de los más altos valores de RAT.

En esta segunda tanda de extracciones se estudiaron las variables a los siguientes niveles especificados:

- tiempo de extracción: 0.5, 2.0 y 3.5 h
- proporción de materia prima / solvente: 1:0.4, 1:2.5 y 1:4.6.

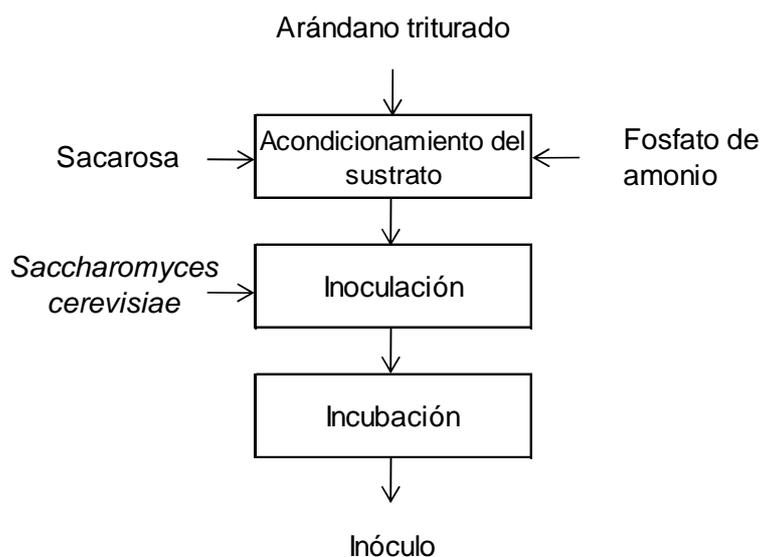
El número total de experiencias de extracción fue de 22 y las combinaciones de los valores de las variables estudiadas se especificaron en la Tablas III.2.

#### **III.2.4. Extracción de antocianinas por fermentación**

La extracción de antocianinas por fermentación consistió en un proceso fermentativo en el que arándanos triturados fueron fermentados con cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Con el proceso fermentativo se buscó obtener, por acción de las levaduras y a partir de los azúcares presentes en el sustrato a fermentar, una solución alcohólica, donde se solubilizaran las antocianinas, además de metabolitos secundarios, tales como alcoholes superiores, éteres etílico, ácidos grasos y acetatos, que pudieran combinarse con las antocianinas y formar estructuras más estables (proantocianidinas) (Pretorius, 2000).

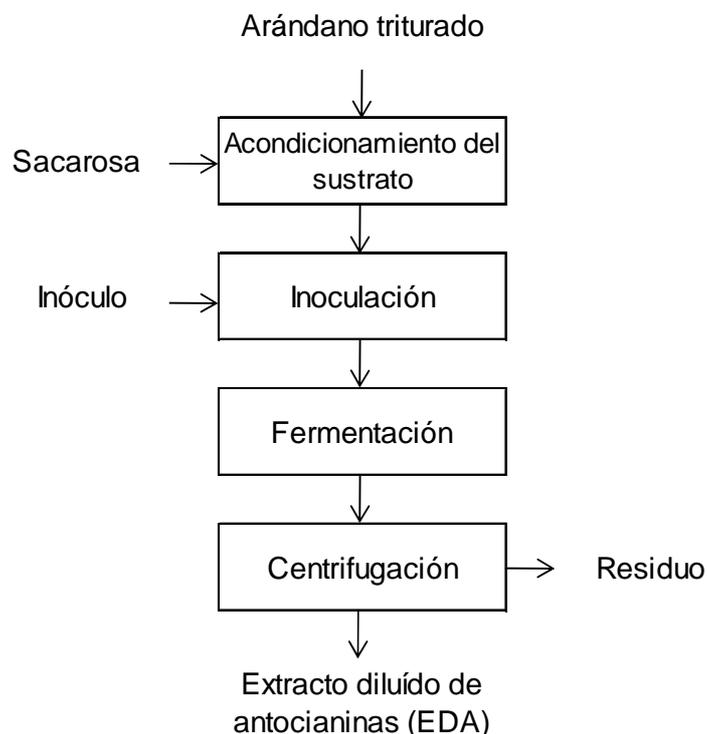
En primer lugar, se preparó el inóculo de fermentación y posteriormente se llevó a cabo la fermentación para la realizar la extracción de antocianinas. En la Figura III.7 se muestra el procedimiento seguido para la preparación del inóculo de fermentación. Ésta se realizó a partir de una fracción de arándanos

triturados cuya concentración se ajustó a 12°Brix mediante la adición de sacarosa y a la que se agregó un 0.05 % del peso final de fosfato de amonio como fuente de nitrógeno y fósforo para favorecer el desarrollo de las levaduras. Posteriormente, se inoculó un 0.04% de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* liofilizadas (el porcentaje es respecto al peso de arándano triturado más la sacarosa adicionada para el acondicionamiento del sustrato). La mezcla se incubó, en condiciones aeróbicas, en estufa a 30°C durante 24 horas y con nivel de agitación a 120 oscilaciones por min (agitador orbital y de vaivén marca Selecta, España), para favorecer la reproducción de las levaduras. De esta forma, se obtuvo una suspensión de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* que se denominó inóculo.



**Figura III.7.** Preparación del inóculo de extracción.

Tras la obtención del inóculo de extracción, se procedió a la extracción de antocianinas por fermentación (Figura III.8.).



**Figura III.8.** Metodología de extracción de antocianinas por fermentación.

En primer lugar, se preparó el sustrato para la extracción. Para ello se ajustó la concentración de sólidos solubles de los frutos triturados a 12°Brix mediante la adición de sacarosa. La concentración de sólidos solubles se midió con refractómetro termo-compensado Atago (Japón) (Apartado III.6.1). También se ajustó el pH, adicionando ácido cítrico o hidróxido de sodio, de acuerdo al valor correspondiente al diseño experimental. Posteriormente, se incorporó el inóculo (0.04% del peso del arándano triturado más la sacarosa adicionada para acondicionar el sustrato) para que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* llevaran a cabo la fermentación durante 72 h. La fermentación se realizó a diferentes temperaturas según el diseño experimental correspondiente (Tabla III.3). Finalizada la fermentación, la mezcla del sustrato y el inóculo se centrifugó (centrífuga ALRESA, Modelo Digicen, Álvarez

Redondo S.A., España), a 4000 rpm durante 20 minutos y se descartó el residuo. El sobrenadante obtenido constituyó el extracto diluido de antocianinas (EDA) obtenido con este método (EAF).

En la EAF se estudió la influencia de las variables temperatura y pH sobre el RAT, a los niveles señalados a continuación:

- temperatura: 16, 20, 30, 40 y 44°C
- pH: 2.4, 3.0, 4.5, 6.0 y 6.6.

El número total de experiencias de extracción fue de 22 y se describieron en el apartado de diseño experimental (Tabla III.3).

#### **III.3. Estudio de degradación térmica**

El interés de esta investigación radica en la posibilidad de utilizar los extractos obtenidos en la industria alimentaria ya sea como colorante o como antioxidante en alimentos formulados, debido a sus atractivos colores como así también su potencial efecto beneficioso para la salud (Jie et al., 2012; Sari et al., 2012). Dado que existen procesos tecnológicos que requieren temperaturas elevadas y que las antocianinas son sensibles a las altas temperaturas (Buckow et al., 2010), se consideró interesante evaluar el efecto de esta variable.

La degradación térmica de las antocianinas de los extractos fue estudiada a 55, 65, 75 y 85°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Al comienzo del ensayo se cuantificó el contenido inicial de antocianinas ( $C_0$ ) (Apartado III.6.3). Los extractos contenidos en tubos de ensayos con tapa a rosca, se calentaron en un baño termostático a las temperaturas mencionadas. Posteriormente, a los tiempos 1, 2, 3, 4, 12, 18, 24 y 36 h se tomaron muestras para cuantificar la concentración de antocianinas (C) según la técnica analítica descrita en el apartado III.6.3.

El estudio se efectuó hasta que la retención de antocianinas fue inferior al 50%, es decir hasta que la concentración de antocianinas disminuyó por lo menos a la mitad de la concentración inicial.

La modelización del efecto de la temperatura se realizó utilizando los enfoques clásicos empíricos de Arrhenius (Nayak et al., 2011; Buckow et al., 2010; Pereira Kechinski et al., 2010; Cisse et al., 2009) y el enfoque basado en la termodinámica estadística de Eyring (Nayak et al., 2011; Cisse et al., 2009). Estos modelos utilizan funciones termodinámicas como la energía libre, entalpía, entropía y la energía de activación (Pereira Kechinski et al., 2010) para describir la dependencia de la degradación de ciertos componentes presentes en matrices alimenticias, como las antocianinas, con la temperatura. Con el propósito de analizar cómo afecta la temperatura de calentamiento a las antocianinas presentes en ESL y EF, se determinaron el orden de la cinética de degradación con respecto a la temperatura de calentamiento y se calcularon los parámetros mencionados a continuación:

- Constante de velocidad de degradación de antocianinas,  $k$
- Tiempo de vida media,  $t_{1/2}$
- Coeficiente de temperatura,  $Q_{10}$
- Energía de activación,  $E_a$
- Entalpía de activación,  $\Delta H^*$
- Entropía de activación,  $\Delta S^*$
- Energía libre de Gibbs de activación,  $\Delta G^*$

En los apartados siguientes se describen estos parámetros y la forma en que se obtuvieron.

### III.3.1. Orden de la cinética de degradación de las antocianinas

El orden de la cinética de degradación de las antocianinas se determinó a partir de la variación de la concentración de antocianinas presentes en los extractos (C) en función del tiempo de calentamiento (t).

Según el orden de la reacción, la evolución de la concentración con el tiempo puede ser descrita mediante diferentes ecuaciones (Casp y Abril, 1999; Oliveira F. y Oliveira J., 1999). Así, para una reacción de orden cero sería la ecuación III.1 y para una de orden uno, la ecuación III.2.

$$C = C_0 - k t \quad (III.1)$$

$$C = C_0 e^{-kt} \Rightarrow \ln C = \ln C_0 - k t \quad (III.2)$$

Dónde:

C: Concentración de antocianinas al tiempo t (mg cianidina-3-glucósido/100mL)

C<sub>0</sub>: Concentración inicial de antocianinas (mg cianidina-3-glucósido/100mL)

t: Tiempo de extracción (h)

k: Constante de velocidad de degradación, (h<sup>-1</sup>).

Para analizar el ajuste a una cinética de orden cero, se representó, para cada temperatura de calentamiento, C en función del tiempo. Para analizar el ajuste a una cinética de orden uno se representó el ln C en función del tiempo.

A continuación se realizó el análisis de regresión para cada una de las dos ecuaciones según se describe en el apartado III.7.3.

Estos estudios permitieron establecer cuál de los dos modelos anteriores describió mejor la degradación de las antocianinas con el tiempo. Para los análisis posteriores se trabajó únicamente con el modelo de mejor ajuste.

### **III.3.2. Constante de velocidad de degradación**

A partir de la pendiente de la curva que describe la variación de la concentración de antocianinas en función del tiempo de calentamiento según el orden de reacción calculado, se obtuvieron los valores de las constantes de velocidad de degradación de las antocianinas presentes en ambos extractos ( $k$ ) a las temperaturas de 55, 65, 75 y 85°C.

### **III.3.3. Tiempo de vida media**

El tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) es el tiempo necesario para que la concentración de un reactivo descienda a la mitad de su valor inicial (Brown, et al., 2004).

En las reacciones de orden cero al aumentar la concentración inicial, disminuye el tiempo de vida media según la Ecuación III.3 (Kotz et al., 2005).

$$t_{1/2} = \frac{C_0}{2k} \quad \text{(III.3)}$$

En las reacciones de primer orden la vida media es independiente de la concentración inicial, tal y como se muestra en la ecuación III.4. (Casp y Abril, 1999).

$$t_{1/2} = \frac{\ln C_0 - \ln \frac{C_0}{2}}{k} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0.693}{k} \quad (\text{III.4})$$

Para determinar el tiempo de vida media de las antocianinas en los ESL y EF, se reemplazaron, para cada temperatura estudiada, los valores de k en el modelo de mejor ajuste.

#### III.3.4. Coeficiente de temperatura $Q_{10}$

El coeficiente de temperatura  $Q_{10}$  es una medida de la sensibilidad de los procesos químicos a la temperatura. Este coeficiente indica el aumento de la velocidad de una reacción por cada aumento de 10°C en la temperatura (Jay, 1994).

El coeficiente de temperatura,  $Q_{10}$ , se calculó, para cada intervalo de temperatura, mediante la Ecuación III.5 (Fanjul e Hiriart, 2008).

$$Q_{10} = \left( \frac{k_{T+10}}{k_T} \right) \quad (\text{III.5})$$

Dónde:

$k_T$ : constante de velocidad del proceso a la temperatura T, ( $h^{-1}$ )

$k_{T+10}$ : constante de velocidad a una temperatura 10°C may or, ( $h^{-1}$ ).

### III.3.5. Energía de activación

Para que haya una transformación química, es necesario que las partículas (ya sean átomos, moléculas o iones) choquen las unas con las otras. No todos los choques que tienen lugar entre las partículas provocan la reacción entre éstas. Para que un choque sea eficaz o dé lugar a la transformación, es preciso que las moléculas tengan una velocidad y un contenido energético mínimo, de lo contrario, simplemente rebotan sin sufrir ningún cambio. Desde otro punto de vista, se puede decir que para que las moléculas de los reactivos se transformen, deben superar una cierta barrera de energía, ya que solamente las moléculas que posean energía suficiente para superar la barrera podrán sufrir un choque eficaz. La diferencia entre la energía de los reactivos y la energía mínima que deben alcanzar para reaccionar es lo que se conoce como energía de activación (De Anda Cárdenas, 2006).

La energía de activación se puede calcular a partir de la expresión de Arrhenius (Ecuación III.6).

$$k = k_0 e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (III.6)$$

Donde:

---

k: constante de velocidad de degradación de antocianinas, ( $\text{h}^{-1}$ )

$k_0$ : factor de frecuencia o factor preexponencial (min)

$E_a$ : energía de activación (kJ/mol)

R: constante universal de los gases (8.314 J/mol K)

T: temperatura absoluta (K)

La ecuación de Arrhenius se puede escribir en forma logarítmica (Ecuación III.7).

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{R T} \quad (\text{III.7})$$

### III.3.6. Funciones termodinámicas

El modelo de Eyring está basado en la teoría del estado de transición. Esta teoría, también llamada del complejo activado, describe la reacción entre dos especies pasando por la formación de un complejo activado inestable y en equilibrio con los reactivos, que se descompone en los productos (Engel y Reid, 2007; Atkins, 2007). Sus parámetros son la entalpía de activación ( $\Delta H^*$ ) y la entropía de activación ( $\Delta S^*$ ).

La entalpía es el calor liberado o absorbido durante una reacción química en condiciones determinadas de presión y temperatura (Martínez Márquez, 2009). El signo positivo de  $\Delta H^*$  representa un estado endotérmico

entre el complejo activado y los reactantes, lo que lleva a un incremento de la degradación con la temperatura (Al-Zubaidy y Khalil, 2007).

La entropía es la medida de la energía que se dispersa en un proceso y permite determinar si se puede pasar de un estado a otro por medio de un cambio espontáneo (Atkins, 2008). Esta función puede interpretarse como una medida del desorden del sistema. Cuanto más positiva es la entropía el estado activado ( $\Delta S^*$ ) está menos ordenado, por lo que tiene más grados de libertad que los reactivos (Avery, 2002).

El cambio de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) de un proceso tiene en cuenta los cambios de entalpía y entropía e indica si el proceso está termodinámicamente favorecido a una temperatura y presión dadas. El proceso es espontáneo cuando el signo de esta función es negativo, es decir que una reacción química se produce sin necesidad de un suministro exterior de energía (Melo y Cuamatzi, 2006). La energía libre de Gibbs de activación ( $\Delta G^*$ ) representa la diferencia de energía libre entre el estado activado y los reactantes (Al-Zubaidy y Khalil, 2007). Cuanto más pequeña es la energía libre de Gibbs más rápidamente avanza la reacción (Brown et al., 2004), mientras que a mayor  $\Delta G^*$  menor es la constante de velocidad de reacción y por lo tanto más lenta es una reacción (Sykes, 1982).

La Ecuación III.8 muestra el modelo de Eyring, que relaciona las funciones termodinámicas mencionadas (Cisse et al., 2009).

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta G^*}{RT}} = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta S^*}{R}} e^{\frac{-\Delta H^*}{RT}} \quad (\text{III.8})$$

Dónde:

---

$k_B$ : Constante de Boltzmann ( $1.381 \cdot 10^{-23}$  J/K)

T: Temperatura absoluta (K)

h: Constante de Planck ( $6.626 \cdot 10^{-34}$  J s)

$\Delta G^*$ : Energía libre de Gibbs de activación (kJ/mol)

$\Delta S^*$ : Entropía de activación (J/mol K)

$\Delta H^*$ : Entalpía de activación (kJ/mol)

R: Constante universal de los gases (8.314 J/mol K)

La ecuación de Eyring se puede escribir en forma logarítmica (Ecuación III.9):

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^*}{R} - \frac{\Delta H^*}{R} - \frac{\Delta H^*}{RT} \quad (\text{III.9})$$

Para obtener la entalpía de activación ( $\Delta H^*$ ) y la entropía de activación ( $\Delta S^*$ ) se representó la relación  $\ln \frac{k}{T}$  en función de  $\frac{1}{T}$ . Con el valor de la pendiente ( $\frac{\Delta H^*}{R}$ ) y de la constante universal de los gases se calculó  $\Delta H^*$  y con la ordenada en el origen ( $[\ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^*}{R}]$ ) se obtuvo  $\Delta S^*$ .

La energía libre de Gibbs puede ser expresada en términos de la entalpía y la entropía de activación (Ecuación III.10) (Atkins, 1999):

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T \Delta S^* \quad (\text{III.10})$$

Dónde:

$\Delta G^*$ : Energía libre de Gibbs de activación (kJ / mol)

$\Delta H^*$ : Entalpía de activación (kJ / mol)

$\Delta S^*$ : Entropía de activación (J/mol K)

T: Temperatura (K)

A partir de la ecuación III.10 se determinó  $\Delta G^*$  a la temperatura de 25°C.

#### **III.4. Estudio de degradación durante el almacenamiento**

Se mencionó anteriormente que las antocianinas son sensibles a la elevación de la temperatura y que el propósito de la obtención de un extracto de antocianinas es el de poder utilizarlo como antioxidante y/o colorante en la industria alimentaria. Por tal motivo, también resulta de interés analizar cómo afecta la temperatura de almacenamiento a las antocianinas presentes en los ESL y EF.

Para ello, muestras de ESL y EF fueron almacenados a 5 y 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), al abrigo de la luz y el oxígeno, con el propósito de analizar cómo influye la temperatura de almacenamiento en la degradación de estos pigmentos-antioxidantes a las temperaturas mencionadas.

Al inicio de este ensayo se determinó la concentración inicial de antocianinas ( $C_0$ ) (día 1) y luego se tomaron muestras a los 15, 60, 115, 160, 246, 350 y 426 días donde se cuantificó la concentración de antocianinas ( $C$ ) según la técnica analítica descrita en el apartado III.6.3.

A partir de estos datos experimentales, se determinó para cada temperatura de almacenamiento (5 y 25°C) el orden de la cinética de degradación, la constante de velocidad de degradación y el tiempo de vida media, tal y como se ha explicado. Cabe aclarar que durante el estudio de almacenamiento, la variable  $t$  se refiere al tiempo de almacenamiento (apartados III.3.1, III.3.2 y III.3.3).

#### **III.5. Utilización de extracto de antocianinas en la industria alimentaria**

Teniendo en cuenta la preocupación pública por la seguridad de los colorantes sintéticos en los alimentos, la posibilidad de utilizar colorantes naturales y las propiedades bioactivas de las antocianinas y de otros compuestos fenólicos, se evaluó la potencial aplicación del extracto de antocianinas (EA) obtenido a partir de arándanos en la industria alimentaria. En virtud de que otro de los frutos cuantitativamente importantes producidos en la provincia de Entre Ríos es el melón y que éste únicamente se comercializa en fresco, se estudió la posibilidad de enriquecer por impregnación a vacío porciones de melón con extracto de antocianinas.

Para el estudio se utilizaron melones del tipo Rocío de Miel obtenidos del mercado local, que se cortaron en cubos de 2 cm de lado.

La operación de impregnación a vacío (IV) (Figura III.9) se dividió en dos etapas

- Etapa 1 o etapa de vacío o presión reducida ( $IV_1$ )

- Etapa 2 o etapa a presión atmosférica (IV<sub>2</sub>).

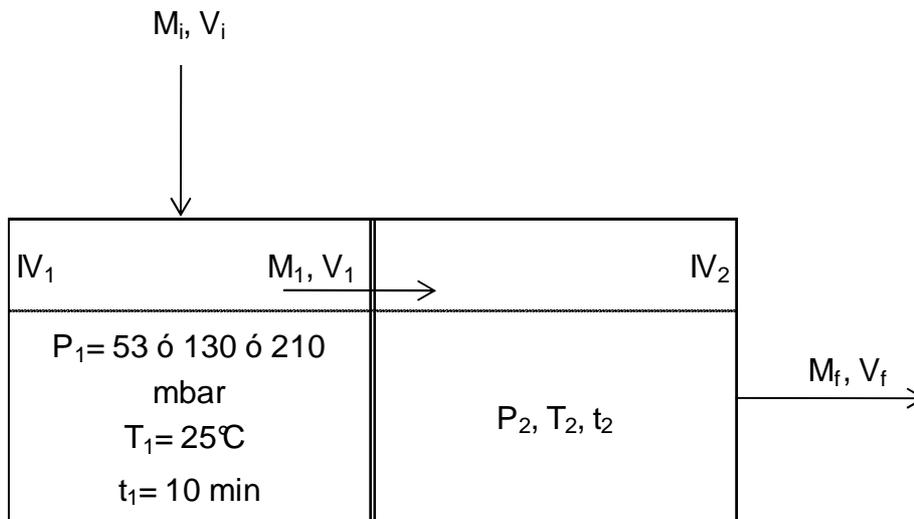
En la primera etapa (Etapa 1) los cubos de melón fueron sumergidos en la solución o líquido de impregnación (LI). En este caso se utilizó como LI el EA. El conjunto se colocó en la cámara de impregnación, conformado por un desecador conectado a una bomba de vacío Schott Iberica (España), a través de un sistema condensador (Figura III.9).



**Figura III.9.** Cámara de IV.

Se ensayaron 3 presiones de vacío diferentes: 210, 130 y 53 mbar. El tiempo de vacío fue para todos el mismo, 10 minutos ( $t_1$ ), y la temperatura de  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , la que se midió con sensor de temperatura Pt100 marca Wika (España) (Figura III.10). Con esta etapa se pretendió producir una expansión del gas contenido en la estructura porosa del melón. Al salir este gas, cabe

esperar que se produzca un arrastre de parte del líquido extracelular. Una vez equilibradas las presiones (interior de los poros y exterior a la muestra) se produciría una entrada parcial del EA en el interior de los poros como consecuencia de la presión capilar (Fito et al., 1996).



**Figura III.10.** Condiciones de la etapa 1 o etapa de vacío (IV<sub>1</sub>) de la operación de IV.

Dónde:

$M_i$ : Masa de la muestra de melón inicial (kg)

$M_1$ : Masa de la muestra de melón después de la etapa de vacío (kg)

$V_i$ : Volumen de melón sin impregnar ( $\text{m}^3$ )

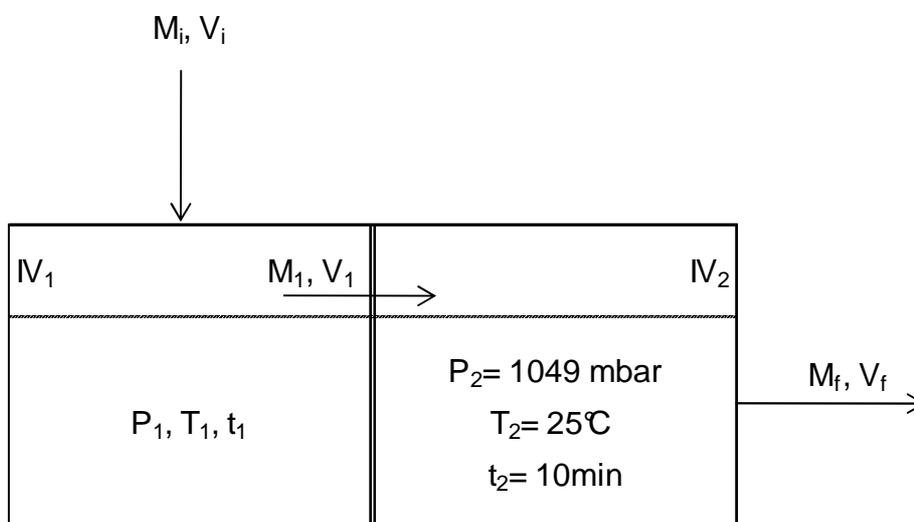
$V_1$ : Volumen de melón después de la etapa de vacío ( $\text{m}^3$ )

$P_1$ : Presión de vacío (mbar)

$T_1$ : Temperatura de la etapa de vacío (°C)

$t_1$ : Tiempo de la etapa de vacío (min)

En una segunda etapa (Etapa 2) el conjunto muestra-disolución de impregnación se sometió a la presión atmosférica (1049 mbar) durante un tiempo de 10 minutos ( $t_2$ ) a la temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$  (Figura III.11). Esta etapa buscó producir una entrada del EA en los espacios extracelulares del melón por mecanismo hidrodinámico (MHD). Los gradientes de presión responsables del MHD producen, a su vez, el acoplamiento de fenómenos mecánicos de deformación-relajación de la estructura (Salvatori et al., 1998).



**Figura III11.** Condiciones de la etapa 2 o etapa a presión atmosférica ( $IV_2$ ) de la operación de IV.

Dónde:

$M_f$ : Masa de la muestra de melón después del proceso de IV (kg)

$V_f$ : Volumen de melón después del proceso de IV ( $m^3$ )

$P_2$ : Presión atmosférica (mbar)

$T_2$ : Temperatura de la etapa a presión atmosférica ( $^{\circ}C$ )

$t_2$ : Tiempo de la etapa de presión atmosférica (min)

Cada ensayo se repitió 5 veces para evitar en la medida de lo posible la influencia de la variabilidad natural muestral y asegurar la significación de los resultados obtenidos.

Durante el proceso de IV se midieron los pesos y volúmenes de las muestras de melón al inicio ( $M_i$  y  $V_i$ ), después de la etapa de vacío ( $M_1$  y  $V_1$ ) y al finalizar el proceso de IV ( $M_f$  y  $V_f$ ), como así también los pesos y volúmenes del líquido de impregnación LI al inicio ( $M_{LIi}$  y  $V_{LIi}$ ), después de la etapa de vacío ( $M_{LI1}$  y  $V_{LI1}$ ) y al final ( $M_{LI f}$  y  $V_{LI f}$ ) (Apartados III.6.10 y III.6.11). La respuesta de la IV se cuantificó en términos de: fracción volumétrica,  $X$ ; deformación volumétrica,  $\gamma$ ; y porosidad efectiva,  $\varepsilon_e$ ; según se describe en los apartados III.5.1, III.5.2 y III.5.3 (Cortés et al., 2007; Ostos et al., 2012; Martelo Castaño, 2011; Sanzana Ramos, 2010). Se tomaron estos parámetros como respuesta de la IV dado que este proceso:

- Es un método que aprovecha la micro estructura porosa de las matrices de los alimentos para reemplazar el gas ocluido en su estructura celular por solutos contenidos en el LI, mediante acción capilar y gradientes de presión impuestas en el sistema;
- Involucra un intercambio de materia promovido por la acción de un mecanismo hidrodinámico entre un sistema sólido-líquido, acoplado a un

fenómeno de deformación-relajación en la matriz sólida del alimento (Ostos, et al., 2012).

### III.5.1. Fracción volumétrica

La fracción volumétrica ( $X$ ) es el cociente entre el volumen de solución impregnada y el volumen de muestra inicial (Martelo Castaño et al., 2011).

Este parámetro se obtuvo para la etapa de vacío, la etapa a presión atmosférica y para el proceso global. Para ello se midieron la masa de los cubos de melón a impregnar al inicio del proceso ( $M_i$ ), después de la etapa de vacío ( $M_1$ ) y al final del proceso de IV ( $M_f$ ). También se obtuvo el volumen de los cubos de melón sin impregnar al inicio de la IV ( $V_i$ ) y la densidad del LI, según se describe en los apartados III.6.10 y III.6.11, respectivamente. Posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes a las ecuaciones que se muestran a continuación (Cortés et al., 2007).

$$X_1 = \frac{(M_1 - M_i)/\rho_{LI}}{V_i} \quad (\text{III.11})$$

$$X = \frac{(M_f - M_i)/\rho_{LI}}{V_i} \quad (\text{III.12})$$

$$(\text{III.13})$$

$$X_2 = X - X_1$$

Dónde:

$X_1$ : Fracción volumétrica de impregnación en la etapa de vacío ( $m^3$  de solución impregnada /  $m^3$  de melón sin impregnar)

$X_2$ : Fracción volumétrica de impregnación en la etapa a presión atmosférica ( $m^3$  de solución impregnada /  $m^3$  de melón sin impregnar)

$X$ : Fracción volumétrica de impregnación al final del proceso de IV ( $m^3$  de solución impregnada /  $m^3$  de melón sin impregnar)

$\rho_{LI}$ : Densidad del líquido de impregnación ( $kg / m^3$ )

### III.5.2. Deformación volumétrica

La deformación volumétrica ( $\gamma$ ) es el cociente entre el volumen de deformación en la muestra ( $\Delta V$ ) y el volumen de muestra inicial ( $V_i$ ) (Martelo Castaño et al., 2011). El volumen de deformación de la muestra se obtuvo, para la etapa de vacío calculando la diferencia entre el volumen de los cubos de melón al final ( $V_1$ ) y al inicio de esta etapa ( $V_i$ ) y para la etapa a presión atmosférica calculando la diferencia entre el volumen de los cubos de melón al final de esta etapa ( $V_2$ ) y al inicio de la IV ( $V_i$ ).

Para ello se midieron los volúmenes de los cubos de melón sin impregnar al inicio de la IV ( $V_i$ ), los volúmenes de los cubos de melón al final de la etapa de vacío ( $V_1$ ) y al final del proceso de IV ( $V_2$ ), según se describe en el apartado III.6.10. Los datos obtenidos se utilizaron para realizar los cálculos de las ecuaciones que figuran a continuación (Ostos et al., 2012).

$$\gamma_1 = \frac{\Delta V_1}{V_i} = \frac{V_1 - V_i}{V_i} \quad (\text{III.14})$$

$$\gamma = \frac{\Delta V}{V_i} = \frac{V_2 - V_i}{V_i} \quad (\text{III.15})$$

$$\gamma_2 = \gamma - \gamma_1 \quad (\text{III.16})$$

Dónde:

$\gamma_1$ : Deformación de la etapa de vacío ( $\text{m}^3$  de deformación en la muestra /  $\text{m}^3$  de la muestra inicial)

$\gamma_2$ : Deformación durante la etapa a presión atmosférica ( $\text{m}^3$  de deformación en la muestra /  $\text{m}^3$  de la muestra inicial)

$\gamma$ : Deformación global ( $\text{m}^3$  de deformación en la muestra /  $\text{m}^3$  de la muestra inicial)

$\Delta V_1$ : Volumen de deformación de la muestra al final de la etapa de vacío ( $\text{m}^3$ )

$\Delta V$ : Volumen de deformación de la muestra al final de paso de presión atmosférica ( $\text{m}^3$ )

### III.5.3. Porosidad efectiva

La cantidad de líquido impregnado en los cubos de melón dependerá del nivel de desgasificación del gas ocluido en los poros de éste, mientras que el

---

nivel de desgasificación es función de la relación entre la presión atmosférica y de vacío (Pérez Cabrera, 2003). El cociente entre el volumen de gas ocluido en los poros de la muestra a impregnar y el volumen inicial de la muestra ( $V_i$ ) se denomina porosidad efectiva ( $\epsilon_e$ ).

Con los valores de X, presión de vacío a la que se realizó la experiencia y presión atmosférica se calculó la  $\epsilon$  según las ecuaciones III.17 y III.18 (Cortés et al., 2007). La ciudad de Concordia (que es la ciudad donde se realizaron las experiencias) se encuentra a 22 m sobre el nivel del mar, a lo que le corresponde una presión atmosférica normal de 1016 hPa.

$$\epsilon_e = \frac{X}{1 - \frac{1}{r}} \quad \text{(III.17)}$$

$$r = \frac{\text{Presión atmosférica}}{\text{Presión de vacío}} \quad \text{(III.18)}$$

Dónde:

$\epsilon_e$ : Porosidad efectiva ( $\text{m}^3$  de aire /  $\text{m}^3$  de melón sin impregnar)

r: Relación de compresión

### III.6. Determinaciones analíticas

A continuación se describen las determinaciones analíticas realizadas a las diferentes muestras.

### **III.6.1. Sólidos solubles**

La determinación de la cantidad de sólidos solubles se efectuó por el método refractométrico (15TH 983.17 –976.20; AOAC, 1990), con un refractómetro termo-compensable Atago modelo DTM-1 (Japón). Para ello, se colocó una gota de la mezcla de frutos triturados en el lector del aparato. Los resultados se expresaron en °Brix.

### **III.6.2. pH**

La medida del pH se realizó con un pH-metro Crison Instruments S.A. modelo GLP 21-22 (España), previamente calibrado con tampones a pH 4 y 7.

### **III.6.3. Antocianinas totales**

Esta técnica se utilizó para cuantificar las antocianinas totales en el EDA, ESL, EAF, EA, en los arándanos y en los cubos de melón impregnados.

Las antocianinas pueden estar en diferentes estructuras reversibles en función del pH, lo que se manifiesta con cambios en sus espectros de absorción. A pH 1.0 las antocianinas existen en la forma altamente coloreada y a pH 4.5 están predominantemente en forma incolora. Por lo tanto, la concentración de antocianina monomérica se determinó por el método de pH-diferencial (Giusti y Wroslstad, 2001). Una alícuota de una solución acuosa de antocianinas fue ajustada a pH 1.0 y otra a pH 4.5. La diferencia en la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción es proporcional al contenido de antocianinas (Wroslstad, 1993).

Para la cuantificación se preparó tampón a pH 1.0 de cloruro de potasio 0.025 M ajustado con ácido clorhídrico y tampón a pH 4.5 de acetato de sodio

0.4 M ajustado con ácido acético. A una alícuota (entre 50 y 300  $\mu\text{L}$ ) de EDA se le agregaron 5 mL de solución tampón de cloruro de potasio (pH 1.0) y se midió la absorbancia a 510 nm (longitud de onda de máxima absorción de antocianinas) con un espectrofotómetro Shimadzu, UV-VISIBLE, modelo UV-1603 (Japón). Para la realización de la medida, la muestra se diluyó de forma tal que a pH 1.0 tuviera una absorbancia comprendida en el rango de 0.1 a 1.0.

Posteriormente y con el propósito de efectuar la corrección de la medida debida a la presencia de compuestos degradados o sustancias interferentes, se midió la absorbancia a 700 nm. Las mediciones se realizaron contra un blanco de agua ultra pura. La misma dilución y procedimiento se realizó pero utilizando solución tampón de acetato de sodio (pH 4.5) con el fin de eliminar la absorbancia debida a la intensidad de color de pigmentos poliméricos amarrados y antocianinas degradadas.

La concentración de las antocianinas se expresó como mg cianidina-3-glucósido/100mL de extracto, calculada de acuerdo a las siguientes expresiones (Wrolstad et al., 2005):

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=4.5} \quad (\text{III.19})$$

$$\text{AT} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\Delta A \text{ PM FD } 1000}{\epsilon l} \quad (\text{III.20})$$

Dónde:

AT: Antocianinas totales

$\Delta A$ : Cambio en la absorbancia

PM: Masa molecular para cianidina-3-glucósido, 449.2 g/mol

FD: Factor de dilución

$\epsilon$ : Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido, 26900

l: Longitud de paso de celda, 1cm

1000: Factor de conversión de gramos a miligramos

Para la determinación del contenido de antocianinas en los extractos ESL, EF y EA se empleó el mismo procedimiento pero variando la dilución. En estos casos se utilizaron entre 10 y 200  $\mu$ L de ESL ó EF y 10 mL de tampón, de forma que la absorbancia de la muestra a pH 1 y a 510 nm fuera inferior a 1.0. La concentración de las antocianinas se expresó como mg cianidina-3-glucósido/100 mL de extracto.

Para determinar directamente la cantidad de antocianinas presentes en los frutos de arándanos, se trituraron 50 g de bayas con una miniprocadora de mano modelo MR 400 Plus (España). Posteriormente, se pesó 1 g con balanza analítica Sartorius modelo BP221S (Alemania) de 220 g de capacidad y  $d=0.1$  mg y se efectuó una extracción con metanol acidificado con ácido clorhídrico al 1% en tres etapas, manteniendo una relación en peso de muestra-solvente 1:10. En la primera etapa, la mezcla muestra-solvente se agitó con agitador magnético 30 minutos al abrigo de la luz y el oxígeno. Luego se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos y se guardó el sobrenadante. Al residuo se le realizó una nueva extracción, se centrifugó y se separó el sobrenadante. Con el nuevo residuo de esta segunda etapa se procedió de la misma manera. Los tres sobrenadantes fueron mezclados y centrifugados a 4000 rpm durante 20 minutos para separar sólidos en suspensión. Posteriormente se mezcló 1 mL del sobrenadante mezcla con 5 mL de tampón

a pH 1 y 1 mL del sobrenadante mezcla con 5 mL de tampón a pH 4.5. A estas preparaciones se les midió la absorbancia espectrofotométricamente según se describió anteriormente a 510 y 700 nm. La concentración de las antocianinas se expresó como mg cianidina-3-glucósido/100 g de arándanos.

Para cuantificar las antocianinas presentes en los melones impregnados con extracto de antocianina se procedió de igual forma que para las bayas de arándanos con la diferencia que en este caso se mezcló 1 mL de sobrenadante con 3 mL de tampón. La concentración de las antocianinas se expresó como mg cianidina-3-glucósido/100 g de melón.

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **III.6.4. Perfil de antocianinas**

Para obtener el perfil de antocianinas presentes en las bayas de arándanos se purificó el sobrenadante obtenido mediante la extracción con metanol acidificado. Para ello, este último extracto se colocó en un cartucho C18, limpiado previamente con 1.5 mL de agua ultra pura. Las antocianinas retenidas en el cartucho fueron eluidas con metanol conteniendo 0.01% de ácido clorhídrico. De igual forma se purificó el EA. El factor de dilución de las bayas fue 1.24 y del EA, 10.

La determinación de antocianinas presentes en las muestras se realizó en cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 con detector de matriz de diodos a 518 nm. La separación de las antocianinas se llevó a cabo usando una columna C<sub>18</sub> (150 x 4.6 mm diámetro interno, tamaño de partícula 5 µm). Las condiciones cromatográficas fueron: flujo 0.5 mL/min, volumen de inyección 50 µL, temperatura 35°C y disolventes 0.1% de ácido trifluoroacético (A) y acetonitrilo (B), grado HPLC. El gradiente consistió en: 10-15% de B por 15 min, 15-18% de B por 10 min y 18-35% de B por 15 min. Para la cuantificación se utilizaron

patrones puros de los siguientes monoglucósidos: Delfinidina-3-galactósido, Delfinidina-3-glucósido, Cianidina-3-galactósido, Cianidina-3-glucósido, Cianidina-3-arabinósido, Peonidina-3-galactósido, Peonidina-3-arabinósido y Malvinidina-3-glucósido.

#### **III.6.5. Fenoles totales**

Para determinar la concentración de fenoles totales se trabajó con el método que consiste en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (Saura-Calixto, 1998). Este reactivo es una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reduce al oxidar los compuestos fenólicos de la muestra originando óxidos azules de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). Para cuantificar los fenoles totales en los extractos ESL, EF y EA se mezclaron 50  $\mu$ L de éste con 50  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu. A continuación se añadieron 100  $\mu$ L de una solución de carbonato de sodio al 20% y 800  $\mu$ L de agua ultra pura, la mezcla se agitó durante 30 segundos a 1600 rpm y se incubó a temperatura ambiente ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 30 minutos en la oscuridad. Después se midió la absorbancia del color azul desarrollado a 760 nm en espectrofotómetro Shimadzu, UV-VISIBLE, modelo UV-1603. La medición se realizó contra un blanco que consistió en 850  $\mu$ L de agua ultra pura, 100  $\mu$ L de solución de carbonato de sodio al 20% y 50  $\mu$ L de Reactivo de Folin – Ciocalteu. Cada determinación se realizó por triplicado.

Como fenol de referencia se utilizó ácido gálico, por lo que se realizó una curva de calibrado de cinco puntos a las concentraciones de 2.5, 10, 20, 30 y 50 mg ácido gálico/100 mL. Para medir la absorbancia de la curva de calibrado, se mezcló 50  $\mu$ L de cada solución patrón con el reactivo de Folin-Ciocalteu, la solución de carbonato de sodio al 20% y el agua ultra pura en las cantidades y de acuerdo al procedimiento señalado anteriormente para los extractos. Cada punto de la curva de calibrado se realizó por triplicado.

Los resultados se expresaron como mg equivalente de ácido gálico (GAE)/100 mL de extracto.

#### **III.6.6. Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante de los extractos de antocianinas se determinó por dos métodos: Método ABTS y Método DPPH. Se utilizó ácido L-ascórbico como antioxidante de referencia y los resultados se expresaron como mg de equivalente de ácido ascórbico (EAA)/100 mL de extracto.

##### *III.6.6.1. Método ABTS*

El radical  $ABTS^{•+}$ , cuyo nombre IUPAC es 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico), fue generado mezclando una solución de ABTS de 3.5 mM con solución de persulfato de potasio de concentración 125 mM e incubando en la oscuridad durante 12 h. Una vez formado el radical  $ABTS^{•+}$  se diluyó con tampón fosfato a pH 7.4 hasta obtener un valor de absorbancia de 0.70 a 734 nm (Re et al., 1999). Esta solución diluida del radical  $ABTS^{•+}$  es estable durante 2 días. El catión radical es azul y absorbe luz a 734 nm. Durante la reacción con antioxidantes (fenoles, vitamina C u otros) pasa a su forma neutra e incolora y puede observarse espectrofotométricamente.

Para medir la capacidad antioxidante de los extractos ESL, EF y EA se mezcló 40  $\mu$ L de éstos con 960  $\mu$ L de solución diluida de radical  $ABTS^{•+}$ , se agitó durante 30 segundos a 1600 rpm e incubó a temperatura ambiente ( $25\pm 1^{\circ}C$ ) y en oscuridad durante 20 minutos. Luego se midió la absorbancia a 734 nm en espectrofotómetro Shimadzu, UV-VISIBLE, modelo UV-1603. Además, se preparó un control mezclando 40  $\mu$ L de agua ultra pura con 960  $\mu$ L

de solución diluida de radical ABTS<sup>•+</sup> y se procedió como los extractos. Cada determinación se realizó por triplicado.

La curva de calibrado se construyó con cinco puntos a las concentraciones de 3.6, 14.5, 36.2, 45.9 y 65.6 mg ácido ascórbico/100 mL. Para medir la absorbancia de la curva de calibrado se mezclaron 40 µL de cada solución patrón con 960 µL de solución diluida de radical ABTS<sup>•+</sup> y se procedió de acuerdo a lo señalado para los extractos. Cada punto de la curva de calibrado se realizó por triplicado.

#### *III.6.6.2. Método DPPH*

Inicialmente se preparó una solución madre del radical DPPH<sup>•</sup> o 2,2-difenil-1-picril hidrazilo de concentración 200 mg/L y se conservó en refrigeración a 4±1°C en envase de vidrio color caramelo y envuelto en papel de aluminio hasta el momento de ser utilizado. Para las determinaciones analíticas, se realizó una dilución 1/10 de esa solución madre. Se empleó como solvente metanol calidad HPLC. La solución madre se descartó cuando la absorbancia a 517 nm disminuyó un 20% respecto del día de la preparación (Brand-Williams et al., 1995).

El radical DPPH<sup>•</sup> en solución, es de color violeta intenso y se vuelve incoloro o amarillo pálido cuando reacciona con antioxidantes que lo neutralizan.

Para medir la capacidad antioxidante de los extractos ESL, EF y EA se mezcló 10 µL de éstos con 990 µL de solución diluida de radical DPPH<sup>•</sup>, se agitó durante 30 segundos a 1600 rpm e incubó a temperatura ambiente (25±1°C) y en oscuridad durante 30 minutos. Luego se midió la absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro Shimadzu, UV-VISIBLE, modelo UV-1603. Además se preparó un control mezclando 10 µL de agua ultra pura con 990 µL

de solución diluida de radical DPPH<sup>\*</sup> y se procedió como los extractos. Con estos datos se calculó el cambio de absorbancia (absorbancia del control menos absorbancia del extracto) a los 30 minutos de iniciada la reacción entre el radical y los antioxidantes presentes en el extracto. Cada determinación se realizó por triplicado.

La curva de calibrado se construyó con cuatro puntos a las concentraciones de 7.1, 17.7, 26.6 y 35.4 mg ácido ascórbico/100 mL. Para medir la absorbancia de la curva de calibrado se mezcló 10 µL de cada solución patrón con 990 µL de solución diluida de radical DPPH<sup>\*</sup> y se procedió de acuerdo a lo señalado para los extractos. Cada punto de la curva de calibrado se realizó por triplicado.

### III.6.7. Rendimiento de extracción de antocianinas totales

El rendimiento de extracción de antocianinas totales se calculó como el porcentaje de extracción de antocianinas totales extraídas de una determinada cantidad de arándano, mediante la siguiente expresión:

$$\text{RAT (\%)} = \frac{M_{\text{EDA}} \text{ AT}_{\text{EDA}}}{M_{\text{a}} \text{ AT}_{\text{a}}} 100 \quad (\text{III.21})$$

Dónde:

RAT: Rendimiento de extracción de antocianinas totales (%)

M<sub>EDA</sub>: Masa del extracto (g)

$AT_{EDA}$ : Concentración de antocianinas totales en el EDA (mg cianidina-3-glucósido/100g EDA)

$M_a$ : Masa de arándanos (g)

$AT_a$ : Concentración de antocianinas totales en los arándanos (mg cianidina-3-glucósido/100g de arándano)

### III.6.8. Degradación de antocianinas

El porcentaje de degradación de antocianinas se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Degradación (\%)} = \frac{C_0 - C}{C_0} \cdot 100 \quad (\text{III.22})$$

Dónde:

$C$ : Concentración de antocianinas al tiempo  $t$  (mg cianidina-3-glucósido/100mL de extracto)

$C_0$ : Concentración inicial de antocianinas (mg cianidina-3-glucósido/100mL de extracto).

### III.6.9. Composición mineral

En las bayas de arándanos y en el extracto EA se cuantificaron los siguientes minerales: calcio, hierro, magnesio, potasio, sodio y zinc.

La cuantificación se realizó por espectroscopia de absorción atómica (Shimadzu Corporation, 1999; Standard Methods, 1999), utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Shimadzu modelo 6800 (Japón) con horno de grafito y automuestreador.

Dado que las muestras pueden contener partículas o material orgánico que interfieren en el análisis espectroscópico, tanto en las bayas como en el extracto EA, se realizó un pretratamiento que consistió en la degradación de la materia orgánica que pudiera estar presente.

Para ello se pesaron 0.5 g de muestra en una balanza analítica marca Sartorius modelo BP221S (Alemania) de 220 g de capacidad y  $d=0.1$  mg, se agregaron 10 mL de ácido nítrico 70% y se llevó a cabo una digestión en equipo Sistema de reacción acelerado por microondas MARS 5 de CEM (Japón). Para el método de digestión se utilizó una rampa en 2 etapas, la primera de 300 W de potencia, 100°C y 10 min y una segunda etapa de 300 W, 150°C y 20 min. Después de este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se llevó a volumen de 25 mL con agua ultrapura y se filtró con filtro de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ .

El filtrado se inyectó en el espectrofotómetro para la cuantificación de los minerales. Para ello, fue necesario la construcción de curvas de calibrado con soluciones estándares de calcio, hierro, magnesio, potasio, sodio y zinc. Cada curva constó de 4 puntos. En la Tabla III.4 se señalan las condiciones de análisis y el rango de concentración en el que fueron realizadas las curvas de calibrado para la cuantificación de los minerales en las bayas y en el EA.

**Tabla III.4.** Condiciones de análisis y rango de la curva de calibrado para la cuantificación de minerales.

Mineral	Rango de la curva de calibrado		Longitud de onda (nm)
	Llama (aire-acetileno)	Horno de grafito	
Calcio (ppm)	0 -10	-	422.7
Hierro (ppb)	-	0 - 5	248.3
Magnesio (ppm)	0 - 1	-	285.2
Potasio (ppm)	0 - 3	-	766.5
Sodio (ppm)	0 – 1.6	-	589.0
Zinc (ppb)	-	0 - 3	213.9

A efectos de trabajar en el rango de concentración de las curvas de calibrado, algunas muestras debieron diluirse con agua ultra pura.

Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en mg/100g.

#### III.6.10. Volumen de melón

Se utilizó la metodología de volumen desplazado por una masa de melón en una probeta de 500 mL graduada en 1 mL (Martelo Castaño et al., 2010). En la misma se colocaron semillas de lino hasta alcanzar el volumen mencionado. Luego se retiró parte de las semillas, se agregó 100 g de melón y se llevó a volumen con semillas de lino. Se consideró como volumen del melón al volumen de semillas desplazado tomando como referencia el volumen inicial de estas.

### **III.6.11. Densidad del melón y del líquido de impregnación**

La densidad aparente del melón se calculó mediante el cociente entre la masa y el volumen, mientras que la del líquido de impregnación ( $\rho_{LI}$ ) se determinó con un picnómetro (Martelo Castaño et al., 2010). Las determinaciones se realizaron por triplicado a 25°C .

## **III.7. Análisis estadístico**

### **III.7.1. Obtención de las mejores condiciones de extracción de antocianinas**

Como se comentó en la introducción, la metodología de superficie de respuesta (MSR) es una estrategia experimental y de análisis, utilizada por numerosos investigadores, para estimar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, los valores de las variables de operación más adecuadas en función de variable o variables dependientes consideradas. Éstas pueden ser características de calidad de un producto (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar, 2008).

La obtención de la mejor combinación de niveles de los factores que dieron por resultado el nivel más elevado de RAT, tanto en la ESLA como en la EAF, se realizó siguiendo la metodología de superficie de respuesta aplicado a diseño central compuesto rotatable con software STATGRAPHICS Centurión XV. Se buscó el punto óptimo mediante el análisis de cordillera, que consistió en calcular el máximo de la superficie de respuesta (Cacace y Mazza, 2003; Fan et al., 2008a; Gutiérrez Pulido y Vara Salazar, 2008).

El diseño experimental fue analizado en la región experimental correspondiente y son las que se ilustraron en la Figura III.6.

Los datos experimentales se ajustaron a una ecuación polinómica que describió las relaciones entre el RAT y los factores estudiados mediante el método de regresión múltiple. Para tener una idea más clara de los datos experimentales se obtuvieron gráficos de superficie de respuesta y de contorno. Esto se realizó con software STATGRAPHICS Centurión XV.

### **III.7.2. Análisis de comparación de medias**

Mediante diferentes análisis de varianza (ANOVA) se compararon las medias de los parámetros de calidad: antocianinas totales, fenoles totales, capacidad antioxidante y pH de los ESL y EF, como así también antocianinas totales en melones impregnados con EA, que se tomaron como variables dependientes, obtenidas a las diferentes condiciones de experimentación, que fueron considerados los factores del análisis. Se consideró que hubo diferencias estadísticas significativas para un factor determinado cuando el p-valor de la tabla de ANOVA fue menor que 0.05.

### **III.7.3. Análisis de regresión**

El análisis de regresión tiene como objetivo modelar de manera matemática el comportamiento de una variable de respuesta en función de una o más variables independientes (factores) (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar, 2008). La ecuación del modelo de regresión lineal simple es:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon_a \quad \text{(III.23)}$$

Dónde:

Y: Variable dependiente, concentración de antocianinas (C) para el estudio de modelo de orden cero y logaritmo neperiano de la concentración de antocianinas ( $\ln C$ ) para el estudio de modelo de orden uno

x: Variable independiente (tiempo de calentamiento o almacenamiento)

$\beta_0$ : Punto en el cual la línea recta intercepta el eje (ordenada en el origen), y

$\beta_1$ : Pendiente de la línea

$\varepsilon_a$ : Error aleatorio

Este análisis estadístico se utilizó para determinar el orden de la cinética de degradación de las antocianinas (orden cero o uno) versus el tiempo de calentamiento o de almacenamiento que mejor se ajustó a los datos experimentales.

Para ver con qué bondad el modelo explicó la relación entre x (tiempo) e Y (C o  $\ln C$ ) se evaluaron una serie de hipótesis y criterios de calidad de ajuste, según se describe a continuación (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar, 2008).

Prueba para determinar la significancia de la regresión. Para analizar la significancia del modelo se plantearon las siguientes hipótesis: nula ( $H_0$ ) y alternativa ( $H_A$ ):

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_A: \beta_1 \neq 0$$

Mediante un análisis de varianza para el modelo de regresión simple, obtenido con software STATGRAPHICS Centurión XV, se obtuvo el p-valor de regresión. Cuando éste fue menor que 0.05 se consideró que el modelo de regresión fue significativo.

Coeficiente de correlación,  $r$ . Este coeficiente mide la intensidad de la relación lineal entre las variables  $x$  (tiempo) e  $Y$  ( $C$  para el modelo de orden cero y  $\ln C$  para el modelo de orden uno). Varía entre -1 y 1, si  $r$  fue próximo a -1 indica que existió una fuerte relación lineal negativa entre las variables, señalando una disminución de la concentración de antocianinas al aumentar el tiempo de calentamiento o almacenamiento; si fue próximo a 0, no hubo correlación lineal; y si fue próximo a 1, hubo una fuerte relación lineal positiva entre las variables, por lo que un aumento del tiempo provocaría un aumento de la concentración de antocianinas.

Media del error absoluto (MEA). Se denomina residuos a la diferencia entre el valor observado de  $Y$  ( $C$  o  $\ln C$ ) para un determinado valor de  $x$  (tiempo) y el valor de  $Y$  estimado o predicho. La MEA es el valor medio del valor absoluto de los residuos, y sirve para ver cuánto falla en promedio el modelo al hacer la estimación de la variable respuesta ( $C$  o  $\ln C$ ). Cuanto más pequeños fueron los residuos, y en consecuencia la MEA, mejor fue la calidad del ajuste del modelo de regresión simple.

Prueba de Durbin-Watson (DW). Esta prueba permite diagnosticar la presencia de correlación (autocorrelación) entre los residuos consecutivos (ordenados en el tiempo), que es una posible manifestación de la falta de independencia. Cuando el p-valor DW, obtenido en el análisis de regresión

simple con software STATGRAPHICS Centurión XV, fue mayor a 0.05, entonces se corroboró la independencia entre los residuos, que es otro de los criterios de calidad de ajuste del modelo evaluado.

Los buenos modelos son aquellos que cumplen más criterios de calidad del ajuste. Siempre existirán circunstancias en las que, al no cumplirse alguno de los criterios, desde el punto de vista práctico no necesariamente harán inviable el modelo. Otro aspecto a tomar en cuenta es que bajo calidad similar en el ajuste de dos modelos, siempre se deberá preferir el más sencillo (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar, 2008). El modelo cinético seleccionado fue el que mejor cumplió los criterios mencionados.

---

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

#### **IV.1. Primera serie de experiencias de extracción sólido-líquido de antocianinas**

El método utilizado en un proceso de extracción de antocianinas debe maximizar la extracción de estos pigmentos con una mínima degradación o alteración del estado natural de los mismos. Como se describió en la introducción, existen numerosos procesos de extracción sólido-líquido y son también múltiples los factores que afectan la estabilidad de las antocianinas (Apartados I.2.2 y I.3). Esto hace que haya muchos trabajos de investigación sobre la influencia de los distintos factores involucrados en la extracción de estos compuestos, tales como pH, temperatura, tipo de disolvente utilizado, presencia de oxígeno y tiempo de extracción, entre otros (Apartado I.3). Todos estos trabajos ponen de manifiesto la importancia de analizar la influencia de dichos factores en cada caso concreto.

En este trabajo, se realizó una primera serie de experiencias de extracción sólido-líquido, ESLA, a partir de frutos de arándanos y se estudió la influencia de las variables temperatura de extracción (3, 20, 45, 70 y 87°C), pH (1.8, 2.5, 3.5, 4.5 y 5.2) y tiempo de extracción (1.0, 2.0, 3.5, 5.0 y 6.0 h). El solvente utilizado fue una solución de etanol-agua (50:50 %v/v) y la relación materia prima / solvente de extracción fue de 1:3 kg/kg. Las experiencias se realizaron de acuerdo al correspondiente diseño experimental (Tabla III.1) y como respuesta para evaluar la eficacia de los tratamientos, se consideró el RAT.

En la Tabla IV.1 se muestran los resultados obtenidos, cuyos datos se han ordenado para facilitar su lectura. Un primer análisis indicaría que tanto la temperatura, como el pH y tiempo de extracción influyeron en el RAT. La eficacia de la extracción aumentó con el incremento de la temperatura hasta aproximadamente los 45°C y luego disminuyó, mientras que para una misma temperatura, el rendimiento de la extracción fue mayor a pH más bajos y menores tiempos de extracción.

**Tabla IV.1.** Rendimiento de extracción de antocianinas totales (RAT) en la primera serie de experiencias de ESLA.

Temperatura (°C)	pH	Tiempo (h)	Rendimiento de extracción de antocianinas totales (RAT, %)
3	3.5	3.5	6.2
3	3.5	3.5	11.3
20	2.5	2.0	29.5
20	2.5	2.0	26.8
20	2.5	5.0	18.7
20	2.5	5.0	21.5
20	4.5	2.0	14.5
20	4.5	2.0	15.8
20	4.5	5.0	12.6
20	4.5	5.0	10.6
45	1.8	3.5	30.0
45	1.8	3.5	25.6
45	3.5	1.0	55.4
45	3.5	1.0	45.4
45	3.5	3.5	23.4
45	3.5	3.5	23.7
45	3.5	3.5	18.2
45	3.5	3.5	24.4
45	3.5	3.5	17.3
45	3.5	3.5	27.3
45	3.5	6.0	35.2
45	3.5	6.0	30.3
45	5.2	3.5	9.8
45	5.2	3.5	8.8
70	2.5	2.0	20.7
70	2.5	2.0	21.2
70	2.5	5.0	20.0
70	2.5	5.0	19.4
70	4.5	2.0	19.7
70	4.5	2.0	16.7
70	4.5	5.0	21.2
70	4.5	5.0	24.6
87	3.5	3.5	12.5
87	3.5	3.5	12.6

Para un mejor análisis de los resultados se trabajó con la función Optimización de Múltiples Respuestas del software STATGRAPHICS Centurión XV, con la que se determinaron los niveles de los factores experimentales estudiados que maximizaron el RAT. Con esta herramienta se buscó el punto óptimo mediante el análisis de cordillera, que consistió en calcular el máximo de la superficie de respuesta (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar, 2008) (Apartado III.7.1). A este punto le correspondió un RAT de 51% y la combinación de factores que se identificó como más adecuada fue una temperatura de 36.6°C, un pH de 2.12 y un tiempo de extracción de 1.0 h.

La ecuación de la superficie de respuesta obtenida para el RAT fue la siguiente:

$$\text{RAT} = 62.35 + 0.27 T + 6.83 \text{ pH} - 28.80 t - 0.01 T^2 + 0.10 T \text{ pH} + 0.03 T t - 2.90 \text{ pH}^2 + 1.61 \text{ pH } t + 2.82 t^2$$

(IV.1)

Dónde:

T: Temperatura (°C)

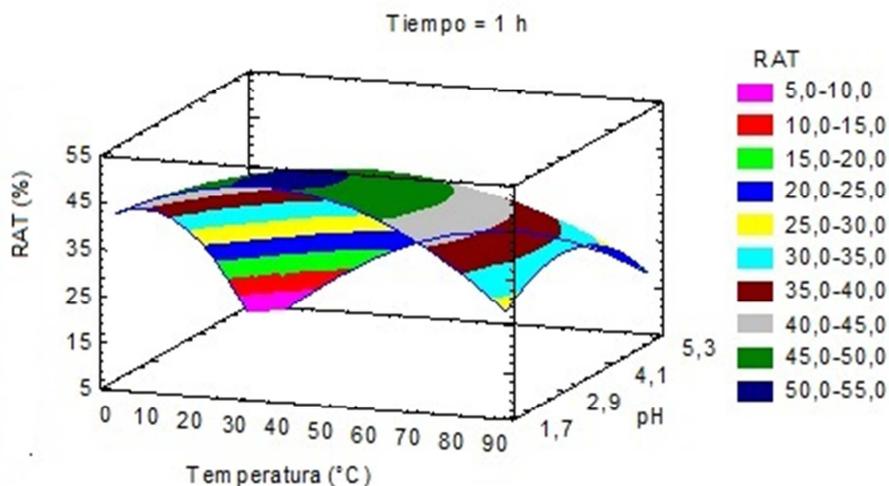
t: Tiempo de extracción (h)

pH: Potencial de hidrógeno

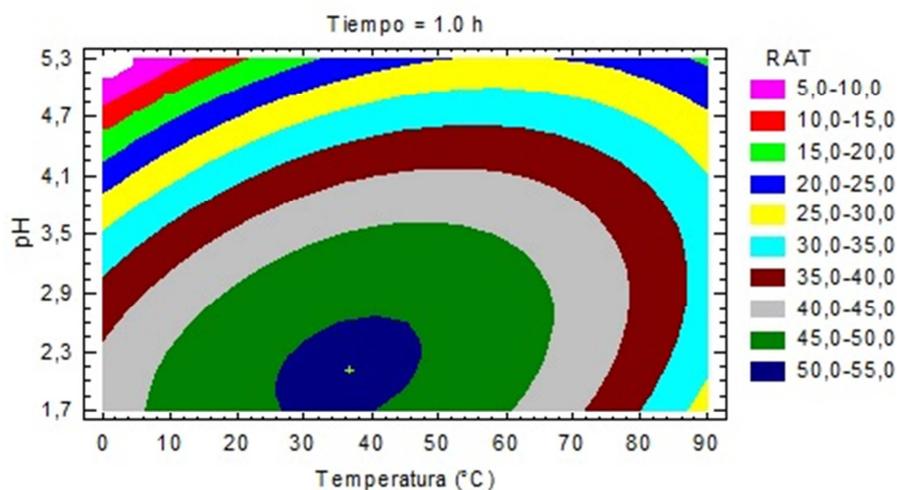
El estadístico  $R^2$  (coeficiente de determinación) ajustado, que determina la calidad del modelo ajustado, indicó que el modelo así ajustado explicó el 97% de la variabilidad del RAT.

A partir de dicha ecuación se estudió la influencia de las variables de proceso estudiadas en el RAT. Para ello, se elaboraron los gráficos de

superficie de respuesta. Dado que en esta primera serie de experiencias de ESLA se trabajó con 3 factores (temperatura, pH y tiempo de extracción) y una variable de respuesta (RAT), los diferentes gráficos se obtuvieron manteniendo uno de los factores constantes en el nivel correspondiente al máximo RAT identificado en la optimización, y variando los otros dos. Así, las Figuras IV.1 y IV.2 muestran las estimaciones para el RAT en función de la temperatura y el pH para un tiempo de extracción constante de 1h. Si bien ambas figuras proporcionan la misma información, en la primera se puede visualizar mejor la influencia de los factores en la variable respuesta, y en la segunda, el punto correspondiente a la combinación de los factores que posibilitaron obtener el mejor RAT. Cada línea de contorno representa combinaciones de estos factores que se corresponden con un determinado valor de RAT. Se puede ver que las mejores condiciones de extracción estuvieron comprendidas en el rango de temperatura de 26 a 50°C y un rango de pH entre 1.8 y 2.6.



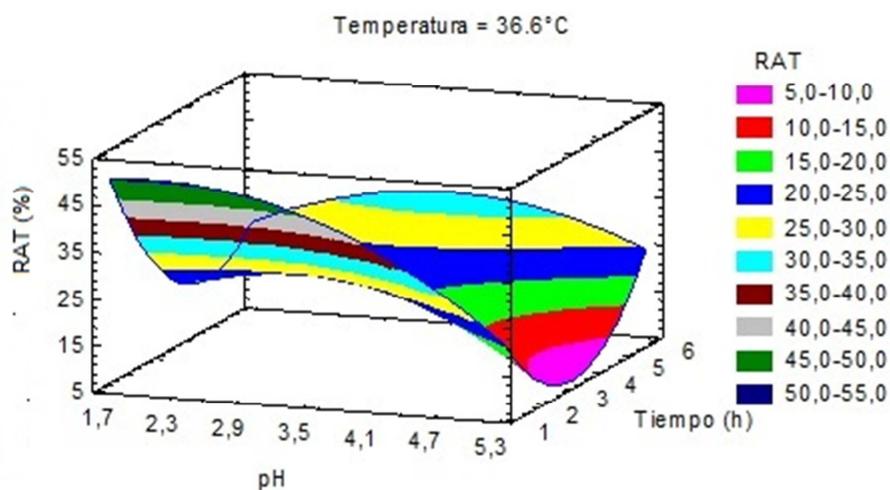
**Figura IV.1.** Superficie de respuesta para el RAT en función de la temperatura y el pH (tiempo de extracción=1.0 h) en la primera serie de experiencias de ESLA.



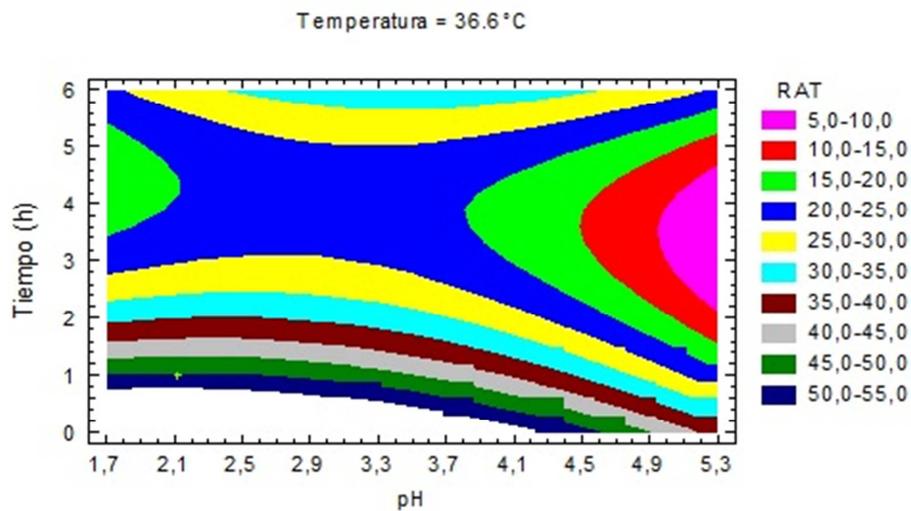
**Figura IV.2.** Contornos de la superficie del RAT estimado en función de la temperatura y el pH (tiempo de extracción=1.0 h) en la primera serie de experiencias de ESLA.

En ambas figuras se observa que a temperatura constante, un aumento en el pH provocó una disminución en el RAT; mientras que a pH constante, el incremento de la temperatura hizo que el RAT aumentase hasta alcanzar un máximo para luego disminuir.

Las Figuras IV.3 y IV.4 muestran las estimaciones del RAT en función del pH y el tiempo de extracción para una temperatura constante de 36.6°C. Así, se puede observar que para un pH constante de 2.12, el RAT fue mayor al menor tiempo de extracción. Esto puede deberse a que, para el mínimo tiempo de extracción considerado, 1 h, se alcanzó el equilibrio entre la fase sólida y la fase líquida (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005). Otra posibilidad es que a partir de ese mínimo tiempo el ritmo de extracción de las antocianinas se vio contrarrestado con una mayor degradación de las mismas, probablemente por el ataque nucleofílico del agua al catión flavilio, formando compuestos incoloros (Kopjar et al., 2011).



**Figura IV.3.** Superficie de respuesta para el RAT en función del pH y el tiempo de extracción (temperatura=36.6°C) en la primera serie de experiencias de ESLA.

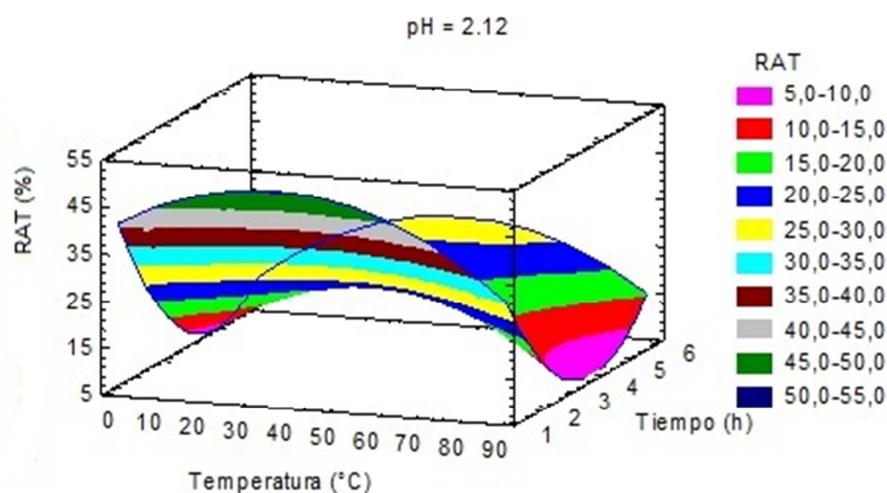


**Figura IV.4.** Contornos de la superficie del RAT estimado en función del pH y el tiempo de extracción (temperatura=36.6°C) en la primera serie de experiencias de ESLA.

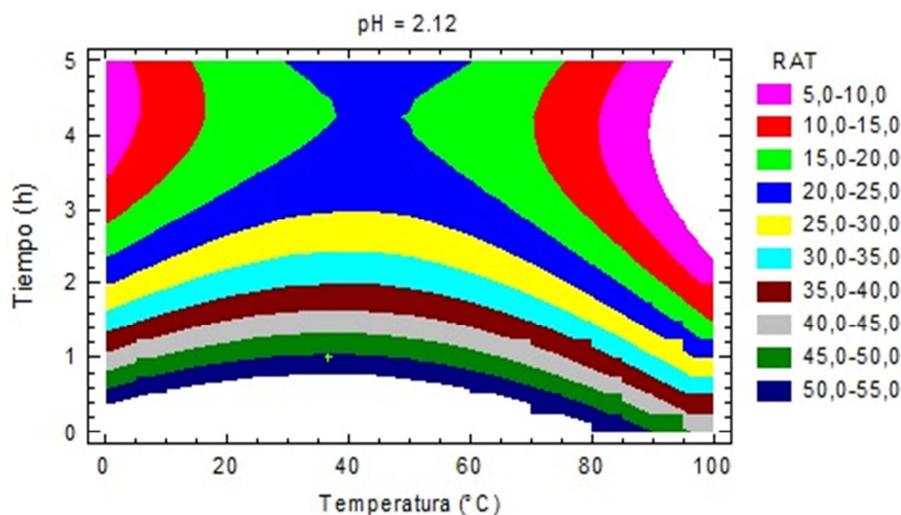
Por otra parte, para un determinado tiempo de extracción, el RAT se mantuvo prácticamente constante hasta valores de pH de 3.5 y luego disminuyó al aumentar este factor. Probablemente la disminución del RAT con el incremento del pH, se deba a que en estas condiciones se produjo una degradación del catión flavilio, ya que éste es deficiente en electrones, y por lo tanto, muy reactivo, dando lugar a formación de hemiacetal y chalcona, ambas inestables (You et al., 2011; Garzón, 2008).

Las Figuras IV.5 y IV.6 muestran las estimaciones para el RAT en función de la temperatura y tiempo de extracción para un pH constante de 2.12. En éstas se ve nuevamente que el mejor rendimiento de extracción de antocianinas se logró cuanto menor fue el tiempo de extracción (1.0 h). También se advierte, que para este tiempo, el RAT fue mayor a medida que aumentó la temperatura hasta valores de aproximadamente 50°C. Por encima de esta temperatura, se observó una disminución del RAT. Este comportamiento puede deberse a que hasta 50°C, la elevación de la temperatura estaría favoreciendo la extracción al aumentar la solubilidad de los antocianos y el coeficiente de difusión (Cacace y Mazza, 2003). Sin embargo, por encima de esa temperatura, las antocianinas extraídas se degradaron, probablemente debido a que el efecto del calor produjo pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo, con la consecuente producción de chalconas incoloras (Fennema, 2000).

Si se hace el mismo análisis a temperatura constante, se puede observar que el RAT disminuyó con el incremento del tiempo de extracción. Como se señaló anteriormente, esto podría deberse a que, para el tiempo mínimo de extracción considerado en esta serie de ensayos, se alcanzó el equilibrio entre las fases sólida y líquida; o bien que, a tiempos de extracción mayores la velocidad a la que fueron extraídas las antocianinas fue similar a la velocidad de degradación de las mismas.



**Figura IV.5.** Superficie de respuesta para el RAT en función de la temperatura y el tiempo de extracción (pH=2.12) en la primera serie de experiencias de ESLA.



**Figura IV.6.** Contornos de la superficie del RAT estimado en función de la temperatura y el tiempo de extracción (pH=2.12) en la primera serie de experiencias de ESLA.

En la extracción de antocianinas de grosellas negras, utilizando como solvente de extracción etanol al 85%, Cacace y Mazza (2003) obtuvieron, un efecto de la temperatura de segundo grado. Las mejores recuperaciones tuvieron lugar cuando la temperatura estuvo comprendida entre los 30 y 35°C, valores muy similares a los obtenidos en el presente estudio. Por su parte, en la optimización de las condiciones de extracción de antocianinas de batata morada, Fan et al. (2008a) lograron la mejor extracción a 80°C; mientras que Gorriti Gutierrez et al. (2009a y 2009b) al estudiar la extracción de antocianinas a partir de maíz morado obtuvieron que la mejor temperatura de extracción fue 75°C. Estos valores fueron muy superiores al obtenido en la presente investigación, probablemente debido a que las características estructurales de la batata morada y del maíz morado requirieron mayor temperatura para lograr una mejor difusión de las antocianinas hacia el solvente utilizado en la extracción.

Se mencionó anteriormente que a pH por encima de 3.5 disminuyó el RAT. Esto se corresponde con lo señalado por la bibliografía, donde se menciona que la acidez tiene un efecto protector sobre la molécula de antocianina (Garzón, 2008) al otorgarle mayor estabilidad (Fennema, 2000). La sensibilidad de las antocianinas a los cambios de pH se debe a que el núcleo de flavilio es deficiente en electrones y por lo tanto muy reactivo (Badui Dergal, 2006). Gorriti Gutiérrez et al (2009b) obtuvieron la mejor extracción de antocianinas de maíz morado a pH comprendido entre 2 y 4, resultado similar al obtenido en el presente trabajo.

Referido al tiempo de extracción, Fan et al. (2008a) obtuvieron que la extracción de antocianinas de batata morada fue mejor cuando el tiempo de extracción fue 60 minutos; por su parte Gorriti Gutierrez et al. (2009a y 2009b) consiguieron mayores rendimientos de extracción de antocianinas de maíz morado a tiempos de extracción de 120 y 240 minutos.

## **IV.2. Segunda serie de experiencias de extracción sólido-líquido de antocianinas**

Posteriormente, se realizó una segunda serie de experiencias de ESLA, en este caso utilizando etanol acidificado con ácido cítrico al 1% como solvente de extracción. Como se comentó en la metodología, la decisión de cambiar el solvente utilizado en la primera serie de experiencias de extracción (solución de etanol-agua, 50:50 %v/v), se debió a que su alto contenido de agua unido al que naturalmente tienen los arándanos (85-90 kg de agua/100 kg fruto), produjo un efecto de dilución en el extracto obtenido. Además, el uso de etanol como único disolvente en esta segunda serie de extracciones sólido-líquido permitió conseguir una mejor concentración del EDA y disminuir la degradación de las antocianinas en el extracto, probablemente debido a la menor formación de carbinol y chalcona, compuestos incoloros y bastante inestables (Hutchings, 1999).

En cuanto a la temperatura de extracción, se fijó un valor constante de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por ser la temperatura que permitió obtener el mejor RAT en la primera serie de experiencias de ESLA.

El pH de trabajo fue de 3.5. Se puede ver que en el caso de este parámetro no se utilizó el pH correspondiente al mejor RAT dado que en las superficies de respuesta (Figura IV.4) se vio que el RAT se mantuvo prácticamente constante hasta un pH de 3.5. De hecho, no se observó una diferencia significativa en el RAT cuando la extracción se realizó a pH 3.5 o a pH 2.12. Además, la diferencia de trabajar a pH de 3.5, en lugar de 2.12, implica un consumo de aproximadamente 70 g de ácido cítrico menos por cada 100 g de materia prima. Esto, a nivel industrial podría suponer una disminución del costo de producción.

Por otro lado, a la etapa de extracción y de determinación de las mejores condiciones de extracción le sigue la concentración del EDA. El pasar de un extracto diluido a uno concentrado hizo que el pH disminuyera

aproximadamente en una unidad. Como uno de los propósitos de la investigación fue la obtención de un extracto de antocianinas concentrado para evaluar su potencial utilización en la industria alimentaria, se consideró que tecnológicamente sería de mayor utilidad tener un producto a mayor pH, puesto que incorporar a ciertos alimentos un extracto concentrado con pH aproximadamente de 1 (obtenido al concentrar el extracto conseguido a 2.12) podría afectar el pH de los mismos y en consecuencia a sus características sensoriales.

En esta segunda serie de ensayos se estudió la influencia de las variables tiempo de extracción (0.5, 2.0 y 3.5 h) y proporción de materia prima / solvente (MP/S) (1:0.4, 1:2.5 y 1:4.6 kg/kg). Las experiencias se efectuaron según el correspondiente diseño experimental (Tabla III.2). Al igual que en los estudios anteriores, la eficacia de los tratamientos se valoró tomando como respuesta el RAT. Los resultados experimentales obtenidos se muestran en la Tabla IV.2. En ésta se observa que la extracción de antocianinas fue más elevada a tiempos de extracción de 2.0 h y MP/S 1:2.5 kg/kg, mientras que el aumento o disminución de las variable estudiadas provocó una disminución del RAT.

**Tabla IV.2.** Rendimiento de extracción de antocianinas totales (RAT) en la segunda serie de experiencias de ESLA.

Tiempo (h)	Proporción materia prima / solvente	Rendimiento de extracción de antocianinas totales (RAT, %)
0.5	1:0.4	21.4
0.5	1:0.4	16.8
0.5	1:2.5	41.6
0.5	1:2.5	42.2
0.5	1:4.6	33.7
0.5	1:4.6	37.6
2.0	1:0.4	29.4
2.0	1:0.4	32.7
2.0	1:2.5	60.4
2.0	1:2.5	56.1
2.0	1:2.5	58.4
2.0	1:2.5	60.1
2.0	1:2.5	58.1
2.0	1:2.5	58.1
2.0	1:4.6	40.9
2.0	1:4.6	38.6
3.5	1:0.4	29.4
3.5	1:0.4	28.7
3.5	1:2.5	49.8
3.5	1:2.5	48.2
3.5	1:4.6	35.6
3.5	1:4.6	35.3

De igual forma que en la primera serie de experiencias de ESLA, en esta segunda serie también se obtuvieron los niveles de los factores experimentales que maximizaron el RAT, es decir, mediante el análisis de cordillera, se calculó el máximo de la superficie de respuesta. Estas condiciones se correspondieron con un tiempo de extracción de 2 h 12 min y MP/S de 1:2.8 kg/kg, lográndose el 57% de las antocianinas presentes en los arándanos, valor de recuperación superior al obtenido en la primera serie de experiencias de extracción.

En este caso, la ecuación de superficie de respuesta obtenida para el RAT fue la siguiente:

$$\text{RAT} = -0.84 + 20.84 t + 24.83 \text{ PS} - 4.08 t^2 - 0.81 t \text{ PS} - 4.10 \text{ PS}^2 \quad (\text{IV.2})$$

Dónde:

PS: proporción de solvente utilizado para 1 parte de MP

t: tiempo de extracción (h)

El coeficiente de determinación ajustado,  $R^2$ , fue de 99%, por lo que la calidad del ajuste fue satisfactoria.

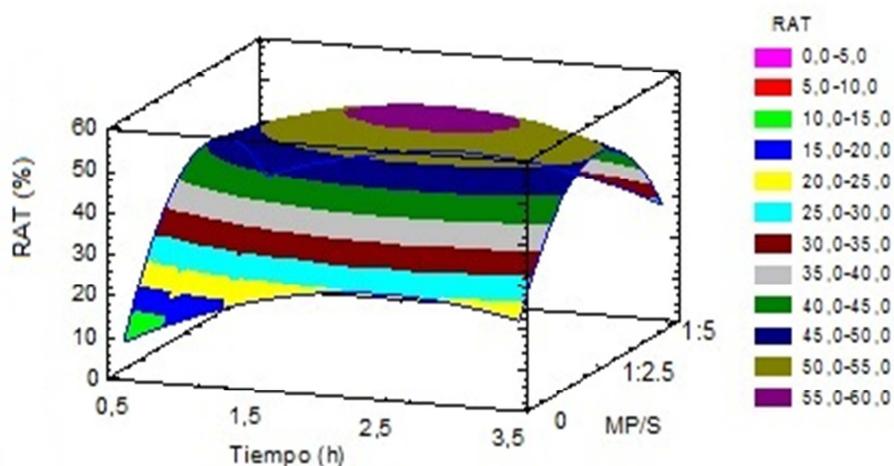
El análisis en la región experimental a través de los gráficos de superficie de respuesta permitió observar la forma en que influyeron los factores estudiados en el RAT.

Las Figuras IV.7 y IV.8 muestran las estimaciones para el RAT en función del tiempo de extracción y de la MP/S. Se puede ver que las mejores condiciones de extracción correspondieron a un tiempo de extracción comprendido entre 1.6 – 2.9 h (1 h 36 min – 2 h 54 min) y una proporción MP/S dentro del rango 1:2.2 – 1:3.4 kg/kg.

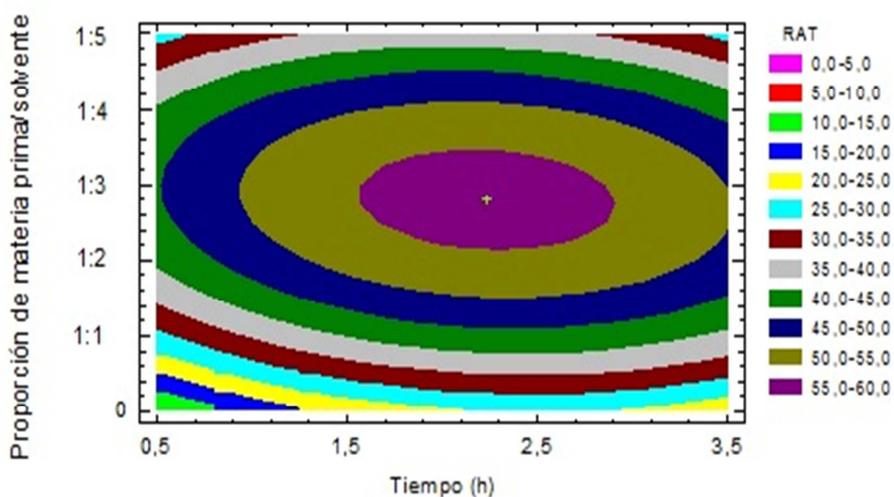
También se advirtió que para un determinado tiempo, el RAT fue mayor al aumentar la MP/S de 1:0.4 kg/kg hasta valores de 1:2.2 kg/kg, lo que fue atribuido a un mayor gradiente de concentración entre las partículas de arándano y el solvente, lo que favoreció la transferencia de masa (Sayyar et al., 2009). Sin embargo, a partir de una MP/S de 1:3.4 kg/kg, un aumento de ésta provocó una disminución en el RAT, probablemente debido a que al haber una

mayor cantidad de solvente, menor fue la concentración de antocianinas y de copigmentos en el medio de extracción, disminuyendo así las posibilidades de copigmentación, ya sea intra o intermolecular o por autoasociación. Tal como se describió en el apartado 1.2.2.4, la copigmentación constituye uno de los principales factores de estabilización de las antocianinas, al proteger a estas del ataque nucleofílico de solventes prótidos (Sari et al., 2012; Rein, 2005). Por lo tanto, con el incremento de la MP/S, más moléculas de etanol estuvieron presentes en el medio, existiendo mayor probabilidad de que el etanol, al igual que el agua, actúe como nucleófilo atacando al catión flavilio y generando estructuras de antocianinas más inestables. Además, la velocidad de una reacción es directamente proporcional a la concentración de las sustancias reaccionantes, por lo que, cuanto mayor fue la concentración de etanol, mayor fue la velocidad de la reacción en la que éste actuó como nucleófilo atacando la posición 2 del catión flavilio para formar base carbinol incolora.

De la misma forma, se observó que para una determinada MP/S el RAT aumentó a medida que aumentó el tiempo de extracción hasta valores de 1 h 36 min, mientras que para tiempos de extracción mayores a 2 h 54 min el RAT fue menor. Este comportamiento probablemente fue debido a que la extracción aumentó hasta alcanzar un equilibrio (Ibarz Ribas et al., 2000) en la concentración de antocianinas entre las partículas de arándanos y el solvente y luego disminuyó debido a que se produjo un deterioro de las mismas.



**Figura IV.7.** Superficie de respuesta para el RAT en función del tiempo de extracción y la proporción de materia prima / solvente en la segunda serie de experiencias ESLA.



**Figura IV.8.** Contornos de la superficie del RAT estimado en función del tiempo de extracción y la proporción de materia prima / solvente en la segunda serie de experiencias de ESLA.

Si se analizan los tiempos de extracción en las dos series de experiencias de ESLA, se puede ver que para la primera serie el mejor RAT se obtuvo a 1.0 h de extracción mientras que para la segunda serie el mejor

tiempo fue de 2 h 12 minutos. Cabe recordar que en la primera se utilizó como solvente extractivo una solución de etanol-agua (50:50 %v/v) en una MP/S de 1:3 kg/kg, mientras que en la segunda el solvente fue etanol acidificado con ácido cítrico al 1% y la MP/S fue una variable de proceso aunque el mejor RAT se correspondió con una MP/S de 1:2.8 kg/kg, es decir, prácticamente la misma. En estas condiciones, el mejor RAT obtenido en la primera serie de ESLA fue 51% y en la segunda serie, 57%, es decir, el mejor RAT en la primera serie de ensayos fue menor que en la segunda. Esto se podría atribuir a que, en esta última, hubo una menor degradación de las antocianinas, atribuible al cambio de solvente. El etanol acidificado con ácido cítrico al 1% posibilitó conservar en mayor medida la estructura de las antocianinas. Estos resultados muestran la importancia de prestar atención a los factores que pudieren influir en el proceso de extracción, puesto que la modificación de alguno de ellos podría afectar el rendimiento del mismo.

En definitiva, y con fines prácticos, se consideró que una metodología de trabajo adecuada podría incluir una MP/S de 1:3 y un tiempo de extracción de 2 h, dado que pertenecen al mismo contorno de la superficie de respuesta; temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  y pH 3.5.

### **IV.3. Extracción de antocianinas por fermentación**

Durante la extracción de antocianinas por fermentación (EAF) se estudió la influencia de las variables temperatura (16, 20, 30, 40 y  $44^\circ\text{C}$ ) y pH (2.4, 3.0, 4.5, 6.0 y 6.6). Las experiencias se realizaron siguiendo el correspondiente diseño experimental (Tabla III.3). Al igual que en la ESLA, se consideró como respuesta para evaluar la eficacia de los tratamientos el RAT. Los resultados experimentales obtenidos se muestran en la Tabla IV.3. El RAT aumentó con el incremento de la temperatura y el pH hasta valores de  $30^\circ\text{C}$  y pH de 4.5, luego un aumento de cualquiera de los factores estudiados provocó disminución en el RAT.

**Tabla IV.3.** Rendimiento de extracción de antocianinas totales (RAT) en la serie de experiencias de EAF.

Temperatura (°C)	pH	Rendimiento de extracción de antocianinas totales (RAT, %)
16	4.5	35.4
16	4.5	36.8
20	3.0	32.7
20	3.0	31.3
20	6.0	21.2
20	6.0	26.2
30	2.4	34.5
30	2.4	36.3
30	4.5	48.8
30	4.5	48.4
30	4.5	50.6
30	4.5	45.5
30	4.5	41.9
30	4.5	49.7
30	6.6	14.3
30	6.6	19.3
40	3.0	28.5
40	3.0	27.1
40	6.0	16.6
40	6.0	16.6
44	4.5	22.1
44	4.5	23.5

A través de la MRS se obtuvieron los niveles de los factores experimentales que maximizaron el RAT en la región de experimentación considerada. La combinación de factores que permitió obtener el mayor RAT (49%) fue: temperatura 28.1°C y pH 4.2.

La ecuación de superficie de respuesta obtenida para la RAT en la EAF se muestra en la Ecuación IV.3.

$$\text{RAT} = -124.86 + 5.62 T + 45.12 \text{ pH} - 0.1017 T^2 - 5.37 \text{ pH}^2 \quad (\text{IV.3})$$

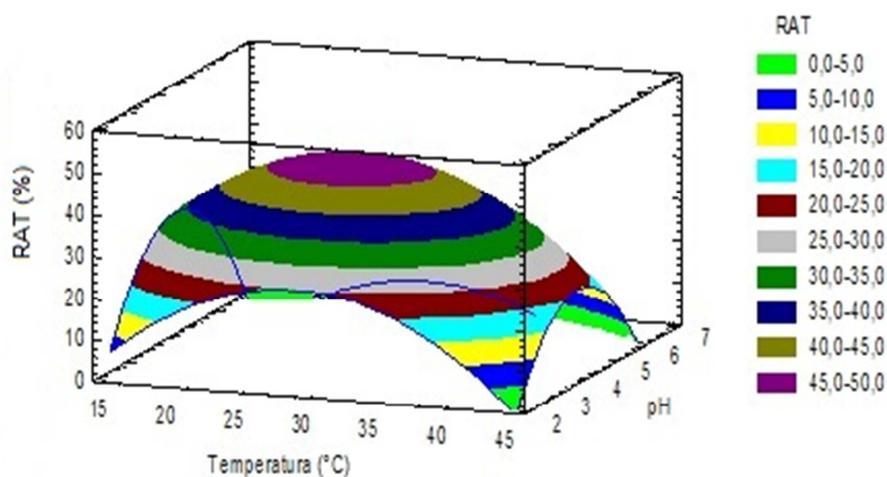
Dónde:

T: Temperatura (°C)

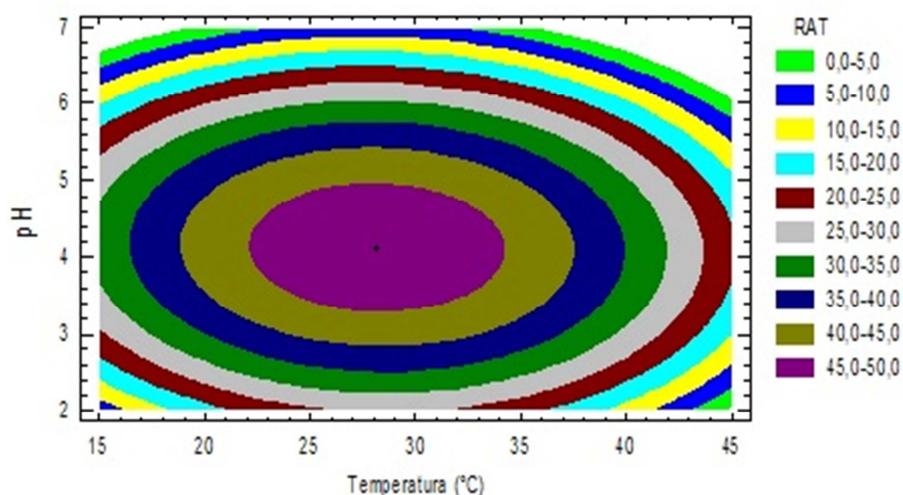
pH: Potencial de hidrógeno

El modelo presentado explica, según el valor de  $R^2$  ajustado, el 94% de la variabilidad del RAT.

La región en la que se obtuvo la mayor RAT se correspondió con el rango de temperatura de 22 – 34°C y de pH de 3.2 – 4.9 (Figuras IV.9 y IV.10).



**Figura IV.9.** Superficie de respuesta para el RAT en función de la temperatura y el pH en la serie de experiencias de EAF.



**Figura IV.10.** Contornos de la superficie del RAT estimado en función de la temperatura y el pH en la serie de experiencias de EAF.

También se puede observar que para un determinado pH, el aumento de la temperatura hasta valores de 22°C provocó un aumento en el RAT, mientras que a partir de 34°C un incremento de la temperatura produjo su disminución. De igual forma se puede ver que para una determinada temperatura, hubo un incremento en el RAT a medida que el pH aumentó hasta 3.2 y que, por encima de 4.2, la respuesta disminuyó. Como se trató en la metodología, para el caso de la EAF habría que considerar dos aspectos, por un lado los factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas, y por otro, las condiciones que favorecen el crecimiento de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Desde este punto de vista, la temperatura y el pH tienen gran influencia. El incremento de la temperatura hasta 34°C estaría favoreciendo el crecimiento de las levaduras (Pitt y Hocking, 2009) y por lo tanto la producción de etanol en el medio. Esto, a su vez, incrementa la extracción de antocianinas así como también su solubilidad y su coeficiente de difusión (Sayyar et al., 2009). Temperaturas mayores afectaron al crecimiento de las levaduras y, en consecuencia, a la producción de etanol. Además, favorecen la producción de chalconas debido a que las reacciones de deterioro de las antocianinas son

endotérmicas (Garzón, 2008; Fennema 2000). Por lo tanto, la temperatura de 34°C resulta adecuada para beneficiar el desarrollo de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y para conservar la estructura de las antocianinas durante el proceso de extracción.

En cuanto al pH, hay un efecto contrapuesto. Así, cuanto menor es el pH, más se ve favorecida la estructura del catión flavilio (forma más estable de las antocianinas). A pH 5 se ve favorecida la formación de especies pseudobase carbinol que son incoloras (Castañeda-Ovando et al., 2009a). Por el contrario, pH bajos dificultan el desarrollo de las levaduras que crecen mejor a pH de 4.0-4.5 (Pitt y Hocking, 2009).

Por lo tanto, para ambas variables, se necesita encontrar un valor de compromiso entre los factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas y las condiciones que favorecen el crecimiento de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. La combinación óptima de dichos factores obtenida en este trabajo mediante el MRS fue una temperatura de 28.1°C y un pH= 4.2.

Científicos japoneses investigaron la obtención de antocianinas a partir de la fermentación, con *Rhizopus* y levaduras, de batata morada mezclada con arroz (Kousuke et al., 1990). Sin embargo, protegieron los resultados mediante patente. No se ha encontrado bibliografía de la aplicación de esta técnica en otros productos con lo que los resultados de este trabajo no se han podido comparar con experiencias similares.

#### **IV.4. Comparación de los extractos de antocianinas obtenidos por ESLA y por EAF. Definición de las mejores condiciones de extracción**

Las condiciones que permitieron obtener el máximo RAT en los procesos de ESLA y EAF fueron temperaturas de 36.6 y 28.1°C, mientras que el pH fue, 2.12 y 4.2, respectivamente. Estas diferencias podrían estar asociadas con los factores físico-químicos que influyen en los procesos metabólicos de las

levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Suárez Lepe e Íñigo Leal, 2004), y también con los factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas en el proceso de extracción, tales como la estructura y concentración del pigmento y, por supuesto, el pH y la temperatura (Fan et al., 2008b). Cabe recordar que a pesar de que el valor de pH óptimo identificado en la primera serie de experiencias ESLA fue 2.1, se decidió trabajar en la segunda serie ESLA con un pH de 3.5.

Por otro lado, el RAT más elevado se obtuvo en la segunda serie de experiencias de ESLA, siendo del 57%, mientras que en la primera serie fue de 51%. Esto se podría atribuir al aumento de la concentración de etanol en el medio (materia prima más solvente de extracción). En el caso de la EAF, el RAT más elevado conseguido fue de 49%. En este proceso, la concentración de etanol en el medio estuvo en torno a 6% debido a la producción de alcohol por parte de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Esto indica que, a pesar de que la concentración de alcohol fue muy inferior a la primera serie de experiencias de ESLA, se obtuvieron valores de RAT prácticamente similares a los obtenidos en las otras series. Los rendimientos similares en la ESLA y la EAF confieren a esta última cierto interés industrial, pues ésta última tiene unos requerimientos inferiores de alcohol y, por lo tanto, sería más económica desde el punto de vista del costo de materia prima. Sin embargo, conviene estudiar si la mayor cantidad de agua presente en el EDA obtenido por la metodología EAF no provoca un mayor deterioro en las antocianinas que cuando se utiliza la metodología ESLA debido al ataque nucleofílico del agua al catión flavilio. Este efecto del solvente, junto con un pH superior a 4, podría estar asociado a la pérdida del protón y adición de agua en la posición 2 del catión flavilio, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol (incolora) y la forma chalcona (amarilla) (Garzón, 2008, Fennema, 2000).

Teniendo en cuenta las condiciones que permitieron maximizar la extracción de antocianinas de arándanos por las dos metodologías y la practicidad de trabajar en esas condiciones, se decidió que, en adelante, los

extractos que se utilizarían para realizar los estudios de influencia de los tratamientos térmicos (temperaturas de calentamiento) y del almacenamiento en la degradación de antocianinas se obtendrían según las condiciones correspondientes al máximo RAT en la ESLA y la EAF y son las que se señalan a continuación.

### *ESLA:*

- Solvente de extracción: etanol acidificado con ácido cítrico al 1%,
- Proporción materia prima / solvente de extracción: 1:3 kg/kg,
- Temperatura de extracción:  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,
- Tiempo de extracción: 2 h.

### *EFA:*

- Concentración de sólidos solubles en el sustrato: 12° Brix,
- Tiempo: 72 h,
- Temperatura:  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,
- pH= 4.2.

Los EDA, obtenidos bajo estas condiciones, fueron concentrados según se describió en el apartado III.2.1. Los productos de la concentración se denominaron como extracto de antocianinas obtenido por extracción sólido - líquido (ESL) y extracto de antocianinas obtenido por fermentación (EF).

Una vez concentrados, los extractos fueron caracterizados mediante la cuantificación de antocianinas totales, fenoles totales, capacidad antioxidante y pH. La concentración de antocianinas totales en los ESL y EF no resultaron significativamente diferentes ( $p\text{-valor} > 0.05$ ), mientras que la concentración de fenoles totales fue mayor en el EF ( $p\text{-valor} < 0.05$ ) (Tabla IV.4).

**Tabla IV.4.** Antocianinas totales y fenoles totales de los extractos de antocianinas.

Extracto	Antocianinas totales		Fenoles totales	
	(mg/100mL)		(mgGAE/100mL)	
ESL	137.2 ± 7.5	a	1424 ± 67	a
EF	126.2 ± 8.9	a	2955 ± 101	b

En una misma columna, letras diferentes indican que el análisis de varianza (ANOVA) señaló diferencias significativas entre las medias de los extractos para un p-valor inferior a 0.05.

La concentración de fenoles totales, en los dos extractos, fue muy superior al contenido de antocianinas, lo que estaría indicando la presencia de compuestos fenólicos distintos a los pigmentos antociánicos. Sería necesario realizar estudios complementarios para identificar esos otros compuestos fenólicos. Sin embargo, en referencia a la utilización de los extractos como aditivos alimentarios quizá conviene utilizarlos sin purificar, debido a que el conjunto de compuestos extraídos, en este caso otros fenoles, también pueden presentar propiedades antioxidantes interesantes (Fennema, 2000).

Para la evaluación de la capacidad antioxidante se utilizaron las metodologías de ABTS y DPPH. La capacidad antioxidante, medida con las dos metodologías, fue superior en el EF (p-valor < 0.05) (Tabla IV.5). Este resultado era esperable dado que la concentración de fenoles totales en éste fue superior respecto del ESL (Tabla IV.4).

**Tabla IV.5.** Actividad antioxidante de los extractos de antocianinas.

Extracto	Capacidad antioxidante (mgEAA/100mL)			
	ABTS		DPPH	
ESL	2359 ± 7	a	934 ± 3	a
EF	2666 ± 6	b	1096 ± 8	b

En una misma columna, letras diferentes indican que el análisis de varianza (ANOVA) señaló diferencias significativas entre las medias de los extractos para un p-valor inferior a 0.05.

Kuskoski et al. (2005) evaluaron la capacidad antioxidante de pulpas de frutos congelados comercializados en el sur de Brasil y obtuvieron, con el método ABTS, valores de  $125.8 \pm 3.2$  mg EAA/100 g para mora,  $161.5 \pm 3.3$  mg EAA/100 g para uva y  $1198.9 \pm 8.1$  mg EAA/100 g para acerola, y con la metodología DPPH,  $82.6 \pm 2.6$ ,  $105.9 \pm 0.4$  y  $959.1 \pm 19.0$  mg EAA/100 g, para los mismos productos respectivamente. Estos autores también midieron contenido de fenoles totales en la pulpa de los frutos que estudiaron. Los valores que encontraron alcanzan concentraciones de  $118.9 \pm 2.1$  mg GAE/100 mg para pulpa de mora,  $117.1 \pm 0.6$  mg GAE/100 mg para pulpa de uva y  $580.1 \pm 4.6$  mg GAE/100 mg para pulpa de acerola. Los resultados publicados revelan que los extractos, no solo poseen alta concentración de antocianinas totales, sino también de otros fenoles con elevada actividad antioxidante. Esto constituye una ventaja, dado que los efectos terapéuticos de las antocianinas y de los compuestos fenólicos en sus diversas formas están relacionados con su actividad antioxidante (Aguilera Ortíz et al., 2011; Viuda-Martos et al., 2008).

El proceso de concentración de los EDA produjo también una concentración de los ácidos presentes en los extractos. Esto hizo que el pH final de los ESL y EF resultaran menores que sus correspondientes EDA. Así, el pH del ESL fue de  $2.60 \pm 0.01$  y el del EF de  $3.64 \pm 0.01$ , encontrándose entre estos valores diferencias estadísticas significativas (p-valor < 0.05). Esta disminución del pH es favorable desde el punto de vista estructural de las

antocianinas, ya que la acidez tiene un efecto protector sobre la molécula (Fennema, 2000).

En definitiva, si se hace un resumen comparativo de las metodologías estudiadas para la extracción de antocianinas de arándanos, se puede señalar que ambos tipos presentan ventajas y desventajas (Tabla IV.6).

La metodología ESLA resultó más sencilla de aplicación y más fácil la concentración del EDA, la obtención del producto final requirió un menor tiempo. En cuanto a la concentración de antocianinas totales los extractos ESL y el EF no presentaron diferencias significativas. Por otro lado, el producto obtenido con la metodología EAF, presentó una concentración de fenoles totales más elevada y una mayor actividad antioxidante, lo que constituye una ventaja por sus potenciales propiedades terapéuticas. Si se considera el tiempo requerido para la obtención la extracción, en la ESLA se requirieron 2 h y en la EAF, 72 h.

**Tabla IV.6.** Resumen comparativo de las metodologías de extracción de antocianinas de arándanos estudiadas.

	ESLA	EAF
Complejidad de la metodología	Más sencilla	Menos sencilla
Concentración del EDA	Más sencilla	Menos sencilla
Tiempo requerido	2 h	72 h
Rendimiento de la extracción	57%	49%
	ESL	EF
Antocianinas totales	137.2±7.5 mg/100 mL	126.2±8.9 mg/100 mL
Fenoles totales	1424±67 mgGAE/100 mL	2955±101 mg GAE/100 mL

No puede concluirse cuál es la mejor metodología de extracción, ya que cada una de ellas presenta ventajas e inconvenientes. Por ello y dado que se pretende estudiar la potencial utilización de los extractos de antocianinas como aditivos alimentarios, se realizaron estudios de estabilidad de las antocianinas en los ESL y EF con las temperaturas de calentamiento y almacenamiento. De esta manera puede determinarse si existe influencia del método de extracción de antocianinas en la estabilidad de los extractos.

### **IV.5. Estudio de degradación térmica de antocianinas**

En el apartado I.2.2 se describió cómo influyen sobre la estabilidad de las antocianinas aspectos como el pH, la temperatura, la actividad de agua o la presencia de factores como el oxígeno, la luz, metales, azúcares o ácido ascórbico. Cabe destacar que las conversiones estructurales de las antocianinas son reacciones endotérmicas, por lo que su estabilidad y su velocidad de degradación están notablemente influenciadas por la temperatura (Jenshi Roobha et al., 2011).

Uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar la potencial aplicación de los extractos obtenidos en la industria alimentaria como colorante-antioxidante. Cabe destacar que hay procesos tecnológicos que se realizan a temperaturas elevadas. Por lo tanto, al evaluar el potencial uso de los extractos como ingrediente en alimentos formulados es necesario determinar la degradación que pudieran sufrir las antocianinas durante un proceso de calentamiento.

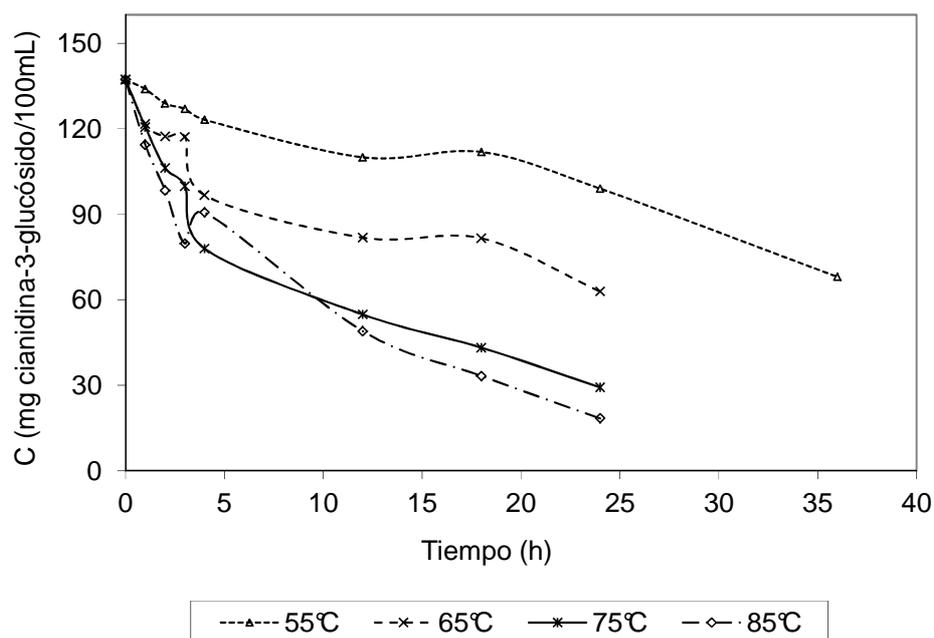
Por lo expuesto, se consideró importante estudiar la sensibilidad a la temperatura de las antocianinas extraídas. Para ello, se procedió, según se describió en el apartado III.3, sometiendo los extractos a diferentes temperaturas durante un tiempo máximo de 24 h. Los resultados mostraron que, para un tiempo de calentamiento de 24 h, el porcentaje de degradación fue mayor a medida que se elevó la temperatura de tratamiento (Tabla IV.7).

**Tabla IV.7.** Porcentaje de degradación de antocianinas después de un tiempo de calentamiento de 24 h a las temperaturas de 55, 65, 75 y 85°C.

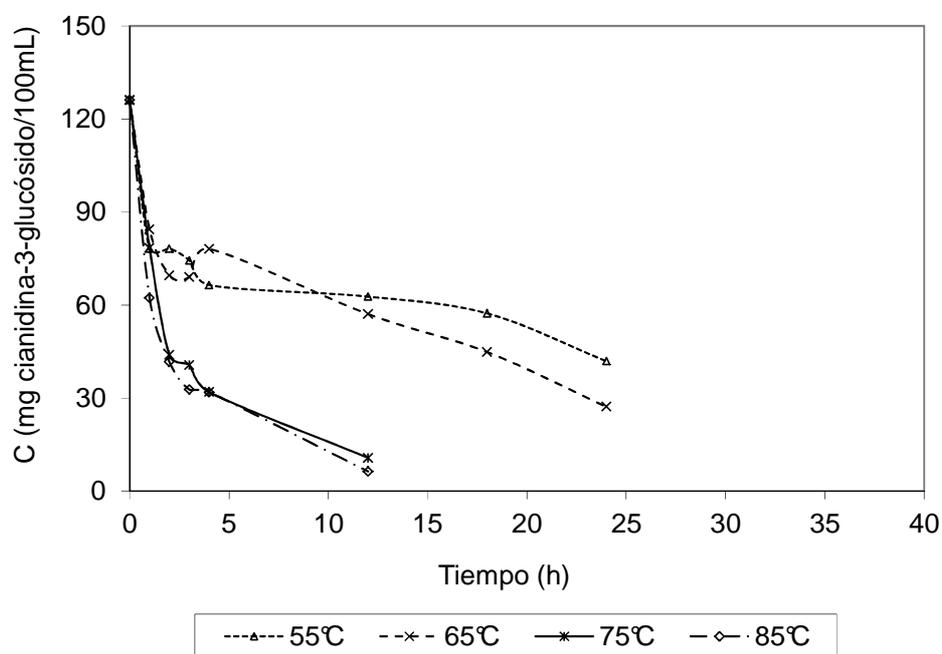
Temperatura (°C)	Degradación (%)	
	ESL	EF
55	28	67
65	54	78
75	79	92
85	87	95

Además, se observó que los EF fueron más sensibles al calentamiento que los ESL en todas las temperaturas ensayadas. Por otro lado, a excepción del ESL calentado a 55°C, en 24 h de calentamiento la degradación de antocianinas superó el 50%. Como se señaló en la metodología, los ensayos se efectuaron hasta que la retención de antocianinas fue inferior al 50%. Esto hizo que en el estudio de degradación de antocianinas presentes en el ESL y calentado a 55°C los ensayos se realizaron hasta un tiempo de 36 h.

La velocidad de degradación de las antocianinas en los extractos con el tiempo de tratamiento aumentó a medida que aumentó la temperatura de tratamiento en los dos extractos considerados (Figuras IV.11 y IV.12).



**Figura IV.11.** Degradación de antocianinas en el ESL durante el calentamiento a 55, 65, 75 y 85°C. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas.



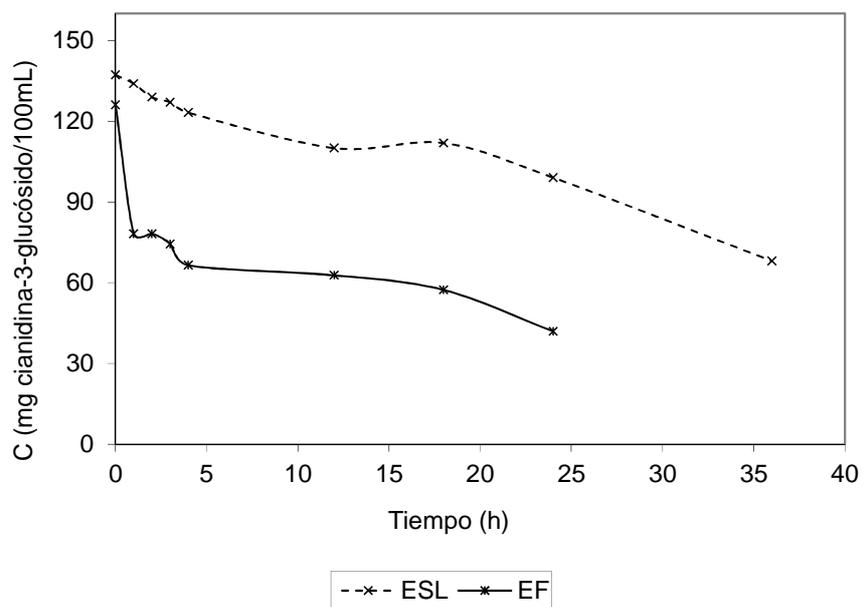
**Figura IV.12.** Degradación de antocianinas en el EF durante el calentamiento a 55, 65, 75 y 85°C. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas.

Además, las curvas muestran que la velocidad de deterioro de las antocianinas fue diferente en el transcurso del ensayo. Para el caso del ESL calentado a 55°C, la concentración de antocianinas disminuyó de una manera uniforme que se tradujo en que la pendiente fue bastante constante (Figura IV.11). Esto supone que la velocidad de degradación fue prácticamente la misma durante todo el ensayo. También se puede observar que, a esa temperatura, la velocidad de destrucción del pigmento-antioxidante fue menor que para el resto de las temperaturas ensayadas. En el caso de las experiencias realizadas a 65, 75 y 85°C se observó un importante descenso de la concentración de antocianinas presentes en los extractos en las primeras 3 - 4 h de tratamiento.

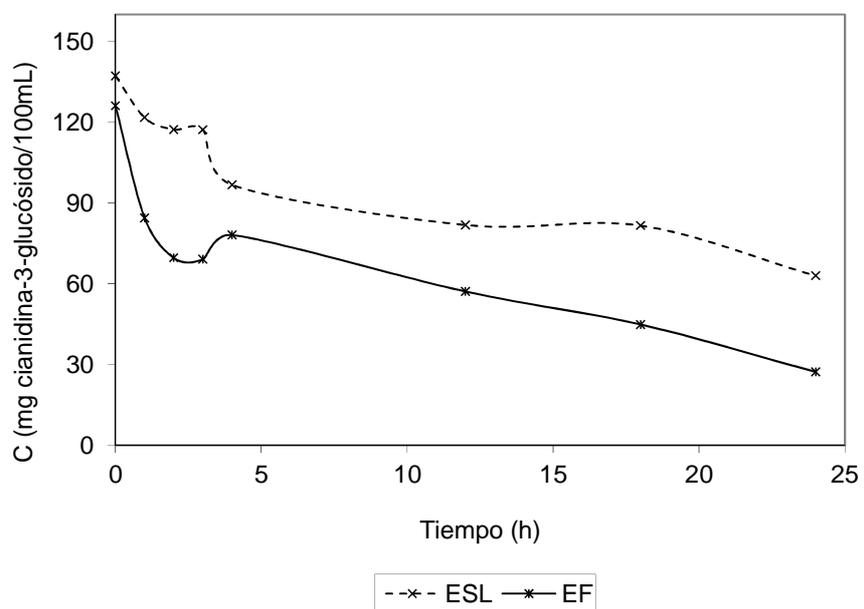
En cuanto a los EF, se observó un descenso brusco de la concentración de los pigmentos-antioxidantes en las dos primeras horas de tratamiento, especialmente a las temperaturas de 75 y 85°C (Figura IV.12).

Estos resultados concuerdan con lo afirmado por Laleh et al. (2006), quienes señalaron que la temperatura es un factor que tiene un rol desestabilizante en la estructura molecular de las antocianinas. Por su parte, Badui Dergal (2006) publicó que los tratamientos térmicos influyen marcadamente en la destrucción de las antocianinas.

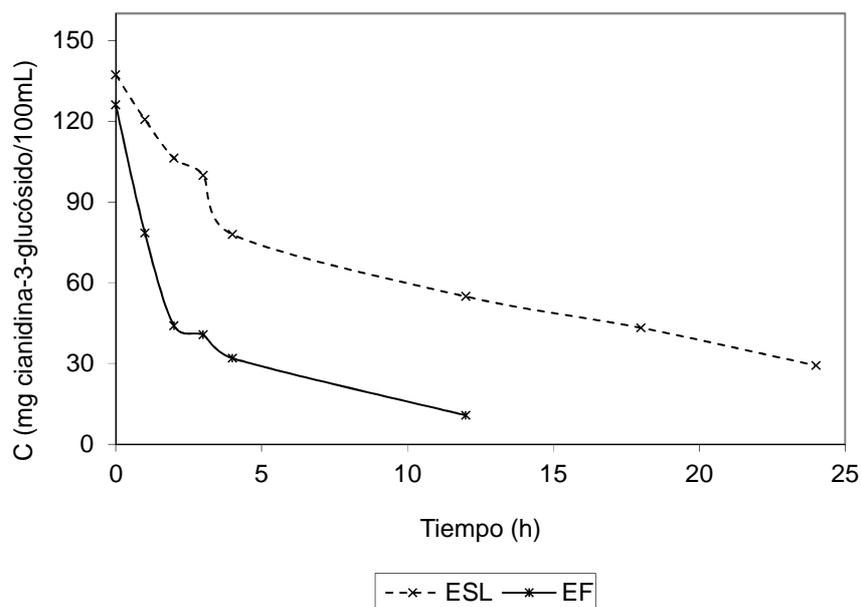
Si se compara la degradación durante el calentamiento a 55°C de las antocianinas presentes en los extractos obtenidos a través de las dos metodologías de extracción (Figura IV.13), se puede ver que durante toda la experiencia, la concentración de antocianinas fue superior en el ESL, es decir, hubo una menor degradación. Esto probablemente se debió a que el pH, más bajo en el ESL que en el EF, ejerció un efecto protector sobre la molécula (Hutchings, 1999). Un comportamiento similar se observó a las otras temperaturas ensayadas (Figuras IV.14, IV.15 y IV.16).



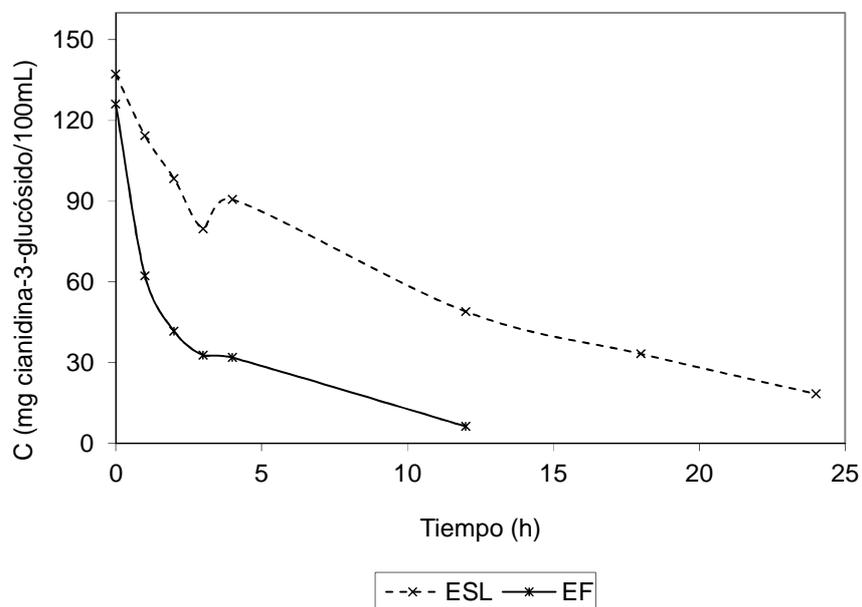
**Figura IV.13.** Comparación de la antocianina degradada durante el calentamiento a 55°C en el ESL y el EF. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas.



**Figura IV.14.** Comparación de la antocianina degradada durante el calentamiento a 65°C en el ESL y el EF. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas.



**Figura IV.15.** Comparación de la antocianina degradada durante el calentamiento a 75°C en el ESL y el EF. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas.



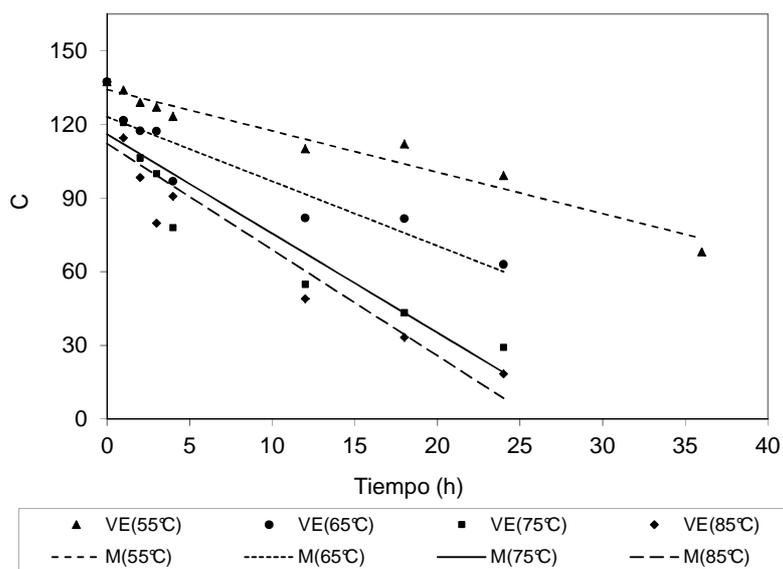
**Figura IV.16.** Comparación de la antocianina degradada durante el calentamiento a 85°C en el ESL y el EF. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas.

Con el propósito de determinar cuál de los extractos fue más estable frente al calentamiento y cuantificar el efecto de la temperatura en la estabilidad de las antocianinas, se recurrió a la modelización matemática de las cinéticas de degradación con modelos empíricos de distinto orden. A continuación se muestran los resultados obtenidos, se analiza el orden de la cinética de la reacción de degradación de las antocianinas y se estudian distintos parámetros de modelos empíricos y de termodinámica estadística (Apartado III.3).

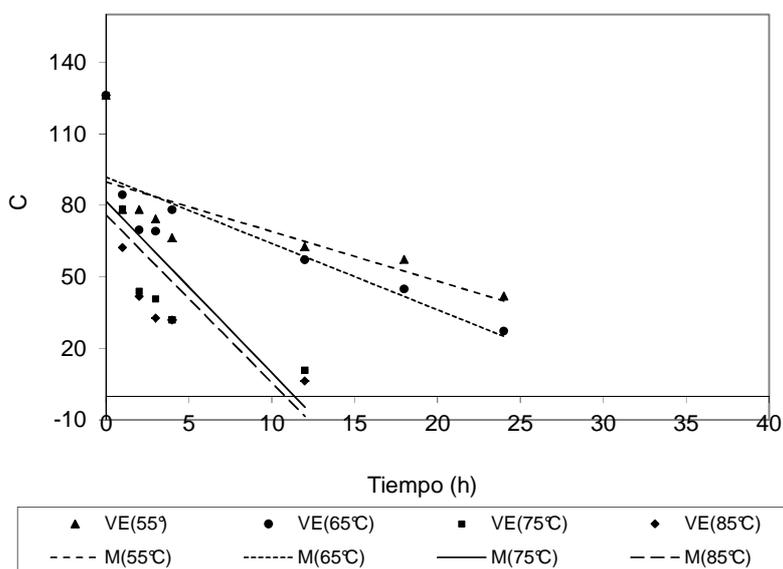
### **IV.5.1. Cinética de la reacción de degradación de antocianinas durante el calentamiento**

#### **IV.5.1.1. Modelo cinético de orden cero**

El ajuste a una cinética de orden cero, se realizó a partir de la representación de la evolución de la concentración de antocianinas  $C$  en función del tiempo de calentamiento (Figuras IV.17 y IV.18) para cada tipo de extracto, ESL y EF, y para cada temperatura de calentamiento. De un primer análisis cualitativo de las figuras citadas se puede señalar que el modelo se ajustó relativamente bien a los datos de los ESL, mientras que los ajustes no resultaron tan adecuados en los casos de los EF a todas las temperaturas ensayadas. Tal es así que, para los EF calentados a 75 y 85°C cuando el tiempo fue de 12 h el modelo dio valores negativos de concentración de antocianinas, lo que está indicando, a priori, la falta de ajuste del modelo de orden cero a los valores experimentales.



**Figura IV.17.** Degradación de antocianinas en el ESL durante el calentamiento a 55, 65, 75 y 85°C. VE se refiere a los valores experimentales, donde cada punto representa el promedio de 3 réplicas. M muestra los datos obtenidos con el modelo de cinética de orden cero.



**Figura IV.18.** Degradación de antocianinas en el EF durante el calentamiento a 55, 65, 75 y 85°C. VE se refiere a los valores experimentales, donde cada punto representa el promedio de 3 réplicas. M muestra los datos obtenidos con el modelo de cinética de orden cero.

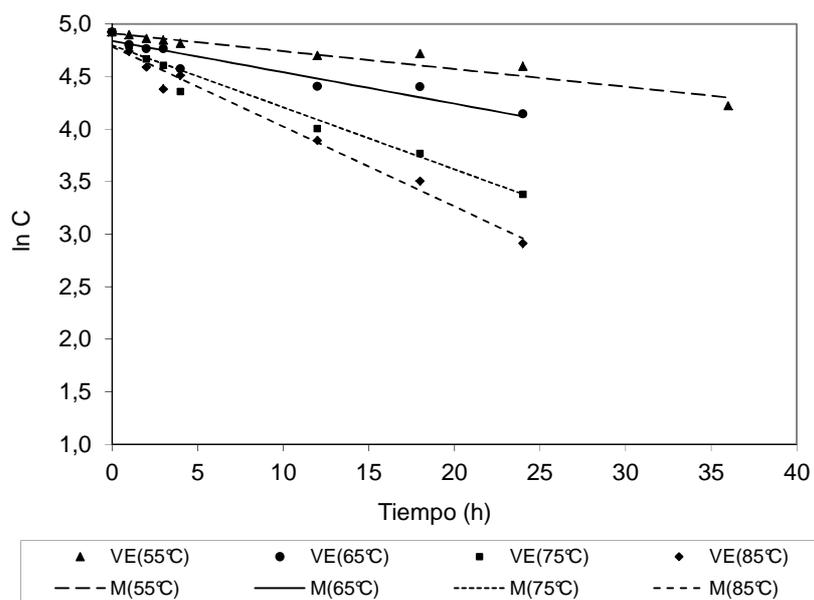
El ajuste por regresión lineal del modelo resultó adecuado ( $p\text{-valor} < 0.05$ ) para el ESL, a todas las temperaturas de calentamiento, y para el EF, para 55 y 65°C. En el caso de las temperaturas de 75 y 85°C, el ajuste no resultó significativo ( $p\text{-valor} > 0.05$ ) (Tabla IV.8), poniendo de manifiesto lo que ya se había observado en el análisis cualitativo de la Figura IV.18. A pesar de ello, la pendiente de este ajuste constituye una medida de la velocidad de degradación de las antocianinas. Para los dos tipos de extractos, cuanto más elevada fue la temperatura mayores fueron los valores de la pendiente, indicando que a temperaturas más elevadas más importante fue el deterioro de las antocianinas. Además, para una misma temperatura, el deterioro de las antocianinas fue mayor en el EF que en ESL.

**Tabla IV.8.** Modelo de regresión de orden cero y parámetros estadísticos de bondad de ajuste. Las unidades del tiempo, t, es horas.

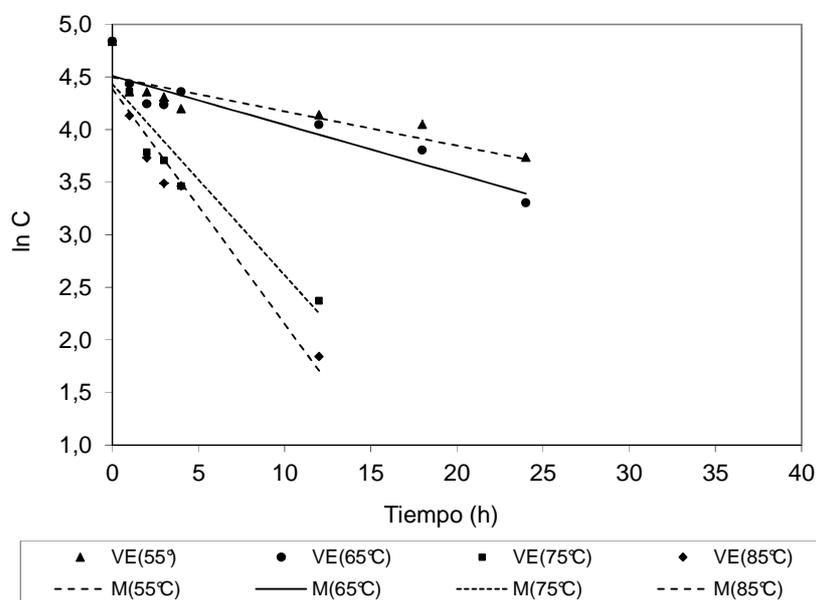
Extracto	Temp. (°C)	Modelo	p-valor regresión
ESL	55	$C = 134.19 - 1.68 t$	0.0000
	65	$C = 123.06 - 2.62 t$	0.0008
	75	$C = 115.97 - 4.04 t$	0.0006
	85	$C = 112.17 - 4.31 t$	0.0005
EF	55	$C = 89.18 - 2.07 t$	0.0295
	65	$C = 91.79 - 2.78 t$	0.0078
	75	$C = 81.68 - 7.19 t$	0.0809
	85	$C = 75.94 - 7.03 t$	0.0959

#### IV.5.1.2. Modelo cinético de orden uno

El ajuste por regresión lineal de una cinética de orden uno se realizó a partir de la representación de la evolución del logaritmo neperiano de la concentración de antocianinas ( $\ln C$ ) en función del tiempo de calentamiento, para el ESL y el EF y para cada temperatura de calentamiento, (Figuras IV.19 y IV.20).



**Figura IV.19.** Degradación de antocianinas en el ESL durante el calentamiento a 55, 65, 75 y 85°C. VE se refiere a los valores experimentales, donde cada punto representa el promedio de 3 réplicas. M muestra los datos obtenidos con el modelo de cinética de orden uno.



**Figura IV.20.** Degradación de antocianinas en el EF durante el calentamiento a 55, 65, 75 y 85°C. VE se refiere a los valores experimentales, donde cada punto representa el promedio de 3 réplicas. M muestra los datos obtenidos con el modelo de cinética de orden uno.

La comparación cualitativa, en las figuras, de los resultados experimentales y de los datos obtenidos con el modelo de cinética de orden uno muestra que este tuvo un mejor ajuste que el modelo de orden cero.

El p-valor de regresión ( $< 0.05$ ) obtenido por las ecuaciones de modelo de orden uno para los ESL y EF a todas las temperaturas de calentamiento indicó que el ajuste del modelo fue significativo (Tabla IV.9). Además, se puede observar en las Figuras IV.19 y VI.20 que la tendencia de los datos experimentales y los predichos por el modelo es prácticamente la misma, lo que anticiparía la idoneidad del modelo. En este caso, los valores de la pendiente de cada ajuste suponen una medida de la velocidad con la que se degradan las antocianinas en esas condiciones. Como se observa, dichas pendientes fueron más elevadas cuando mayor fue la temperatura de trabajo, lo que estaría indicando un incremento en la velocidad de deterioro de las antocianinas con el aumento de la temperatura de calentamiento. En este modelo de primer orden, también se pone de manifiesto que la velocidad de degradación de las antocianinas en el EF fue mayor que en el ESL para una misma temperatura. Por lo tanto, los EF fueron más sensibles al efecto de la temperatura de calentamiento.

**Tabla IV.9.** Modelo de regresión de orden uno y parámetros estadísticos de bondad de ajuste. Las unidades del tiempo, t, es horas.

Extracto	Temp. (°C)	Modelo	p-valor regresión
ESL	55	$\ln C = 4.91 - 0.02 t$	0.0001
	65	$\ln C = 4.83 - 0.03 t$	0.0001
	75	$\ln C = 4.79 - 0.06 t$	0.0000
	85	$\ln C = 4.78 - 0.08 t$	0.0000
EF	55	$\ln C = 4.49 - 0.03 t$	0.0024
	65	$\ln C = 4.51 - 0.05 t$	0.0009
	75	$\ln C = 4.43 - 0.18 t$	0.0036
	85	$\ln C = 4.38 - 0.22 t$	0.0013

### IV.5.1.3. Selección de modelo de mejor ajuste

Para evaluar cuál de los modelos (orden cero y orden uno) es el que mejor describió la degradación de antocianinas en función del tiempo de calentamiento, se realizó un análisis de regresión y se obtuvieron y analizaron los criterios de calidad del ajuste, según se explicó en el apartado III.7.3.

Como se ha mostrado, en el caso de los extractos ESL para todas las temperaturas ensayadas, los p-valor de regresión de los 2 modelos propuestos indicaron que hubo una relación significativa entre las variables  $\ln C$  o  $C$  ( $Y$ ), según el modelo analizado, y el tiempo de calentamiento ( $x$ ) (Tabla IV.8 y IV.9). Sin embargo, en la Tabla IV.10 se puede ver que para el modelo de orden cero las MEA fueron elevadas, por lo que la calidad del ajuste fue menor para este modelo. Los p-valor DW ( $<0.05$ ) para 75 y 85°C estarían señalando falta de independencia entre los residuos. Por lo tanto, el modelo de orden cero no sería adecuado para describir la cinética de degradación de las antocianinas presentes en el ESL con el tiempo de calentamiento.

**Tabla IV.10.** Ajuste de los modelos de orden cero y uno para el ESL a distintas temperaturas de calentamiento.

Orden modelo	Temp. (°C)	r	MEA	p-valor DW
0	55	- 0.98	3.94	0.1439
0	65	- 0.93	6.52	0.0540
0	75	- 0.94	10.04	0.0028
0	85	- 0.94	10.35	0.0084
1	55	- 0.95	0.05	0.1691
1	65	- 0.96	0.06	0.4423
1	75	- 0.99	0.07	0.0177
1	85	- 0.99	0.06	0.1673

En cuanto al ajuste de los modelos de orden uno, en todos los casos resultó adecuado, tal y como indican los bajos valores de MEA y la independencia de los residuos ( $p$ -valor DW  $> 0.05$ ) a todas las temperaturas con excepción de 75°C. Por lo tanto, dado que este modelo, en general, cumplió con los criterios de calidad de ajuste, se propone que la degradación de las antocianinas en el ESL con el tiempo de calentamiento siguió una cinética de primer orden.

Los coeficientes de correlación,  $r$ , que miden la intensidad de la relación entre las variables  $x$  e  $Y$ , fueron en los dos modelos estudiados próximos a  $-1$ , indicando que existió una fuerte relación lineal negativa entre las variables. Por lo tanto, cuanto mayor fue el tiempo de calentamiento, menor fue la concentración de antocianinas en los extractos y, en consecuencia, mayor fue el deterioro de las mismas.

De la misma manera, se estudió la bondad del ajuste de los modelos de distinto orden sobre la evolución del contenido de antocianinas en el EF. Así, exceptuando los resultados a 75 y 85°C para orden cero, los  $p$ -valor de regresión (Tablas IV.8 y IV.9) fueron, en todos los casos, inferiores a 0.05 señalando una relación significativa entre las variables consideradas en los ajustes.

Para el modelo de orden cero las MEA fueron elevadas y los  $p$ -valor DW únicamente mostraron independencia de los residuos a 55°C ( $> 0.05$ ) (Tabla IV.11), no así a las demás temperaturas ensayadas. Para el modelo de orden uno las MEA obtenidas fueron bajas, sin embargo los  $p$ -valor DW señalaron independencia de los residuos a 55 y 65°C, no así para 75 y 85°C.

**Tabla IV.11.** Ajuste de los modelos de orden cero y uno para el EF a distintas temperaturas de calentamiento.

Orden modelo	Temp. (°C)	r	MEA	p-valor DW
0	55	- 0.76	10.81	0.0528
0	65	- 0.85	9.88	0.0201
0	75	- 0.76	21.24	0.0214
0	85	- 0.73	21.63	0.0300
1	55	- 0.90	0.10	0.0582
1	65	- 0.93	0.14	0.0616
1	75	- 0.95	0.22	0.0255
1	85	- 0.97	0.17	0.0276

Los coeficientes de correlación, tanto en el modelo de orden cero como de orden uno, señalaron que a medida que aumentó el tiempo de calentamiento disminuyó la concentración de antocianinas ( $r \approx -1$ ), poniendo de manifiesto que las antocianinas presentes en los ESL y EF se fueron deteriorando a medida que aumentó el tiempo de calentamiento.

Se señaló en la metodología que los buenos modelos son aquellos que cumplen más criterios de calidad del ajuste (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar, 2008), por lo que, a pesar de que la descripción de la degradación de antocianinas con el tiempo de calentamiento no cumplió con todos los criterios de calidad de ajuste al modelo de orden uno, dado que cumple con la mayoría de ellos, se propone que la degradación de las antocianinas en el EF con el tiempo de calentamiento siguió una cinética de primer orden.

Por otro lado, la bibliografía hace referencia a que la cinética de la reacción de degradación de antocianinas durante el calentamiento es de primer orden. Así, los resultados publicados por Pereira Kechinski, et al. (2010) de evolución de  $\ln(C_0/C)$  en función del tiempo de calentamiento para jugo de arándano calentado a 40, 50, 60, 70 y 80°C fueron similares a los obtenidos en la presente investigación indicando una cinética de degradación de primer orden. Este comportamiento coincide también con los resultados obtenidos por

Wang y Xu (2007) que investigaron la cinética de degradación de antocianinas en jugos de mora durante el tratamiento térmico a 60, 70, 80 y 90°C; como así también con los resultados publicados por Ferreira Ozela et al. (2007) que estudiaron la influencia de la temperatura sobre la estabilidad de las antocianinas presentes en extracto de frutos de espinaca blanca.

Estas referencias bibliográficas estarían poniendo de manifiesto que la elección de un modelo de primer orden, para describir la cinética de la reacción de degradación de antocianinas en los ESL y EF durante el calentamiento es adecuada.

### **IV.5.2. Análisis de parámetros de modelos empíricos**

#### **IV.5.2.1. Constante de velocidad de degradación y tiempo de vida media**

En el apartado anterior se mencionó que los datos experimentales de degradación de las antocianinas en función del tiempo de calentamiento, para los distintos niveles de temperaturas ensayadas, se ajustaron a una cinética de primer orden, por lo que los parámetros cinéticos de la degradación térmica de las antocianinas (constante de velocidad,  $k$ , y tiempo de vida media,  $t_{1/2}$ ) fueron obtenidos para una cinética de orden uno (Tablas IV.12 y IV.13).

Para el ESL y el EF, se observó un incremento de la constante de velocidad de degradación de antocianinas con la elevación de la temperatura, lo que reafirma lo señalado anteriormente, que la degradación de antocianinas en los ESL y EF fue mayor a medida que aumentó la temperatura.

Si se comparan las  $k$  de los ESL y EF, para todas las temperaturas estudiadas, se puede ver que hubo una menor velocidad de degradación de las antocianinas en el ESL respecto a las presentes en el EF.

**Tabla IV.12.** Efecto de la temperatura en la  $k$  ( $h^{-1}$ ) de las antocianinas en los ESL y EF a distintas temperaturas de calentamiento.

Temperatura (°C)	$k_{ESL}$	$k_{EF}$
55	$0.0169 \pm 0.0016$ a A	$0.0326 \pm 0.0015$ b A
65	$0.0299 \pm 0.0025$ a B	$0.0466 \pm 0.0030$ b B
75	$0.0591 \pm 0.0024$ a C	$0.1818 \pm 0.0172$ b C
85	$0.0760 \pm 0.0047$ a D	$0.2235 \pm 0.0122$ b D

Letras mayúsculas diferentes dentro de una columna indican que el análisis de varianza (ANOVA) señaló diferencias significativas entre las medias de  $k$  a 55, 65, 75 y 85°C para un mismo extracto, mientras que letras minúsculas distintas en una fila señalan diferencias entre las medias de  $k$  de ESL y EF para una misma temperatura ( $p$ -valor < 0.05).

**Tabla IV.13.** Efecto de la temperatura en el  $t_{1/2}$  (h) de las antocianinas en los ESL y EF a distintas temperaturas de calentamiento.

Temperatura (°C)	$t_{1/2}$ ESL	$t_{1/2}$ EF
55	41	21
65	23	15
75	12	4
85	9	3

Ferreira Ozela et al. (2007) al estudiar la influencia de la temperatura sobre la estabilidad de las antocianinas presentes en extracto de frutos de espinaca blanca calentados a 40 y 60°C durante 30 minutos obtuvieron, a 40°C valores de constante de velocidad de degradación comprendidos entre 0.0928 y 0.1152  $h^{-1}$ , valores superiores a los obtenidos en la presente investigación para todas las temperaturas ensayadas en el ESL y para las temperaturas de 55 y 65°C del EF. Además a 60°C los resultados publicados para la constante de velocidad de degradación estuvieron comprendidos entre 0.2559 y 0.3324  $h^{-1}$ , como se puede comprobar estos valores fueron mayores que los obtenidos para los dos extractos y a todas las temperaturas ensayadas. Por lo tanto, la

degradación de antocianinas presentes en los extractos de antocianinas obtenidos en este trabajo fue menor que los encontrados en las referencias de la bibliografía.

El tiempo de vida media, en los dos extractos, disminuyó al aumentar la temperatura de calentamiento. Sin embargo, para una misma temperatura, se puede ver que este parámetro fue mayor en el ESL, indicando una mayor estabilidad frente al calentamiento de las antocianinas presentes. Por ejemplo, a 55°C el  $t_{1/2}$  fue 49% más alto en el ESL que en el EF.

Al igual que en la presente investigación, Devi et al. (2012), observaron, que el tiempo de vida media de antocianinas de salvado de sorgo rojo disminuyó al aumentar la temperatura. Estos autores también señalaron que la velocidad de degradación de las antocianinas dependió del pH. Por lo tanto, la menor degradación de las antocianinas en el ESL respecto de las presentes en el EF cuando los extractos son calentados a una misma temperatura, podría deberse al menor pH del ESL.

Wang y Xu (2007) publicaron tiempos de vida media de degradación de antocianinas en jugo de mora de 16.7, 8.8, 4.7 y 2.9 h a 60, 70, 80 y 90°C, respectivamente; Pereira Kechinski et al. (2010) obtuvieron valores de este parámetro en la degradación de antocianinas en jugo de arándanos durante el tratamiento térmico, de 180.50, 42.30, 25.30, 8.60 y 5.11 h a 40, 50, 60, 70 y 80°C, respectivamente; mientras que Ferreira Ozela et al. (2007) reportaron tiempos de vida media de extractos de antocianinas de espinaca blanca comprendido entre 6.01 y 7.18 h cuando el calentamiento fue a 40°C y entre 2.08 y 2.70 h cuando el extracto se calentó a 60°C. Los tiempos de vida media obtenidos para el ESL fueron superiores a los publicados por estos autores.

Por lo tanto, al igual que en el presente estudio, estos autores observaron la sensibilidad de las antocianinas frente a la temperatura de calentamiento. Es por ello que de cara a su utilización industrial, lo más conveniente sería utilizar el extracto en productos que, si requieren un

tratamiento térmico, éste sea suave, es decir, temperaturas y tiempos de tratamiento lo más reducidos posible.

#### IV.5.2.2. Coeficiente de temperatura

El efecto de la temperatura sobre diferentes sistemas se puede cuantificar calculando el coeficiente de temperatura,  $Q_{10}$ , que indica la velocidad de cambio de un proceso o reacción al variar la temperatura 10°C (Melgarejo Moreno, 2000).

Los valores más altos del  $Q_{10}$  en el ESL y en el EF fueron obtenidos para el intervalo de 65 y 75°C (Tabla IV.14), indicando que en este rango de temperatura fue cuando más aumentó la cinética de degradación de las antocianinas al aumentar la temperatura (Pereira Kechinsky et al., 2007). Entre 75 y 85°C el incremento de la velocidad de degradación fue menor en los dos extractos.

**Tabla IV.14.** Efecto de la temperatura en el valor de  $Q_{10}$  de la degradación de antocianinas en los ESL y EF.

Intervalo de temperatura (°C)	$Q_{10}$ ESL	$Q_{10}$ EF
55 - 65	1.77	1.43
65 - 75	1.98	3.90
75 - 85	1.29	1.23

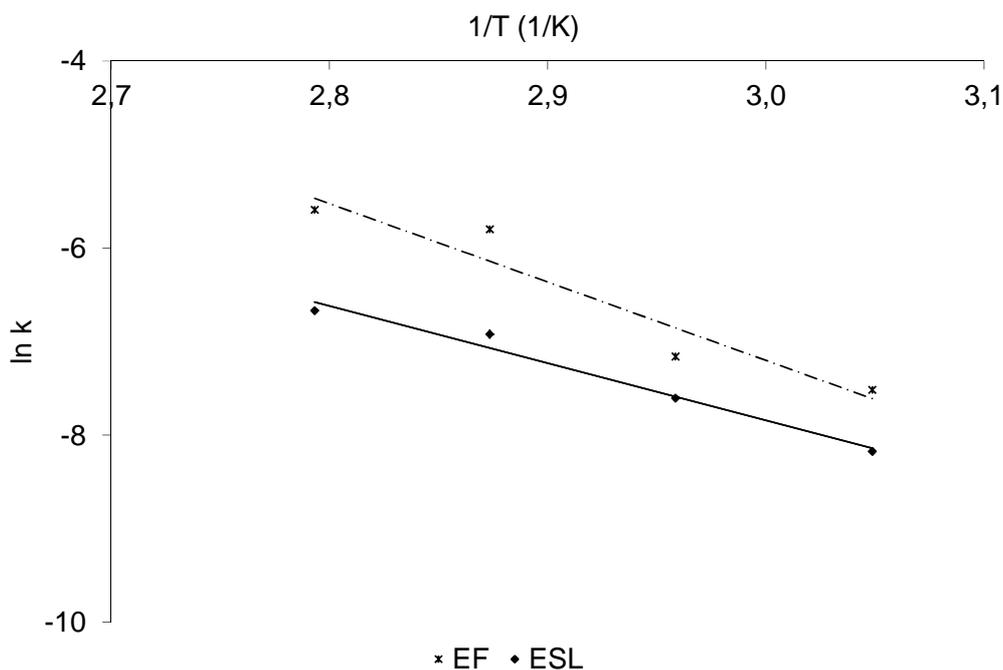
Pereira Kechinsky et al. (2007) obtuvieron, en sus estudios de degradación de antocianinas en jugo de arándanos, los valores de  $Q_{10}$  más altos en el rango de temperatura comprendido entre 40 y 50°C ( $Q_{10}=4.27$ ) y los valores más bajos en los intervalos comprendidos entre 60 y 70°C ( $Q_{10}=1.67$ ) y 70 y 80°C ( $Q_{10}=1.67$ ). Los resultados obtenidos en este último rango de temperatura fueron similares a los de la presente investigación, lo que indicaría,

el aumento de la velocidad de degradación de las antocianinas en los extractos y en el jugo de arándanos fueron similares cuando la temperatura de calentamiento pasó de 70 a 80°C.

### **IV.5.2.3. Modelo de la ecuación de Arrhenius: Energía de activación**

La ecuación de Arrhenius es usualmente aplicada para evaluar el efecto de la temperatura en las constantes de velocidad de diferentes tipos de reacciones (Olivera F y Olivera J, 1999). Para que los reactivos se conviertan en productos, los primeros deben alcanzar una energía mínima denominada energía de activación ( $E_a$ ).

En el presente trabajo, se ajustó la ecuación de Arrhenius a las constantes  $k$  identificadas a cada una de las temperaturas de tratamiento. Los altos coeficientes de correlación obtenidos estarían indicando una alta correlación entre  $\ln k$  y  $1/T$  y por lo tanto un buen ajuste del modelo de Arrhenius. En cuanto a la  $E_a$  obtenida para el EF fue superior que la obtenida para el ESL (Figura IV.21 y Tabla IV.15), indicando que se requiere más energía para que se inicie el deterioro de las antocianinas presentes en el EF que en el ESL.



**Figura IV.21.** Efecto de la temperatura sobre la constante de velocidad de degradación de las antocianinas presentes en los ESL y EF.

**Tabla IV.15.** Ajustes a la ecuación de Arrhenius para la degradación de antocianinas en los ESL y EF.

Extracto	Energía de activación (kJ/mol)	Coefficiente correlación
ESL	51.60 ± 0.69 a	- 0.97
EF	61.94 ± 1.64 b	- 0.90

Letras diferentes indica que el ANOVA señaló diferencias significativas entre las medias de la  $E_a$  del ESL y el EF para un p-valor inferior a 0.05.

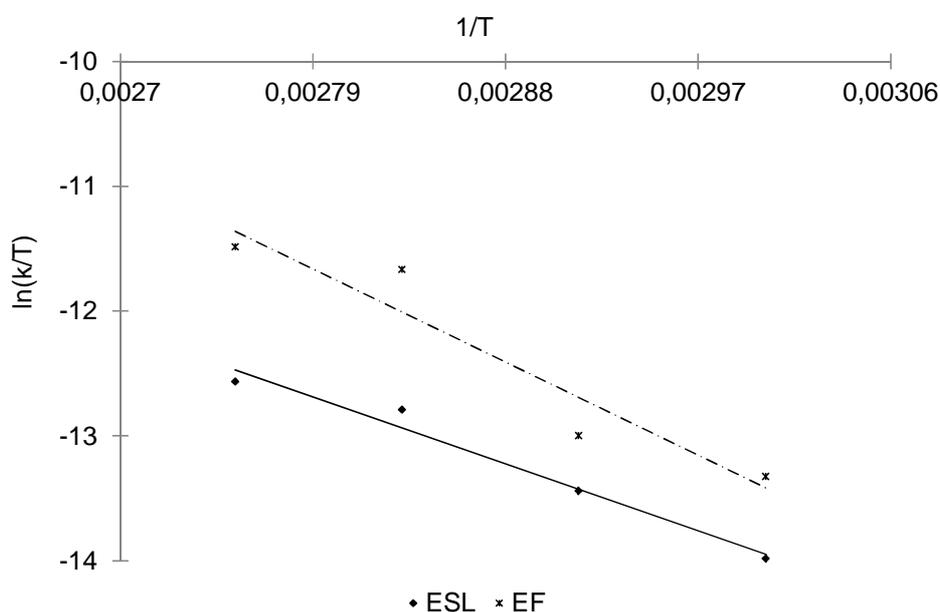
A partir de los resultados mostrados en las Tablas IV.12 y IV.13 ya se señaló que, para una misma temperatura, los valores de  $k$  y  $t_{1/2}$  fueron más elevados en el EF, poniendo de manifiesto un mayor deterioro de las antocianinas presentes en este extracto respecto de las presentes en el ESL.

Sin embargo, la  $E_a$  fue mayor en el EF, lo que estaría indicando que una vez que las moléculas de antocianinas, presentes en éste, han logrado alcanzar la  $E_a$ , el deterioro de estos pigmentos-antioxidantes ocurrió más rápido que en el ESL; es decir que la degradación de antocianinas en el ESL fue menos sensible a la elevación de la temperatura que las presentes en el EF (Wang y Xu, 2007; Pereira Kechinski et al., 2010). Quizá el menor deterioro de las antocianinas presentes en el ESL se debió a su menor valor de pH, ejerciendo éste un efecto protector sobre la estructura de las antocianinas (Jenshi Roobha et al., 2011) al disminuir las posibilidades de ataque nucleofílico de agua para convertirlo en la base carbinol (incolora).

En un estudio de cinética de degradación de antocianinas presentes en jugo de arándanos Pereira Kechinski et al. (2010) obtuvieron una energía de activación de 80.42 kJ/mol, mientras que Wang y Xu (2007) obtuvieron una energía de activación de 58.95 kJ/mol al estudiar la degradación de antocianinas en jugo de mora. Por lo tanto, la energía necesaria para que se inicie la degradación de antocianinas en el ESL y en el EF fueron similares que la publicada para jugo de mora y mucho más baja que para jugo de arándanos.

### **IV.5.3. Análisis de parámetros de termodinámica estadística: Modelo de Eyring**

Este análisis se basó en el modelo de Eyring y consistió en calcular la entalpía de activación ( $\Delta H^*$ ), la entropía de activación ( $\Delta S^*$ ) y la energía libre de Gibbs de activación ( $\Delta G^*$ ). Estas funciones termodinámicas fueron calculadas según se detalló en el apartado III.3.6, expresando en forma logarítmica la ecuación de Eyring y representando  $\ln(k/T)$  en función de  $1/T$ . La mayor pendiente y ordenada en el origen de la recta que se ajustó a los datos experimentales del EF respecto de la correspondiente al ESL estarían anticipando que las antocianinas del primero fueron más sensibles al calentamiento (Figura IV.22).



**Figura IV.22.** Relación entre la velocidad de degradación de las antocianinas presentes en los ESL y EF en función de la temperatura, basada en la teoría del estado de transición (Ecuación de Eyring).

El cambio de energía libre de Gibbs ( $\Delta G^*$ ) de un proceso tiene en cuenta los cambios de entalpía y entropía e indica si el proceso está termodinámicamente favorecido a una temperatura y presión dada. El proceso es espontáneo cuando el signo de esta función es negativo, es decir que una reacción química se produce sin necesidad de un suministro exterior de energía (Melo y Cuamatzi, 2006). La energía libre de Gibbs de activación ( $\Delta G^*$ ) representa la diferencia de energía libre entre el estado activado y los reactantes (Al-Zubaidy y Khalil, 2007). Cuanto más pequeña es la energía libre de Gibbs más rápidamente avanza la reacción (Brown et al., 2004), mientras que a mayor  $\Delta G^*$  menor es la constante de velocidad de reacción y por lo tanto más lenta es una reacción (Sykes, 1982). Los valores de  $\Delta G^*$  (calculados a 25°C) de los extractos ESL y EF no mostraron diferencias significativas (Tabla

IV.16), por lo que la energía requerida para que se inicie el deterioro de las antocianinas, en el ESL y en el EF, fue similar para ambos extractos.

**Tabla IV.16.** Funciones termodinámicas de activación para la degradación de antocianinas presentes en el ESL y EF.

Extracto	$\Delta H^*$ (kJ/mol)	$\Delta S^*$ (J/mol K)	$\Delta G^*$ (kJ/mol)
ESL	49.09 $\pm$ 5.03 a	-165.03 $\pm$ 14.36 a	98.67 $\pm$ 0.76 a
EF	68.93 $\pm$ 1.64 b	-102.25 $\pm$ 5.08 b	99.40 $\pm$ 0.18 a

Letras diferentes en una misma columna indican que el análisis de varianza (ANOVA) señaló diferencias significativas entre las medias de los parámetros para un p-valor inferior a 0.05.

El calor liberado o absorbido, en condiciones determinadas de presión y temperatura, durante una reacción química se denomina entalpía. Esta función tiene signo negativo cuando la reacción va acompañada de liberación de calor y positivo cuando representa un estado endotérmico, lo que lleva a un incremento de la degradación de las antocianinas con la temperatura (Al-Zubaidy y Khalil, 2007; Martínez Márquez, 2009). El valor más alto de  $\Delta H^*$  en el EF sugiere que el calentamiento provocó una mayor degradación de las antocianinas respecto del ESL.

La diferencia entre la entropía del estado de transición y la entropía de los reactivos se llama entropía de activación. Un cambio positivo de la entropía indica que el sistema está más desordenado (Jagannadham, 2009). La entropía de activación del ESL fue menor que la correspondiente al EF, lo que estaría señalando que las antocianinas presentes en el ESL fueron menos sensibles al calentamiento.

En la investigación de la cinética de degradación de antocianinas en jugo de arándanos Pereira Kechinski et al. (2010) publicaron valores de  $\Delta H^*$  de 77.8 kJ/mol K. Este valor fue mayor que los obtenidos para los extractos estudiados;

lo que estaría señalando que el calentamiento provocó una mayor degradación de las antocianinas presentes en el jugo respecto de las presentes en el ESL y en el EF. La  $\Delta S^*$  publicada por estos autores fue  $-43.07 \text{ J/mol K}$ . Este valor fue mayor que los correspondientes a ESL y al EF; por lo que las antocianinas presentes en el jugo fueron más sensibles al calentamiento que las presentes en los extractos. El valor de  $\Delta G^*$  publicado por Pereira Kechinski et al. (2010),  $91.3 \text{ kJ/mol K}$ , fue inferior a los obtenidos en la presente investigación, por lo que la degradación de las antocianinas en el jugo de arándanos fue más rápida que la degradación de antocianinas en los extractos.

En resumen, las antocianinas de los ESL y EF fueron menos sensibles al calentamiento que las presentes en el jugo de arándanos, probablemente debido a que su menor pH ejerció un efecto protector, favoreciendo el predominio de las estructuras más estables de las antocianinas; mientras que las antocianinas del EF resultaron ser más lábiles al calentamiento que las que estaban en el ESL.

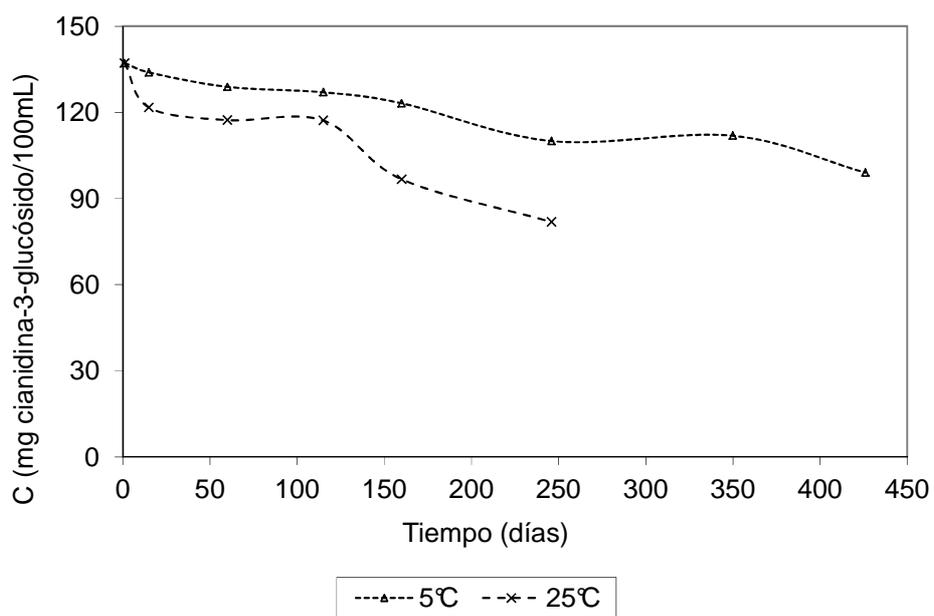
### **IV.6. Estudio de degradación de antocianinas durante el almacenamiento**

Como se ha mostrado en los estudios de extracción y de degradación de antocianinas durante el calentamiento, la temperatura fue un factor que influyó significativamente. Es por tanto lógico pensar que este parámetro puede resultar importante durante el almacenamiento de los extractos. Así, Martínez et al. (2011) al investigar la estabilidad de antocianinas en jugo concentrado de uva sin madurar señalaron que la elevación de la temperatura de almacenamiento produce un claro efecto de degradación de las mismas. Es por esto que, para evaluar la potencial aplicación de los extractos obtenidos en este trabajo en la industria alimentaria, se consideró conveniente determinar en qué medida la concentración de antocianinas se vio afectada por la temperatura de almacenamiento.

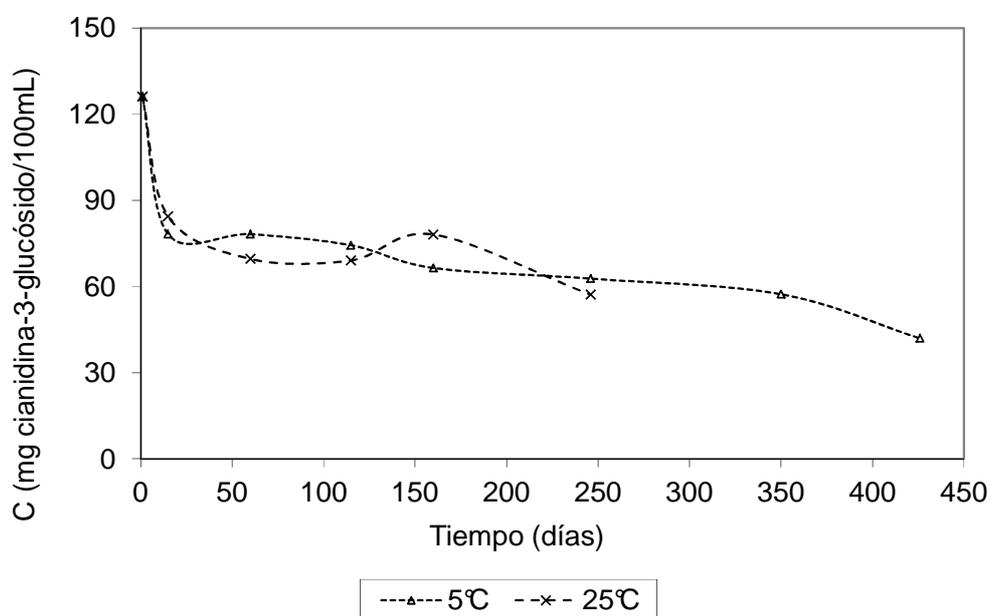
Para ello, los ESL y EF fueron almacenados a 5 y 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) al abrigo de la luz y el oxígeno, según se describió en el apartado III.4. Se tomaron estas temperaturas puesto que son las dos temperaturas más comunes de almacenamiento, temperatura ambiente y temperatura de refrigeración. El tiempo total de almacenamiento de los extractos a 5°C fue de 426 días, mientras que a 25°C fue de 246 días. El tiempo de almacenamiento a 5°C fue mayor para intentar que la concentración de antocianinas disminuyera por lo menos a la mitad de la concentración inicial.

Los resultados obtenidos mostraron que las antocianinas presentes en los extractos se fueron degradando paulatinamente a medida que fue transcurriendo el tiempo de almacenamiento (Figuras IV.23 y IV.24). Al final de los 426 días a 5°C, la degradación de antocianinas, en el ESL fue del 28% y en el EF del 67%; mientras que después de 246 días a 25°C el deterioro de las antocianinas en el ESL fue del 40% y en el EF del 55%.

En el ESL, para un mismo tiempo de almacenamiento, la degradación de las antocianinas a 5°C fue menor que a 25°C (Figura IV.23). Esto podría deberse a que cuanto más elevada es la temperatura mayor es la cantidad de moléculas que tienen la  $E_a$  suficiente para que se produzca la reacción de deterioro de las antocianinas. En cambio, en el EF no se observaron diferencias significativas en la degradación a las dos temperaturas de almacenamiento estudiadas (Figura IV.24). También se puede ver que los EF presentaron una importante disminución de la concentración de antocianinas en los primeros 15 días para luego disminuir de manera menos acusada.

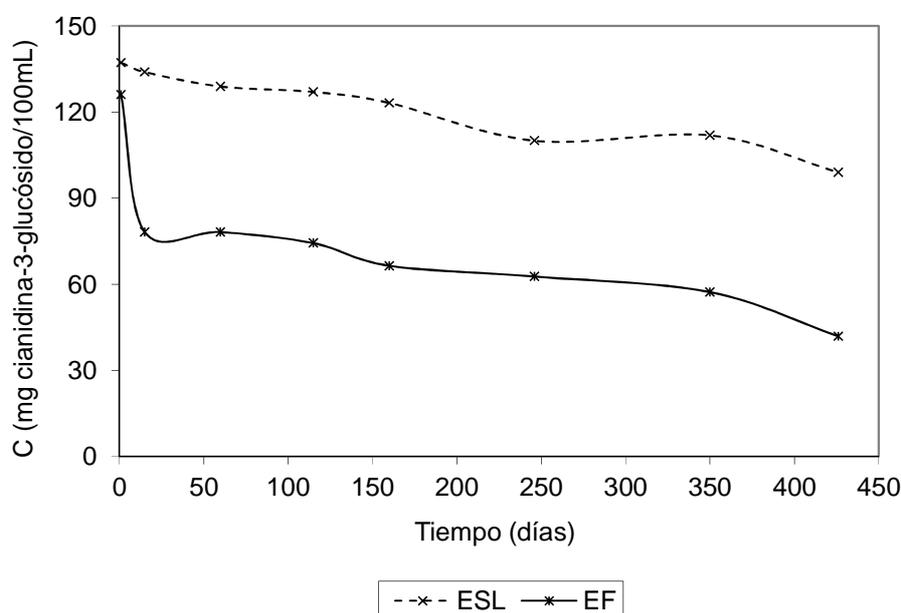


**Figura IV.23.** Degradación de antocianinas en el ESL durante el almacenamiento a 5 y 25°C. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas.

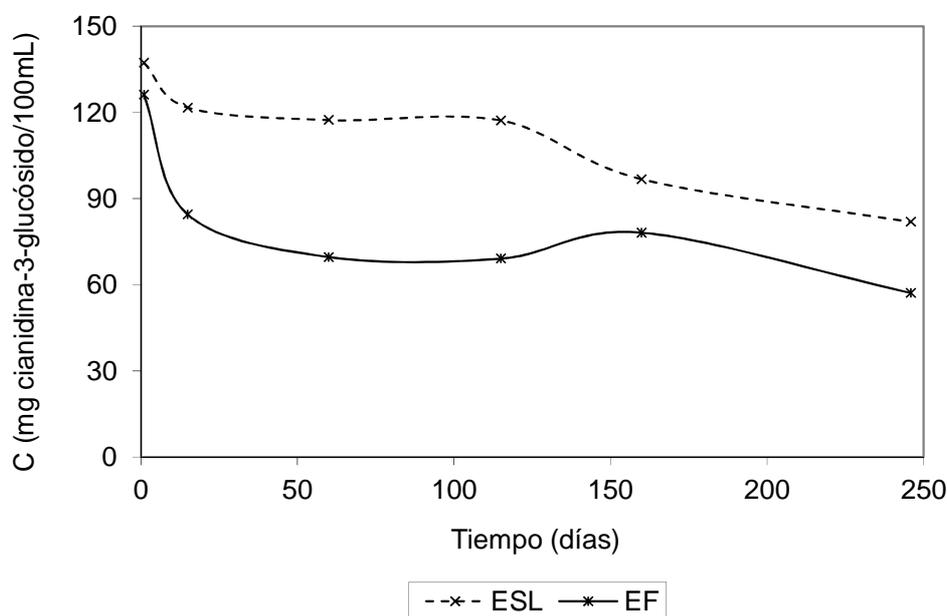


**Figura IV.24.** Degradación de antocianinas en el EF durante el almacenamiento a 5 y 25°C. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas.

Al comparar los resultados obtenidos en los ESL y en los EF, se observó que, la degradación de los pigmentos-antioxidantes, durante el almacenamiento a 5°C fue más lenta en el ESL (Figura IV.25). La principal diferencia en las cinéticas de degradación se encuentra en que en el EF se observó una importante disminución de la concentración de antocianinas durante los primeros 15 días, mientras que en ESL no se observó ese comportamiento. Esto podría atribuirse al mayor pH del EF, que estaría favoreciendo la formación de la pseudobase carbinol por ataque nucleofílico de agua. Después de los primeros 15 días, el grado de degradación de antocianinas con el tiempo para ambas temperaturas fue muy similar (pendientes parecidas). Un comportamiento parecido se observó en las experiencias de almacenamiento a 25°C (Figura IV.26).



**Figura IV.25.** Comparación de la antocianina degradada durante el almacenamiento a 5°C en el ESL y el EF. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas.



**Figura IV.26.** Comparación de la antocianina degradada durante el almacenamiento a 25°C en el ESL y el EF. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas.

Si bien para obtener el ESL y el EF se concentraron los correspondientes EDA hasta reducir 6 veces su volumen, el EDA obtenido con la metodología ESLA contenía mayor concentración de alcohol y menos cantidad de agua que el EDA obtenido con la metodología EAF. Por lo tanto, el contenido de agua en el EF fue mayor que en el ESL. Esto podría tener efecto adverso dado que un mayor contenido de agua podría provocar una mayor interacción entre el agua y el catión flavilio para formar la pseudobase inestable (Garzon, 2008). A esto se suma el menor efecto protector del pH, puesto que en el EF fue de  $3.64 \pm 0.01$  mientras que en el ESL fue de  $2.60 \pm 0.01$ .

Laleh et al. (2006), estudiaron la estabilidad de pigmentos antociánicos de cuatro especies de berberis almacenados a 5 y 25°C durante un período de 84 días. Al igual que los resultados obtenidos en el presente estudio,

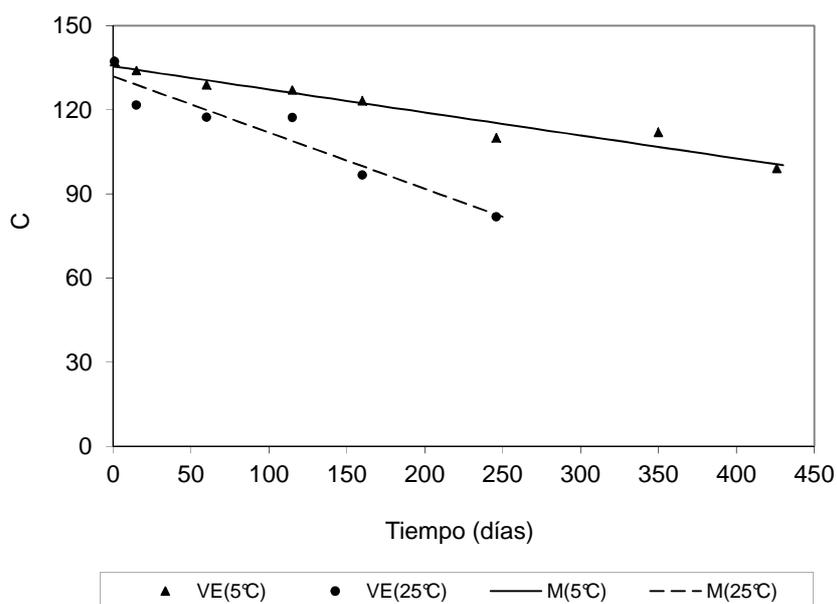
observaron que al aumentar la temperatura de almacenamiento se incrementó la degradación de las antocianinas. A 5°C tuvieron una destrucción del pigmento entre 10.22 y 57.81%, dependiendo de la especie; mientras que a 25°C esta proporción estuvo comprendida entre 62.33 y 77.87%. En el presente trabajo, para un período de almacenamiento de 84 días, el deterioro de las antocianinas en el ESL fue inferior al 10% y en el EF, inferior al 40%. A 25°C la degradación de las antocianinas fue menor al 15% en el ESL y al 45% en el EF. Por lo tanto, en las condiciones que son comparables, los resultados obtenidos se encuentran en el rango de los publicados por los mencionados autores.

### **IV.6.1. Cinética de la reacción de velocidad de degradación de antocianinas durante el almacenamiento**

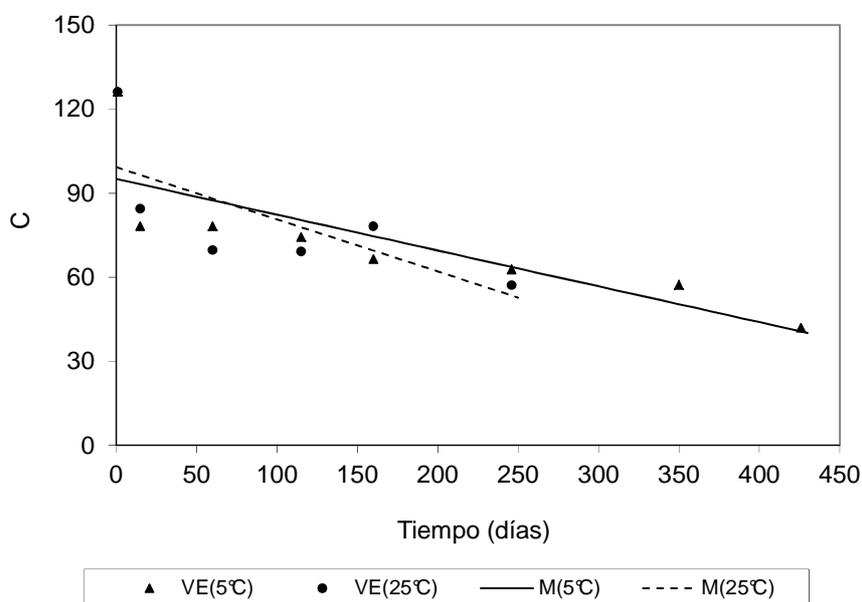
Al igual que en el caso del estudio de la influencia del calentamiento a diferentes temperaturas en la degradación de las antocianinas de los extractos, se aplicaron diferentes modelos para cuantificar la influencia de la temperatura de almacenamiento.

#### **IV.6.1.1. Modelo cinético de orden cero**

En primer lugar, se ajustó un modelo de orden cero. Como se puede observar en un primer análisis cualitativo (Figura IV.27 y Figura IV.28), el modelo se ajustó relativamente bien a los datos de concentración de antocianinas los ESL, pero este ajuste no resultó tan adecuado en el caso de los EF (Figura IV.28).



**Figura IV.27.** Degradación de antocianinas en el ESL durante el almacenamiento a 5 y 25°C. VE se refiere a los valores experimentales, donde cada punto representa el promedio de 3 réplicas. M muestra los datos obtenidos con el modelo de cinética de orden cero.



**Figura IV.28.** Degradación de antocianinas en el EF durante el almacenamiento a 5 y 25°C. VE se refiere a los valores experimentales, donde cada punto representa el promedio de 3 réplicas. M muestra los datos obtenidos con el modelo de cinética de orden cero.

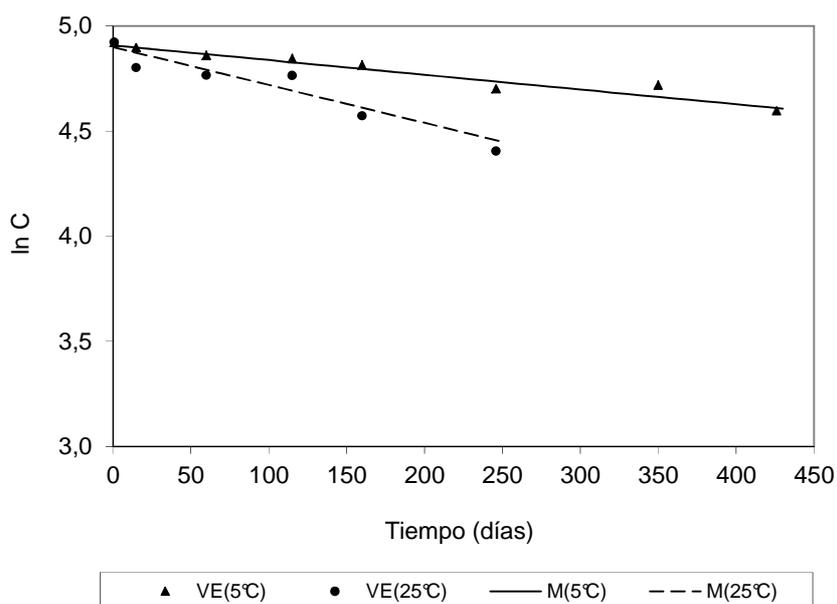
A partir del análisis estadístico se vio que el ajuste de este modelo de orden cero fue significativo ( $p$ -valor regresión  $< 0,05$ ) para todos los casos, excepto para el EF almacenado a  $25^{\circ}\text{C}$  (Tabla IV.17). Tanto en el ESL como en el EF, se puede ver que las pendientes fueron mayores cuantos mayores fueron las temperaturas de almacenamiento, señalando que el deterioro de las antocianinas fue más elevado a  $25^{\circ}\text{C}$  que a  $5^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla IV.17.** Modelo de regresión de orden cero y parámetros estadísticos de bondad de ajuste. Las unidades del tiempo,  $t$ , es días.

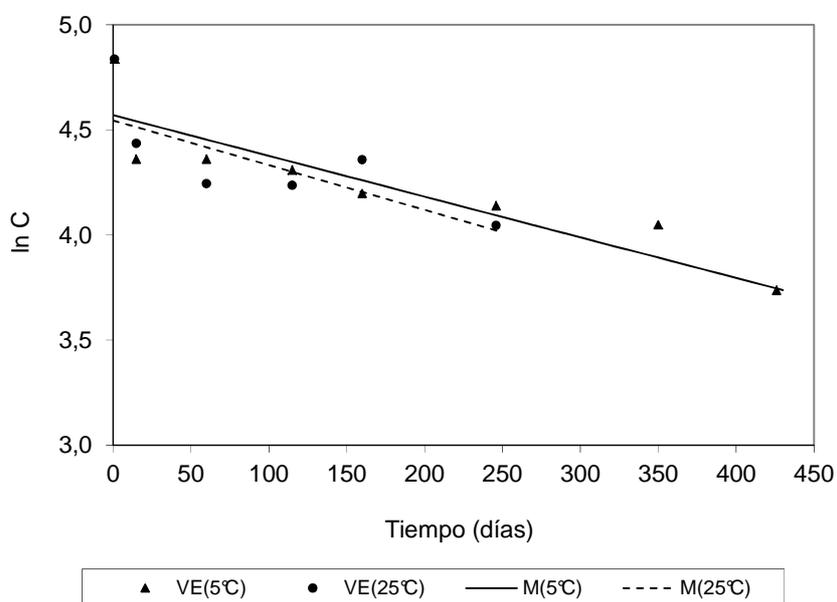
Extracto	Temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	Modelo	$p$ -valor regresión
ESL	5	$C = 135.48 - 0.08 t$	0.0000
	25	$C = 131.94 - 0.20 t$	0.0030
EF	5	$C = 95.09 - 0.13 t$	0.0140
	25	$C = 99.22 - 0.19 t$	0.1044

#### IV.6.1.2. Modelo cinético de orden uno

También se ajustaron los valores de  $\ln C$  en función del tiempo de almacenamiento mediante un modelo cinético de orden uno (Figuras IV.29 y IV.30). Se puede ver en la Figura IV.29 que el modelo se ajustó satisfactoriamente a los datos de  $\ln C$  en función del tiempo de los ESL. Sin embargo, al igual que el modelo de orden cero, este ajuste fue peor en el caso de los EF (Figura IV.30).



**Figura IV.29.** Degradación de antocianinas en el ESL durante el almacenamiento a 5 y 25°C. VE se refiere a los valores experimentales, donde cada punto representa el promedio de 3 réplicas. M muestra los datos obtenidos con el modelo de cinética de orden cero.



**Figura IV.30.** Degradación de antocianinas en el EF durante el almacenamiento a 5 y 25°C. VE se refiere a los valores experimentales, donde cada punto representa el promedio de 3 réplicas. M muestra los datos obtenidos con el modelo de cinética de orden cero.

En este caso, los p-valor de regresión para las ecuaciones de modelo de orden uno fueron menores que 0.05 para los ESL almacenados a 5 y 25°C y para el EF almacenado a 5°C (Tabla IV.18), indicando que el modelo de regresión de orden uno describe adecuadamente la cinética de degradación de las antocianinas en función del tiempo de almacenamiento para los casos mencionados. Para el EF almacenado a 25°C el que el p-valor de regresión fue de 0.10. Por lo tanto, se podría señalar que también este modelo explica el deterioro de las antocianinas en el EF en función del tiempo de almacenamiento y almacenado a 25°C, pero con sólo un 90% de confianza.

**Tabla IV.18.** Modelo de regresión de orden uno y parámetros estadísticos de bondad de ajuste. Las unidades del tiempo, t, es días.

Extracto	Temp. (°C)	Modelo	p-valor regresión
ESL	5	$\ln C = 4.9076 - 0.0007 t$	0.0000
	25	$\ln C = 4.8998 - 0.0018 t$	0.0056
EF	5	$\ln C = 4.5697 - 0.0019 t$	0.0007
	25	$\ln C = 4.5452 - 0.0021 t$	0.1001

Las pendientes de ajuste son una medida de la velocidad del proceso de degradación de antocianinas. El pequeño valor de las pendientes fue debido a que la cinética de degradación de los pigmentos-antioxidantes, a esas temperaturas, fue baja; por lo que el deterioro de las antocianinas fue relativamente lento durante el almacenamiento. La pendiente de la curva del ESL a 25°C fue mayor que a 5°C (Figura IV.29), lo que estaría indicando que la velocidad de degradación de las antocianinas fue más elevada cuando se incrementó la temperatura de almacenamiento. La pendiente de la curva del EF almacenado a 5°C fue ligeramente menor que cuando éste fue almacenado a 25°C (Figura IV.30), por lo que la degradación de las antocianinas a 5°C fue

algo inferior que a 25°C. Además se observa que el deterioro de las antocianinas fue mayor en el EF que en el ESL, ya que las pendientes de las curvas de éste último fueron menores.

#### **IV.6.1.3. Selección de modelo de mejor ajuste**

Para evaluar cuál de los modelos (orden cero y orden uno) es el que mejor describió la degradación de antocianinas en función del tiempo de almacenamiento se realizó un análisis de regresión y se obtuvieron y analizaron los criterios de calidad del ajuste, según se explicó en el apartado III.7.3.

Los p-valor de regresión de los dos modelos propuestos para el ESL y a las temperaturas ensayadas indicaron que, en general, hubo una relación significativa entre la concentración de las antocianinas y el tiempo de almacenamiento (Tablas IV.17 y IV.18); mientras que para el EF se observó relación significativa entre las variables C o  $\ln C$  en función del tiempo de almacenamiento a 5°C con un 95% de confianza y a 25 °C con un 90% de confianza.

Los coeficientes de correlación,  $r$ , fueron, en general próximos a -1 señalando una fuerte relación lineal entre las variables C o  $\ln C$  (para modelo de orden cero y uno, respectivamente) y el tiempo de almacenamiento (Tablas IV.19 y IV.20). El signo negativo pone de manifiesto que a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento menor fue la concentración de antocianinas en los extractos. Los p-valor DW ( $>0.05$ ) en todos los casos señalaron que hubo independencia entre los residuos, mientras que las MEA más bajas se obtuvieron para el modelo de orden uno, indicando que la calidad del ajuste de este modelo de regresión simple fue mejor que el de orden cero.

**Tabla IV.19.** Ajuste de los modelos de orden cero y uno para el ESL a distintas temperaturas de almacenamiento.

Orden modelo	Temp. (°C)	r	MEA	p-valor DW
0	5	- 0.97	2.18	0.9328
0	25	- 0.95	4.59	0.5972
1	5	- 0.97	0.02	0.9321
1	25	- 0.94	0.04	0.2013

**Tabla IV.20.** Ajuste de los modelos de orden cero y uno para el EF a distintas temperaturas de almacenamiento.

Orden modelo	Temp. (°C)	r	MEA	p-valor DW
0	5	- 0.81	9.82	0.1305
0	25	- 0.72	13.09	0.0607
1	5	- 0.93	0.09	0.2629
1	25	- 0.73	0.15	0.1255

Ya se comentó anteriormente que Gutiérrez Pulido y Vara Salazar (2008) señalan que los buenos modelos son aquellos que cumplen más criterios de calidad del ajuste, aunque pueden existir circunstancias en las que, al no cumplirse alguno de los criterios, desde el punto de vista práctico no necesariamente harán inviable el modelo. Por lo tanto, dada la sencillez del modelo, el cumplimiento de los criterios de calidad de ajuste y a efectos de poder comparar las constantes de velocidad de degradación y los tiempos de vida media, que es uno de los objetivos de este trabajo, se propuso describir la degradación de las antocianinas de los ESL y EF con el tiempo de almacenamiento, a las temperaturas de almacenamiento de 5 y 25°C, mediante un modelo cinético de primer orden.

Los autores Wang y Xu (2007) publicaron que la cinética de degradación de antocianinas en jugos de mora de 8.90 y 65°Brix durante el almacenamiento a 5, 25 y 37°C siguió una cinética de primer orden, Torres et al. (2011), llegaron

a la misma conclusión al estudiar la estabilidad de las antocianinas presentes en jugo de naranja sanguinas durante el almacenamiento a 4 y 20°C, también Türkyılmaz y Özkan (2012) ajustaron a un modelo de primer orden la degradación de antocianinas de jugo concentrado de zanahoria (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) durante el almacenamiento a -23, 5, 20 y 30°C.

Estas referencias bibliográficas estarían poniendo de manifiesto que la elección de un modelo de primer orden, para describir la cinética de la reacción de degradación de antocianinas en los ESL y EF durante el almacenamiento es adecuada.

#### IV.6.2. Análisis de parámetros de modelos empíricos: Constante de velocidad de degradación y tiempo de vida media

En el ESL la constante de velocidad de degradación fue aproximadamente 2.7 veces superior a 25 que a 5°C, lo que señala que el deterioro fue mucho mayor a la primera temperatura. En el EF la velocidad de degradación fue a 25°C ligeramente superior que a 5 °C (Tabla IV.21).

**Tabla IV.21.** Efecto de la temperatura en la  $k$  (días<sup>-1</sup>) de las antocianinas en los ESL y EF a distintas temperaturas de almacenamiento.

Temperatura (°C)	$k_{ESL}$	$k_{EF}$
5	0.0007 ± 0.0001 a A	0,0019 ± 0.0001 a B
25	0.0018 ± 0.0001 b A	0,0021 ± 0.0001 b B

Letras minúsculas diferentes en una misma columna indican que el análisis de varianza (ANOVA) señaló diferencias significativas entre las medias de  $k$  a 5 y 25°C para un mismo extracto, mientras que letras mayúsculas distintas en una misma fila señalan diferencias entre las medias de  $k$  de ESL y EF para una misma temperatura ( $p$ -valor < 0.05).

Si se comparan ahora los métodos de obtención de antocianinas se puede observar que el deterioro de las antocianinas en el ESL almacenado a 5°C fue casi 2.7 veces menor que en el EF. En el caso del almacenamiento a 25°C, la velocidad de degradación de las antocianinas a 25°C fue ligeramente superior en los EF que en los ESL.

Reyes y Cisneros-Zevallos (2007) obtuvieron extractos acuosos de antocianinas de batatas a pH 3 y lo almacenaron a 25°C. Estos autores calcularon, para un modelo de orden uno, constantes de velocidad de degradación de 0.0168 y 0.0072 días<sup>-1</sup>, dependiendo de la variedad. El mismo estudio lo hicieron en extractos acuosos concentrados de uva y zanahoria morada, en los que las constantes de velocidad de degradación fueron 0.1585 y 0.0024 días<sup>-1</sup>, respectivamente. Por lo tanto, los valores de constante de velocidad de degradación obtenidos en la presente investigación para el ESL y EF, almacenados a 25°C, fueron menores que los publicados por los mencionados autores para extractos acuosos de batata y uva, mientras que la constante de velocidad de degradación publicada para zanahoria morada fue mayor a la del ESL y similar que la del EF. Esto significa que, los ESL y EF, obtenidos en este caso, fueron más estables que los extractos acuosos de batata y uva durante el almacenamiento a 25°C. Además, el ESL tuvo una estabilidad mayor que el extracto acuoso de zanahoria morada y el EF una estabilidad similar, en las condiciones comparables.

En cuanto al análisis del tiempo de vida media, ( $t_{1/2}$ ), del ESL a las temperaturas estudiadas, se observó que a 5°C el producto tuvo un deterioro 2.5 veces menor que a 25°C (Tabla IV.22). Resulta interesante observar la marcada diferencia en el tiempo de vida media de los extractos a 5°C, mientras en el ESL este tiempo fue de 990 días, en el EF fue de 265 días. A 25°C el ESL tuvo un tiempo de vida media 1.42 veces superior al del EF.

**Tabla IV.22.** Efecto de la temperatura en el  $t_{1/2}$  (días) de las antocianinas en los ESL y EF a distintas temperaturas de almacenamiento.

Temperatura (°C)	ESL	EF
5	990	365
25	385	330

Wang y Xu (2007) obtuvieron tiempos de vida media de antocianinas presentes en jugos de mora a 8.90°Brix y almacenados a 5 y 25°C de 330 y 32 días, respectivamente y para jugo de mora a 65°Brix de 139 días cuando la temperatura de almacenamiento se mantuvo en 5°C y de 20 días cuando ésta estuvo a 25°C. Reyes y Cisneros-Zevallos (2007) calcularon, para extractos acuosos almacenados a 25°C, tiempos de vida media de 41 y 2.5 días para batata morada; 47 días, para uva y 216 días, para zanahoria morada. Por su parte, Morais et al. (2002) al extraer antocianinas de la piel de uva, concluyeron que la pérdida de antocianinas aumentó con el tiempo de almacenamiento. A 24°C la pérdida de antocianinas fue 7.73% en el día 1 de almacenamiento y 37.19% en día 14; comportamiento que se hizo más notorio al elevarse la temperatura de almacenamiento. Por lo tanto, los tiempos de vida media, obtenidos para el ESL y el EF, fueron superiores a los publicados por los mencionados investigadores. Probablemente, esta diferencia fue debida al efecto protector del pH y a que el mayor contenido de agua en el jugo de mora y en los extractos acuosos respecto del ESL, hizo que el agua actuase como nucleófilo atacando el catión flavilio de las antocianinas.

Tanto en la presente investigación como en las publicaciones mencionadas se observó el significativo deterioro que sufrieron las antocianinas cuando la temperatura de almacenamiento fue relativamente elevada (25°C). Es por esto que los extractos deberían almacenarse a 5°C.

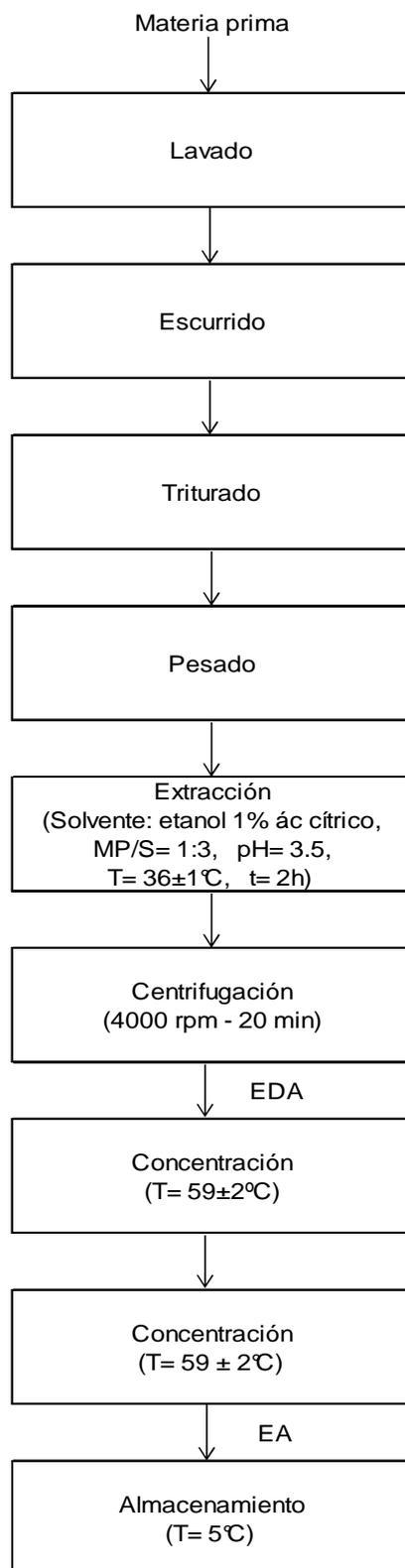
De todo lo expuesto hasta ahora, se considera que es factible la industrialización de arándanos considerados descarte para obtener un extracto

de antocianinas. Dado que la metodología ESLA requirió menor tiempo de procesado, fue más sencilla de aplicar, el alcohol utilizado como disolvente se puede recuperar para volver a utilizarlo y, principalmente, porque las antocianinas presentes en el ESL fueron menos sensible al efecto de la temperatura (ensayos de calentamiento y almacenamiento), se consideró que, de las dos metodologías de extracción, fue la más adecuada, para extraer antocianinas de arándanos.

### **IV.7. Proceso de obtención de extracto de antocianinas**

A la luz de los resultados obtenidos en cuanto a nivel de extracción y estabilidad de los extractos, se dio un paso más para intentar conseguir un extracto de calidad comercial. En este caso, se buscó aumentar la concentración de antocianinas en el ESL. Para ello, se realizó una segunda concentración del extracto, según se describió en el apartado III.2.1. El producto obtenido se denominó extracto de antocianinas (EA). Esta concentración adicional también podría tener un efecto de estabilización, dado que cuando la concentración de antocianinas alcanza valores altos, se presentan fenómenos de autoasociación entre dos cationes flavilio, dos formas hemiacetal, dos bases quinoidales, e inclusive, entre una base quinoidal y un catión flavilio, protegiendo la molécula de antocianina (Garzón, 2008).

El proceso de obtención de EA fue el que se muestra en la Figura IV.31.



**Figura IV.31.** Obtención de un extracto de antocianinas de arándanos mediante extracción sólido-líquido y proceso doble de concentración.

Operando de esta manera, se obtuvo un extracto (EA) cuya concentración de antocianinas totales (apartado III.6.3.) fue de  $879.0 \pm 12.9$  mg cianidina-3-glucósido/100 mL, mientras que en la materia prima inicial lo fue de,  $92.1 \pm 2.8$  mg cianidina-3-glucósido/100 g de arándano (Tabla IV.23). Esto indica que con este proceso de doble concentración se obtuvo un extracto cuya concentración de antocianinas superó ampliamente la concentración de antocianinas presentes en arándano fresco y en los extractos ESL y EF, cuyas concentraciones de antocianinas fueron  $137.2 \pm 7.5$  y  $126.2 \pm 8.9$  mg/100 mL, respectivamente.

**Tabla IV.23.** Concentración de antocianinas totales y perfil de antocianinas individuales identificadas en bayas de arándanos y en el EA.

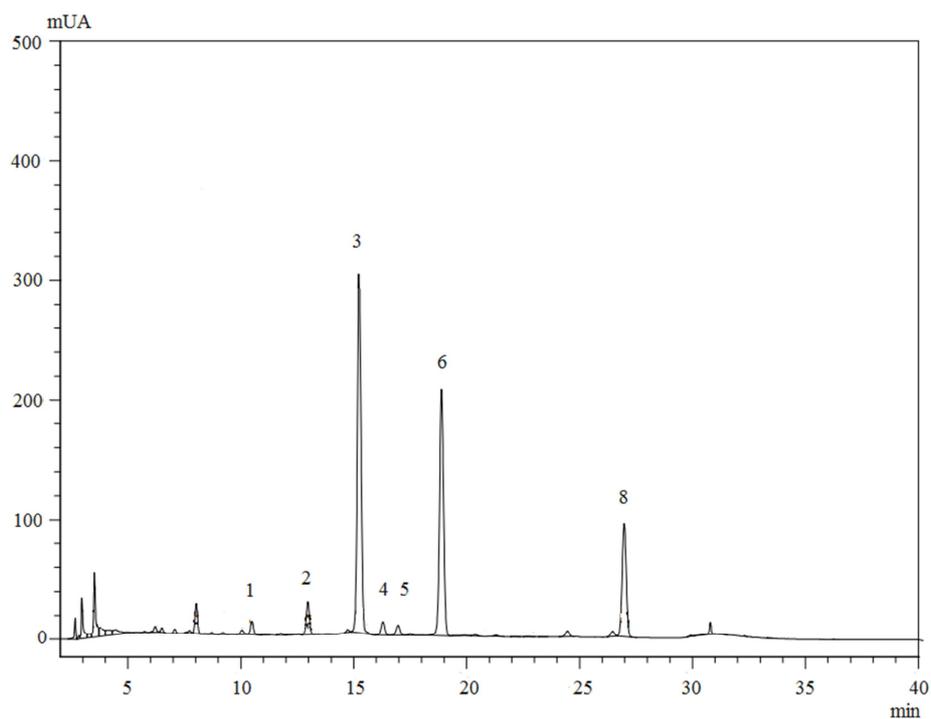
Antocianinas totales		Bayas	EA
		92.1±2.8 mg cianidina-3-glucósido/100 g arándanos)	879.0±12.9 (mg cianidina-3-glucósido/100 mL extracto)
Pico	Identificación	Porcentaje	
1	Delfinidina-3-galactósido	1.1	2.7
2	Delfinidina-3-glucósido	5.3	6.8
3	Cianidina-3-galactósido	43.2	22.0
4	Cianidina-3-glucósido	1.1	1.0
5	Cianidina-3-arabinósido	1.1	0.3
6	Peonidina-3-galactósido	29.5	21.0
7	Peonidina-3-arabinósido	No detectado	1.0
8	Malvinidina-3-glucósido	13.7	6.4

Mediante cromatografía, del total de antocianinas extraídas, se pudieron identificar las antocianinas que se muestran en la Tabla IV.23 y cuyos cromatogramas se ilustran en las Figuras IV.32 y IV.33. Se puede ver que las

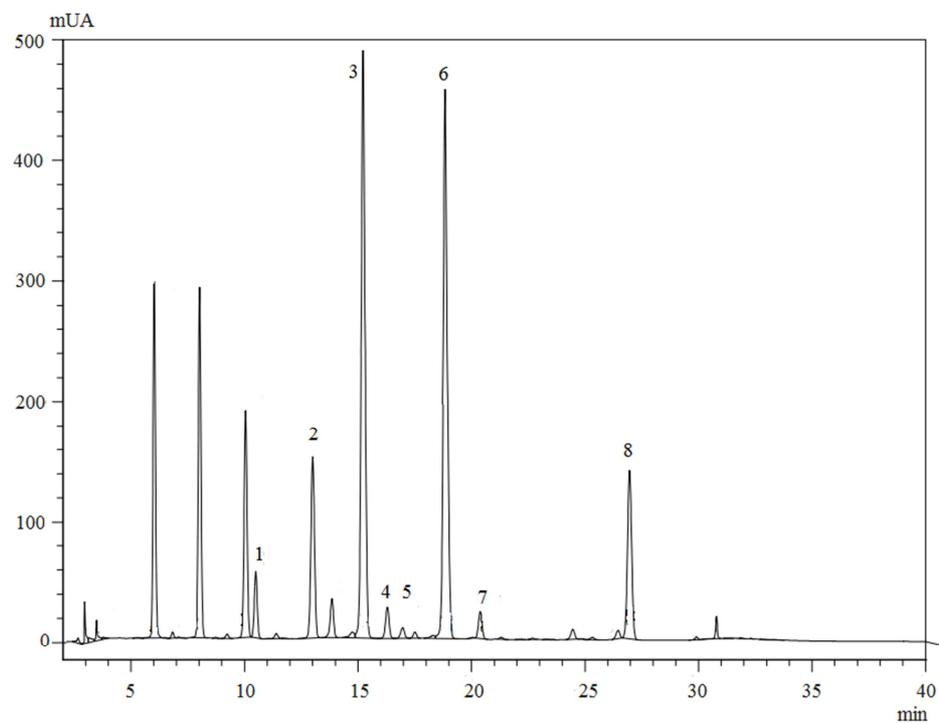
antocianinas predominantes fueron cianidina-3-galactósido, peonidina-3-galactósido y malvinidina-3-glucósido.

En la Figura IV.33 se observan 3 picos cuya intensidad de absorción fue significativa. Sin embargo, estos compuestos no pudieron identificarse dado que corresponden a compuestos con bajos tiempos de retención (5-10 min). Probablemente correspondan a alguna aglicona, como delphinidina sustituida en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos, los cuales incrementan su solubilidad (Garzón, 2008). Por lo tanto, esto hace que tengan mayor afinidad por la fase móvil y, en consecuencia, menor tiempo de retención.

Estos perfiles fueron bastante similares a los encontrados por You et al. (2011), quienes analizaron las antocianinas presentes en especies nativas de arándanos Rabbiteye (*Vaccinium virgatum*) de las variedades Powderblue y Climax, ambas del sudeste de EE.UU y provenientes de cultivo orgánico y convencional. Las antocianinas predominantes fueron cianidina-3-galactósido, malvinidina-3-galactósido, petunidina-3-glucósido, malvinidina-3-glucósido y peonidina-3-galactósido. La proporción de cada una de ellas dependió de la variedad y del tipo de cultivo.



**Figura IV.32.** Perfil de antocianinas en arándanos. La identificación de los picos se muestra en la Tabla IV.23.



**Figura IV.33.** Perfil de antocianinas en el EA. La identificación de los picos se muestra en la Tabla IV.23.

Al comparar la concentración de antocianinas totales, fenoles totales y actividad antioxidante de los ESL y EF con los publicados por otros autores se concluyó que estos extractos tenían una alta concentración de fitonutrientes. La segunda concentración del extracto ESL, extracto EA, no sólo aumentó la concentración de antocianinas totales presentes, sino que también se vio incrementado el contenido de fenoles totales,  $3503 \pm 108$  mg GAE/100 mL, y la actividad antioxidante que alcanzó valores de  $5730 \pm 103$  y  $4872 \pm 124$  mg EAA/100 mL, medidos por las metodologías ABTS y DPPH, respectivamente. En definitiva, esta segunda concentración aumentó notablemente el contenido de fitonutrientes.

### IV.8. Composición mineral

La complejación de las antocianinas con metales constituye una alternativa viable de estabilización del color, particularmente si los metales involucrados no implican un riesgo para la salud e incluso pueden representar una fuente de minerales esenciales en la dieta (Castañeda Ovando et al., 2009b).

Por ello, se analizó el contenido de algunos minerales tanto en las bayas de arándanos como en el EA siguiendo la metodología descrita en el apartado III.6.9. Concretamente se estudiaron: calcio, hierro, magnesio, potasio, sodio y zinc. Para cada uno de ellos se encontraron diferencias significativas entre las medias correspondientes al contenido en los arándanos frescos y en el EA. La concentración de calcio en el EA disminuyó un 35% respecto el contenido en las bayas, la del hierro, un 57% y la de magnesio, un 48%. Por el contrario, la concentración de potasio aumentó en un 73%, la de sodio en un 96% y la de zinc en un 150% (Tabla IV.24).

**Tabla IV.24.** Composición mineral del EA y de las bayas de arándanos.

Mineral	Bayas de arándanos	EA
Calcio (mg/100g)	5.90 ± 0.14	3.86 ± 0.11
Hierro (mg/100g)	0.67 ± 0.01	0.29 ± 0.00
Magnesio (mg/100g)	1.32 ± 0.02	0.69 ± 0.01
Potasio (mg/100g)	27.26 ± 0.72	47.25 ± 2.33
Sodio (mg/100g)	1.13 ± 0.03	2.22 ± 0.11
Zinc (mg/100g)	0.06 ± 0.00	0.15 ± 0.01

En la bibliografía, se encontró escasa información referida a la formación de complejos entre antocianinas y ciertos metales. Aparentemente, algunas antocianinas y ciertos cationes metálicos, como aluminio, hierro, estaño y cobre, a concentraciones de 10 mg/L, formarían estos complejos (Boulton, 2001). En el caso del hierro, la concentración en el EA fue menor, por lo que posiblemente éste no contribuya en la estabilización del extracto.

Castañeda Ovando et al. (2009b) corroboraron, para maíz criollo azul, la formación de los complejos metal-antocianina y estudiaron la estabilidad de estas últimas en presencia de dichos metales. Estos autores señalaron que la cianidina es capaz de complejarse con los metales que predominan en el pericarpio de maíz criollo azul, especialmente el calcio, debido a que es el que se encuentra en mayor concentración (1112.2 mg/kg peso seco). Teniendo en cuenta esta publicación, es probable que el calcio tampoco contribuya a la estabilización de las antocianinas presentes en el extracto.

Dado que la capacidad de complejación del potasio es mínima, el aumento de su concentración en el EA se desestima como posible agente estabilizador del color de las antocianinas (Castañeda Ovando et al., 2009b), aunque sí puede contribuir como fuente de mineral para la dieta.

La baja concentración de los minerales investigados en el EA haría suponer que estos no participan de forma significativa en la estabilidad de las antocianinas. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos, podría ser útil investigar en un futuro, la incorporación de algún mineral al EA que contribuya a su estabilización.

### **IV.9. Utilización de extracto de antocianina en la industria alimentaria**

La incorporación de antocianinas como colorante alimentario, además de mejorar la apariencia podría ser beneficiosa para la salud. Diversos estudios presentan evidencia científica que los extractos ricos en antocianinas pueden mejorar la agudeza visual, mostrar actividad antioxidante, atrapar radicales libres y actuar como agentes quimioprotectores. Las antocianinas también juegan un papel en las propiedades antidiabéticas tales como control de lípidos, secreción de insulina y efectos vasoprotectores (Shipp y Abdel-Aal, 2010). Tristan et al. (2005), realizaron bioensayos que demuestran que los arándanos inhiben las etapas de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis. Por lo tanto, las propiedades funcionales de las antocianinas abren una nueva perspectiva para la obtención de productos coloreados con valor agregado para el consumo humano (Aguilera Ortíz et al., 2011).

Con el propósito de evaluar la potencial aplicación del EA en la industria alimentaria, se impregnaron a vacío cubos de melón con el extracto según se describió en el apartado III.5. Los ensayos se realizaron a 3 presiones diferentes de vacío, con el propósito de evaluar el efecto de la presión reducida sobre la concentración de antocianinas totales (AT) en los melones impregnados.

La Tabla IV.25 muestra los valores promedios y las desviaciones estándares de las respuestas a la IV:  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma$  y  $\varepsilon$ , definidos en la metodología.

**Tabla IV.25.** Respuestas de la impregnación a vacío.

Respuestas impregnación	Presión de vacío (mbar)					
	210		130		53	
$X_1$ (%)	-1 ± 0	a	-2 ± 0	b	-3 ± 1	b
$\gamma_1$ (%)	-13 ± 2	a	-18 ± 2	b	-21 ± 3	b
$X_2$ (%)	14 ± 1	a	20 ± 1	b	29 ± 1	c
$\gamma_2$ (%)	24 ± 6	c	3 ± 1	a	6 ± 1	b
$X$ (%)	13 ± 1	a	18 ± 2	b	26 ± 3	c
$\gamma$ (%)	10 ± 2	b	-15 ± 2	a	-15 ± 3	a
$\epsilon_e$ (%)	17 ± 1	a	21 ± 1	b	27 ± 1	c

Letras diferentes en una misma fila indican que el análisis de varianza (ANOVA) señaló diferencias significativas entre las medias de las respuestas para un p-valor inferior a 0.05.

En la etapa de vacío (primera etapa del proceso de IV) se observó una importante disminución del volumen de los melones ( $\gamma_1$  negativo), siendo esta respuesta mayor a 130 y 53 mbar.

Los valores negativos de  $X_1$  estarían indicando una salida de líquido nativo desde los espacios intercelulares (Martelo Castaño et al., 2011) producidos durante la expansión del gas ocluido (Ostos et al., 2012). Sin embargo, esta transferencia de masa fue pequeña, siendo mayor a las presiones de 130 y 53 mbar.

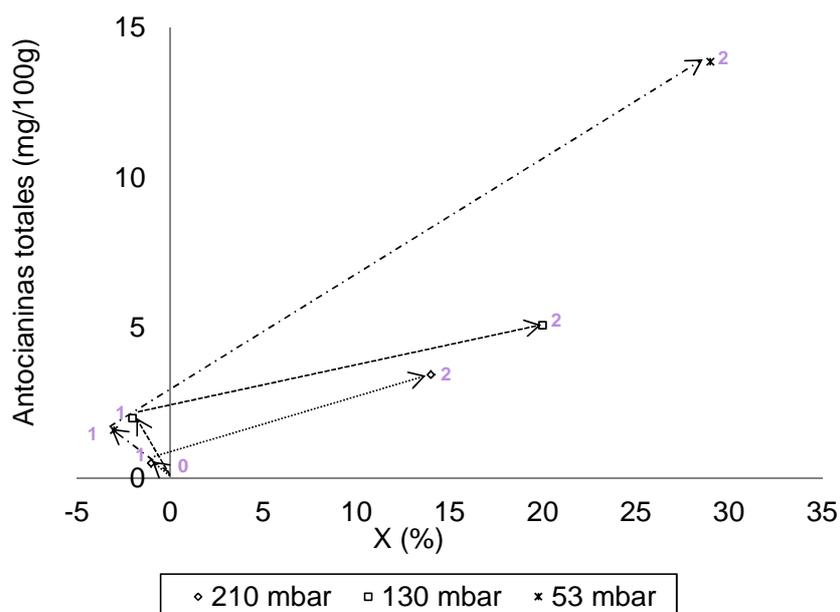
Durante la etapa a presión atmosférica (segunda etapa del proceso de IV) hubo un aumento del volumen de las muestras (valores positivos de  $\gamma_2$ ), por lo tanto el volumen de los poros se incrementó con respecto al valor inicial (Ostos et al., 2012). Durante esta etapa se observó una importante impregnación con el EA ( $X_2$ ), siendo mayor a medida que aumentó el vacío producido en la cámara de impregnación.

Referido al proceso global, se pueden observar en la tabla altos valores de  $X$ . Martelo Castaño et al (2011) estudiaron la incorporación de vitamina E emulsionada en el interior de la estructura porosa de apio y obtuvieron valores de  $X$  del orden del 10%, señalando que una matriz con esta fracción volumétrica de impregnación es muy favorable al proceso de IV. Por lo tanto, la impregnación de los cubos de melón fue muy satisfactoria, ya que  $X$  fue superior a los calculados por los autores mencionados. De los resultados, se desprende que la cantidad de líquido impregnado ( $X$ ) en los cubos de melón aumentó con el grado de desgasificación y a valores más bajos de presión de vacío (Sanzana Ramos, 2010).

La porosidad efectiva ( $\epsilon_e$ ) es la propiedad que determina la eficacia del proceso de IV, ya que evalúa el porcentaje en volumen de muestra accesible y/o generado por la IV (Sanzana Ramos, 2010). En el presente estudio, este parámetro estuvo comprendido entre 17 y 27% según la presión de trabajo, lo que permite la IV de melones con EA, especialmente a valores más bajos de presión de vacío. Fito et al (2001) recogieron información de distintos autores referida a la IV de frutas y vegetales con soluciones isotónicas. En concreto, para una presión de vacío de 50 mbar publicaron valores de  $\epsilon_e$  para melón *Inodorus* de  $6\pm 3\%$ , para manzana *Red Chief* de  $20.3\pm 0.4\%$  y para manzana *Golden* de  $17.4\pm 0.8\%$ . Los resultados publicados para melón fueron inferiores a los alcanzados en el presente trabajo, que estuvieron más próximos a los publicados para manzana.

El proceso de IV fue acompañado de un aumento de la densidad, que pasó de  $899 \text{ kg/m}^3$  del melón sin impregnar a valores de 941, 1278 y  $1370 \text{ kg/m}^3$  de melón impregnado, cuando las presiones de trabajo fueron 210, 130 y 53 mbar, respectivamente. Esto está de acuerdo con lo señalado por Martínez-Monzó et al. (2000), quienes señalaron que la propiedad física que es claramente afectada por la IV es la densidad del producto, ya que la salida de aire de los poros reemplazado por líquido, provoca un aumento en la densidad, debido a que el líquido de impregnación es más denso que el aire.

En la Figura IV.34 se ilustra la forma en que se fue modificando la concentración de antocianinas totales en los cubos de melón durante el proceso de IV para las 3 presiones de vacío estudiadas. El estado inicial está representado con el punto 0, el final del período de vacío con el punto 1 y el final de la etapa a presión atmosférica con el punto 2.

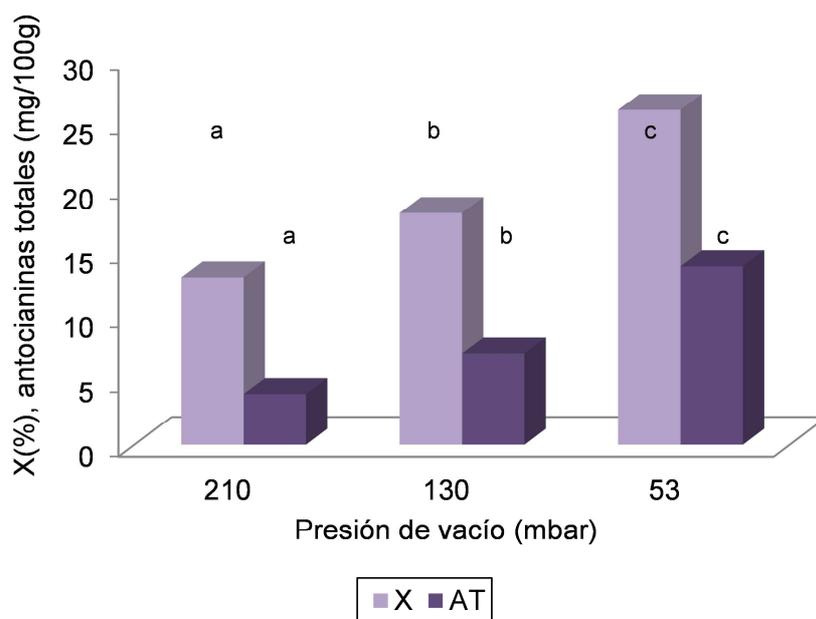


**Figura IV.34.** Relación entre impregnación y concentración de antocianinas totales en los cubos de melón impregnados con EA, al final de la etapa de vacío (0 → 1) y al final de la etapa a presión atmosférica (1 → 2).

En la primera etapa del proceso de IV (0 → 1) la concentración de antocianinas totales en los cubos de melón fue muy baja, debido a que en esta etapa no se produjo un ingreso significativo de EA en el producto. El hecho de que los valores de  $X_1$  medidos fueron ligeramente negativos indicaría la existencia de una pequeña salida de líquido nativo desde los cubos de melón, las antocianinas cuantificadas fueron debido a la presencia de estas en la superficie de los cubos de melón. Sin embargo, en la segunda etapa del mencionado proceso (1 → 2), hubo un aumento significativo en la

concentración de antocianinas totales, especialmente en las experiencias realizadas con mayor nivel de vacío (53 mbar). Esto se puede atribuir directamente al incremento de los valores de  $X_2$ , señalando el ingreso de EA a la matriz del producto.

Se mencionó anteriormente que los altos valores de  $X$  obtenidos aumentaron con el incremento del vacío existente en la cámara de impregnación en la primera etapa del proceso de IV. Además,  $X$  fue directamente proporcional a la concentración de antocianinas totales presentes en los cubos de melón impregnado (Figura IV.35). Esto es una muestra del uso potencial que tienen los EA en la industria alimentaria.



**Figura IV.35.** Impregnación y concentración de antocianinas totales (AT) para las diferentes presiones de trabajo de la primera etapa del proceso de IV. Letras diferentes en columnas del mismo color indican que el análisis de varianza (ANOVA) señaló diferencias significativas entre las medias de las respuestas para un p-valor inferior a 0.05.

La impregnación de cubos de melón con EA resultó mejor en las siguientes condiciones de operación:

- Etapa 1 o etapa de vacío o presión reducida:  $P = 53$  mbar,  $T = 25^{\circ}\text{C}$  y  $t_1 = 10$  min.
- Etapa 2 o etapa a presión atmosférica:  $P = 1049$  mbar,  $T = 25^{\circ}\text{C}$  y  $t_1 = 10$  min.

En la Figura IV.36 se muestra cubos de melón impregnados con el EA.



**Figura IV.36.** Cubos de melón impregnados con EA.

El proceso IV fue una técnica efectiva para la incorporación de antocianinas en el interior de la estructura porosa de los cubos de melón. El EA impartió a estos un color rojo atractivo distribuido uniformemente en todo el cubo de melón. El producto resultante tuvo una firmeza ligeramente menor que el melón sin impregnar. Además, el EA resaltó, en los cubos de melón, el sabor y aroma frutal. El producto obtenido no solamente resultó aceptable en sus características sensoriales, sino también en sus propiedades funcionales, ya que el alto contenido en antocianinas podría aportar cualidades beneficiosas para la salud como mejorar la agudeza visual y tener efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos, entre otros (Aguilera Ortiz et al., 2011).

De lo expuesto se considera que es viable tecnológicamente el desarrollo de alimentos funcionales frescos por incorporación de EA a la matriz de frutos, como melón, mediante la técnica de IV. Este producto podría consumirse solo o incorporado a otros preparados como ensaladas de frutas.

Dada la importancia del consumo de frutos en la dieta, la introducción de modificaciones en su composición al incorporar sustancias con propiedades antioxidantes, no solo que podrían potenciar los beneficios que los frutos proporcionan a la salud, sino que también permitiría diversificar la oferta de estos productos frescos, como así también captar la atención de potenciales consumidores. Con el propósito de aumentar su vida útil, futuros estudios podrían estar orientados a investigar la deshidratación de los cubos de melón impregnados con EA, tratando de preservar, en el mayor grado posible, las estructuras de las antocianinas.

---

## **V. CONCLUSIONES**

---

1. Todas las variables de proceso estudiadas (pH, temperatura, tiempo de extracción, tipo de solvente, proporción de materia prima / solvente) tuvieron una influencia significativa en la extracción sólido-líquido de antocianinas de arándanos. Así, el mayor rendimiento de extracción se obtuvo cuando se utilizó como solvente etanol acidificado con ácido cítrico al 1% en una proporción materia prima / solvente de 1:3 kg/kg, con una temperatura de extracción de  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  y un tiempo de extracción de 2 h.

2. Las variables de proceso estudiadas (pH y temperatura) también tuvieron influencia significativa en la extracción de antocianinas de arándanos por fermentación. El rendimiento más alto de extracción se consiguió cuando la fermentación con las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* se realizó en un sustrato con una concentración de sólidos solubles de 12° Brix, pH de 4.2, temperatura de fermentación de  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  y tiempo de fermentación, 72 h.

3. Los extractos obtenidos con las dos metodologías de extracción, sólido-líquido y fermentación, no presentaron diferencias en cuanto a la concentración de antocianinas totales. Sin embargo, la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante fueron mayores en el extracto obtenido por fermentación.

4. La degradación de las antocianinas presentes en los extractos obtenidos por extracción sólido-líquido y por fermentación se ajustaron adecuadamente a una cinética de primer orden. La cinética de degradación aumentó con la temperatura y el tiempo de calentamiento o de almacenamiento. Las antocianinas obtenidas por extracción sólido-líquido fueron más estables frente al calentamiento y al almacenamiento que las extraídas por fermentación.

5. La extracción sólido-líquido de antocianinas resultó ser más adecuada para extraer antocianinas de arándanos dado que fue más sencilla, requirió menor tiempo y se logró un mayor rendimiento en la extracción que la extracción por fermentación, además las antocianinas extraídas fueron más estables frente al calentamiento y al almacenamiento. El contenido de

antocianinas de estos extractos aumentó notablemente con la realización de una segunda concentración del extracto obtenido por esta metodología. Así, se obtuvo como producto final, un extracto de antocianinas con uso potencial en la industria alimentaria como colorante y antioxidante.

6. Referido al proceso de impregnación a vacío, en la etapa 1 o etapa de vacío se observó una importante disminución del volumen de los cubos de melón y se obtuvieron valores negativos de fracción volumétrica, señalando una salida de líquido nativo desde los espacios inter y extra celulares producidos durante la expansión del gas ocluido. En la etapa 2 o etapa a presión atmosférica hubo un aumento del volumen de las muestras, observándose una importante impregnación de los cubos de melón con el extracto de antocianinas. La cantidad de extracto de antocianinas impregnado y, por lo tanto, la concentración de antocianinas totales en los cubos de melón, fue mayor cuanto más elevado fue el vacío producido en la cámara de impregnación durante la primera etapa. La porosidad efectiva manifestó una alta eficacia del proceso de impregnación a vacío, especialmente a 53 mbar. Por lo tanto, se considera que es factible el desarrollo de alimentos funcionales frescos por incorporación de extracto de antocianinas a la matriz de frutos, como melón, mediante la técnica de impregnación a vacío.

7. Los resultados aportaron una base de conocimientos que en el futuro podrían dirigir nuevas líneas de investigación orientadas a aumentar la vida útil del extracto de antocianinas, encontrar nuevas aplicaciones vinculadas a la industria alimentaria, o bien, aumentar la vida útil de los productos frescos a los que se pudiera incorporar, tratando de preservar, en el mayor grado posible, las estructuras de las antocianinas.

---

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**

---

- Aguilera Ortíz M, Reza Vargas MC, Chew Madinaveitia RG, Meza Velázquez JA. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, XIII: 16-22.
- Al-Zubaidy MMI, Khalil RA. (2007). Kinetic and prediction studies of ascorbic acid degradation in normal and concentrate local lemon juice during storage. *Food Chemistry*, 1001: 254-259.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15th edition.
- Astiasarán AI, Las Heras AB, Ariño PAH, Martínez HJA. *Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 2003.
- Atkins PJ. *Química Física*. 8ª ed. Argentina: Médica Panamericana SA, 2008.
- Atkins PW, Jones L. *Principios de Química. Los caminos del descubrimiento*. 3ª ed. Argentina: Médica Panamericana SA, 2007.
- Atkins PW. *Química Física*. 6ª ed. Barcelona: Omega SA; 1999.
- Avery HE. *Cinética química básica y mecanismos de reacción*. España: Reverté SA, 2002.
- Badui Dergal S. *Química de los Alimentos*. 4ª ed. México: Pearson Educación, 2006.
- Bagchi D, Sen CK, Bagchi M, Atalay M. (2004). Antiangiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Mosc)*, 69: 75–80.
- Banik RM, Pandey DK. (2008). Optimizing conditions for oleanolic acid extraction from *Lantana camara* roots using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 27: 241–248.
- Baulis A, Spomer A, Berber-Jiménez M. (1994). Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *Journal of food science*. 59: 1219-1221.

- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76: 965–977.
- Bordignon CL Jr, Francescato V, Nienow AA, Calvete E, Reginatto FH. (2009). Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29: 183-188.
- Boulton R. (2001). The Copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52: 67-87.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 22: 25-30.
- Brazelton C. 2009. Situación y desafíos de la producción de arándanos en Uruguay. Dirección URL: [Consulta: 04 de May. 2012].
- Brennan JG, Butters JR, Cowell ND, Lilly AE. Las operaciones de la ingeniería de los alimentos. 2ª ed., Zaragoza: Acribia, 1980.
- Bridgers EN, Chinn MS, Truong VD. (2010). Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Industrial Crops and Products*, 32: 613–620.
- Brown TE, LeMay HE, Bursten BE, Burdige JE. Química. La ciencia central. 9ª ed. México: Ed Pearson, 2004.
- Buckow R, Kastell A, Shiferaw, Terefe NS, Versteeg C. (2010). Pressure and temperature effects on degradation kinetics and storage stability of total anthocyanins in blueberry juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 10076-10084.

- Cacace JE, Mazza G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, 68: 240-248.
- Casp, A, Abril, J. Procesos de conservación de alimentos. Madrid: Mundiprensa, 1999.
- Castañeda Ovando A, Galán Vidal CA, Pacheco Hernández M de L, Rodríguez JA, Páez Hernández ME. (2009b). Evaluación del contenido de metales y su efecto en la estabilidad de antocianinas. *Journal of Food*, 7: 225–232.
- Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández ML, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. (2009a). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113: 859–871.
- Cisse M, Vaillant F, Acosta O, Dhuique-Mayer C, Dornier M. (2009). Thermal degradation kinetics of anthocyanins from blood orange, blackberry, and roselle using the Arrhenius, Eyring and Ball Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 6285–6291.
- Código Alimentario Argentino, Ley 18248. 2012.
- Connor AM, Luby JJ, Hancock JF, Berkheimer S, Hanson EJ. (2002). Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 893-898.
- Consejo Federal De Ciencia Y Tecnología. “Debilidades y desafíos tecnológicos del sector productivo. Frutas finas (Arándanos, cereza, frambuesa y Frutilla)”, [en línea]. Argentina: 2007. Dirección URL: [Consulta: 04 de Dic. 2007].

- Cortés MR, García AS, Suárez HM. (2007). Fortificación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) con calcio, selenio y vitamina C. VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 14: 16-24.
- De Anda Cárdenas Pascal. Química 1. México: Umbral, 2006.
- Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, betalains-characteristics, biosynthesis, processing and stability. Food Science and Nutrition, 40:173-289.
- Devi SP, Saravanakumar M, Mohandas S. (2012). The effects of temperature and pH on stability of anthocyanins from red sorghum (*Sorghum bicolor*) bran. African Journal of Food Science, 6: 567-573.
- Divo de Sesar M, Pepe F, Massara D, Kaen R, Lopez V, Stella A, Vilella F. Variación en el contenido de polifenoles y antocianinas en frutos de los géneros *Vaccinium* y *rubís* asociada a diversos factores condicionantes. En: 4° Simposio Internacional y 2° Congreso Latinoamericano de Arándanos y Berries. Argentina: Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires; 2008. 153-165.
- Engel T, Reid P. Introducción a la Fisicoquímica. 1ª ed. México: Pearson Educación, 2007.
- Ersus S, Yurdagel U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota* L.) by spray drier. Journal of Food Engineering, 80: 805-812.
- Fan G, Han Y, Gu Z, Che D. (2008a). Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM), LWT - Food Science and Technology 41:155–160.
- Fan G, Han Y, Gu Z, Gu F. (2008b). Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture. LWT - Food Science and Technology 41:1412–1416.

- Fanjul ML, Hiriart M. Biología funcional de los animales. España: Siglo XXI; 2008.
- Faria A, Oliviera J, Neves P, Gameiro P, Santos-Buelga C, De Freitas V, Mateus N. (2005). Antioxidant Properties of Prepared Blueberry (*Vaccinium myrtillus*) Extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 6896-6902.
- Farid MM. Mathematical Modeling of Food Processing. EE.UU.: CRC Press; 2010.
- Fennema OR. Química de los Alimentos, 2ª ed. Zaragoza: Acribia SA, 2000.
- Ferreira Ozela E, Stringheta C, Cano Chauca M. (2007). Stability of anthocyanin in spinach vine (*Basella rubra*) fruits. Ciencia e Investigación Agraria, 34: 115-120.
- Fito P, Andrés A, Chiralt A, Prado P. (1996). Coupling of hydrodynamic mechanism and deformation relaxation phenomena during vacuum treatments in solid porous food-liquid systems. Journal of Food Engineering, 27: 229-240.
- Fito P, Chiralt A, Betoret N, Gras M, Cháfer M, Martínez-Monzó J, Andrés A, Vidal D. (2001). Vacuum impregnation and osmotic dehydration in matrix engineering application in functional fresh food development. Journal of Food Engineering, 49: 175-183.
- Fito, P. (1994). Modelling of vacuum osmotic dehydration of food. Journal of Food Engineering, 22: 313-328.
- Francis FJ, Markakis PC. (1989). Food colorants: anthocyanins. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 28: 273-314.
- Garzón GA, Wrolstad RE. (2002). Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate. Journal of Food Science, 67: 1288-1299.

- Garzón, GA. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13: 27–36.
- Geankopolis CJ. *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. 3ª ed. México: CECSA, 1999.
- Gil A. *Tratado de nutrición*, 2ª ed. Madrid: Médica Panamericana, 2010.
- Giusti MM, Wrolstad RE. Unit F1.2:1-13. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Wrolstad. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: Wiley, 2001.
- Gorriti Gutierrez A, Arroyo Acevedo J, Negron Ballarte L, Jurado Teixeira B, Purizaca Llajaruna H, Santiago Aquise I, Taype Espinoza E, Quispe Jacobo F. (2009a). Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de las corontas del maíz morado (*Zea mays L.*): Método de extracción. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8: 509–518.
- Gorriti Gutierrez A, Fredy Quispe J, Jorge L, Arroyo A, Augusta Córdova R, Bertha Jurado T, Ilario Santiago A, Evelyng Taype E. (2009b). Extracción de antocianinas de las corontas de *Zea mays L.* “Maíz morado”. *Ciencia e Investigación*, 12: 64-74.
- Gradinaru G, Biliaderisb CG, Kallithrakac S, Kefalasa P, Garcia-Viguera C. (2003). Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa L.* anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry*, 83: 423–436.
- Gutiérrez Pulido H, Vara Salazar H. *Análisis y diseño de experimentos*. 2ª ed. México: McGraw-Hill, 2008.
- Hironaka K, Kikuchi M, Koaze H, Sato T, Kojima M, Yamamoto K, Yasuda K, Mori M, Tsuda S. (2011). Ascorbic acid enrichment of whole potato tuber by vacuum-impregnation. *Food Chemistry*, 127: 1114-1118.

- Hutchings JH. Food Color and Appearance. 2<sup>a</sup> ed. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers, 1999.
- Ibarz A, Barbosa-Cánovas GV. Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos. España: Mundi, 2005.
- Ibarz Ribas A, Barbosa Cánovas GV, Garza Garza S, Gimeno Añó V. Métodos experimentales en la ingeniería alimentaria. España: Acribia SA, 2000.
- Jagannadham V. (2009). The change in entropy of activation due to solvation/hydration of ions: proton versus carbocation - a one hour graduate classroom lecture. Chemistry, 18, 4: 89-93.
- Jay JM. Microbiología moderna de los alimentos. España: ACRIBIA SA; 1994.
- Jenshi Roobha J, Saravanakumar M, Aravindhan KM, Suganya devi P. (2011). The effect of light, temperature, pH on stability of anthocyanin pigments in *Musa acuminata* bract. Research in Plant Biology, 1: 05-12.
- Jie L, Xiao-ding L, Yun Z, Zheng-dong Z, Zhi-ya Q, Meng K, Shao-hua Z, Shuo L, Meng W, Lu Q. (2012). Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices. Food Chemistry, 136:1429–1434
- Kader AA. Postharvest technology of horticultural crops, 3<sup>a</sup> ed. California: Universidad de California, 2002.
- Kalt K, Lawand C, Ryan DAJ., Mcdonald JE, Donner H, Forney CF. (2003). Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L) during ripening and storage. Journal of the American Society for Horticultural Science, 128: 917-923.
- Kay CD, Mazza G, Holub BJ, Wang J. (2004). Anthocyanin metabolites in human urine and serum. British Journal of Nutrition, 91: 933–942.

- Konczack I, Zhang W. (2004). Anthocyanins-more than nature's colours. *Journal Biomedical and Biotechnology*, 5: 239-240.
- Kong JM, Chiam LS, Goh NK, Chia RF, Brouillard C. (2003). Análisis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64: 923-933.
- Kopjar M, Bilić B, Piližota V. (2011). Influence of different extracts addition on total phenols, anthocyanin content and antioxidant activity of blackberry juice during storage. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 3: 9-15.
- Kopjar M, Piližota V. (2009). Copigmentation effect of phenolic compounds on red currant juice anthocyanins during storage. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 1: 16-20.
- Kotz JC, Treichel PM, Weaver GC. *Química y reactividad química*. 6<sup>a</sup> ed. Cengage Learning / Thomson Internacional, 2005.
- Kousuke K, Hiroaki O, Kinnosuke K, Teruyo M. (1990). Production of reddish purple pigment. Japanese patent, 2-298558, 1990. En: Fan G, Han Y, Gu Z, Gu F. (2008b). Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture. *LWT - Food Science and Technology* 41: 1412–1416.
- Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25: 726-732.
- Laleh GH, Frydoonfar H, Heidary R, Jameel R, Zare S. (2006). The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5: 90-92.
- Larrocca AH. (2010). Desarrollo de una bebida isotónica utilizando jugo de arándanos. En: Arándanos, *Avances Científicos-Tecnológicos en la*

- región de Salto Grande”. Facultad de Ciencias de la Alimentación - Universidad Nacional de Entre Ríos. Compilación: Vuarant Carlos Omar.
- Leguizamón G, González León A, Báez Sañudo R. (2005). Antocianinas en uva (*Vitis vinifera* L.) y su relación con el color. *Revista Fitotecnia*, 28: 359-368.
- Lewis C, Walker J. (1995). Effect of polysaccharide son the colour of anthocyanins. *Food Chemistry*, 54: 315-319.
- López-Alarcón C, Denicolab A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763: 1-10.
- Martelo Castaño YJ, Cortes Rodriguez M, Suarez Mahecha H. (2011). Desarrollo de apio mínimamente procesado fortificado con vitamina E, utilizando la ingeniería de matrices. *Dyna*, 165: 28-39.
- Martínez JJ, Rojas HA, Borda G, Hastamorir AN, Medina MF. (2011). Estabilidad de antocianinas en jugo y concentrado de agraz (*Vaccinium meridionale* Sw.). En: *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64: 6015-6022.
- Martínez Márquez JE. *Química I*. México: Thomson, 2009.
- Martínez-Monzó J, Barat JM, González-Martínez A, Chiralt A., Fito P. (2000) Changes in thermal properties of apple due to vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, 43: 213-218.
- Mazza G. (1995). Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 35: 341-371.
- Melgarejo Moreno P. *Tratado de fruticultura para zonas áridas y semiáridas*. Madrid: Mundi Prensa, 2000.

- Melo V, Cuamatzi O. Bioquímica de los procesos metabólicos. Mexico: Reverté Ediciones S.A., 2006.
- Meyers J., Watkins C.B. Pritts M.P., & Liu R.H. (2003). Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6887–6892.
- Miller NJ, Rice-Evans CA. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, 60: 331-337.
- Min-Sheng S, Po-Jung Ch. (2007). Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chemistry* 104: 182–187.
- Miranda WVF. (2005). Extracción, cuantificación y estabilidad de colorantes naturales presentes en los frutos de *Prunus capuli Cav.* (Cereza), *Rubus urticaefolius Poir.* (Mora) y *Sambucus canadensis L.* (Saúco) como alternativas naturales de consumo de los colorantes artificiales rojo No.40, rojo No.3 y rojo No.2, en bebidas en el rango de pH: 3, 4 y 5 [tesis], Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Moldovan B, David L, Chişbora C, Cimpoiu C. (2012). Degradation kinetics of anthocyanins from european cranberrybush (*Viburnum opulus L.*) fruit extracts. Effects of temperature, pH and storage solvent. *Molecules* 2012, 17: 11655-11666.
- Morais H, Ramos C, Forgacs E, Cserhdti T, Matos N, Almeida V., Oliveira J (2002). Stability of anthocyanins extracted from grape skins. *Chromatographia*, 56: 173-175.
- Nayak B, Berrios JJ, Powers JR, Tang J. (2011). Thermal degradation of anthocyanins from purple potato (*Cv. Purple Majesty*) and impact on antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 11040–11049.

- Nunes, MCN. Color atlas of quality of fruits and vegetables, 2<sup>a</sup> ed. USA: Blackwell Publishing, 2008.
- Oliveira FAR, Oliveira JC. Processing foods. Quality optimization and process assessment, 1<sup>a</sup> ed. USA: CRS Press, 1999.
- Ostos SL, Díaz AC, Suárez HM. (2012). Evaluación de diferentes condiciones de proceso en la fortificación de mango (Tommy Atkins) con calcio mediante impregnación a vacío. *Revista Chilena de Nutrición*, 39: 181-190.
- Pereira Kechinski C, Ramos Guimaraes PV, Zapata Noreña CP, Tessaro IC, Ferreira Marczak LD. (2010). Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment. *Food Science*, 75: 173-176.
- Pérez Cabrera LE. (2003). Aplicación de métodos combinados para el control del desarrollo del pardeamiento enzimático en pera (variedad *Blanquilla*) mínimamente procesada. Tesis doctoral Universidad Politécnica de Valencia.
- Pitt JI, Hocking AD. Fungi and food spoilage, 3a ed. London Nueva York: Springer, 2009.
- Prado-Lobato SC, Hernández-Castillo M, Mogica-del Ángel M, Moreno-Miranda M, Preciado-Márquez F. (2012). Incidencia de hipersensibilidad a colorantes artificiales de los alimentos en un grupo de estudiantes de medicina. *Pediatría de México*, 14: 172-175.
- Pretorius IS. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16: 675–729.
- Prior RL, Cao G, Martín A, Sofic E, Mcewen J, O'Brien C, Lishner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G, Mainland CM. (1998). "Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and

- variety of *Vaccinium* species". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 2686-2693.
- Pritts M, Hancock JF. Blueberry growth and development. En: Highbush Blueberry Production Guide. New York: NRAES, 1992
- Ramirez-Tortosa C, Andersen OM, Gardner PT, Morrice PC, Wood SG, Duthie SJ, Collins AR, Duthie GG. (2001). Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats. Free Radical Biology & Medicine, 31: 1033-1037.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26: 1231-1237.
- Rein M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Academic dissertation. University of Helsinki. Department of Applied Chemistry and Microbiology Food Chemistry Division.
- Resolución SAGPyA N° 201/2007. Protocolo de Calidad Para Arándanos Frescos. 23-08-2007.
- Restrepo AM, Cortés M, Rojano B. (2009). Determinación de la vida útil de fresa (*Fragaria ananassa Duch.*) fortificada con vitamina E. Dyna, 76: 163-175.
- Restrepo Duque AM, Arredondo Velasquez A, Morales C, Tamayo Mesa M, Benavides Paz YL, Bedoya Mejía B, Vélez Argumedo C. (2012). Aplicación de la técnica de impregnación a vacío en el desarrollo de cáscaras de naranja mínimamente procesadas fortificadas con potasio, sodio, y vitaminas B1, B6 y B9. Journal of Engineering and Technology, 1: 1-18.
- Restrepo Gallego M. (2007). Sustitución de colorantes en alimentos. Revista Lasallista de Investigación, 4: 35-39.

- Reyes FL, Cisneros-Zevallos L. (2007). Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chemistry*, 100: 885–894.
- Riva R. (2007). Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. *Current science*, 92: 916-925.
- Rodriguez L, Wolstrad R. (2001). Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. F1.1.1.
- Ross JA, Kasum CM. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*. 22: 19-34.
- Salvatori D, Andrés A, Chiralt A, Fito P. (1998) The response of some properties of fruits to vacuum impregnation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 21: 59-73.
- Sánchez-Moreno C. (2002). Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. *Alimentaria.*, ene-feb: 29-40.
- Sanzana Ramos SX. (2010). Viabilidad del desarrollo de alimentos funcionales frescos por incorporación de aloe vera a la matriz estructural de endibia (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum*), brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), coliflor (*rassica oleracea* var. *botrytis*) y zanahoria (*Daucus carota* L.) mediante la técnica de impregnación a vacío. Tesis doctoral Universidad Politécnica de Valencia.
- Sapers G, Burgher A, Phillips J, Jones S. (1984). Color and composition of highbush blueberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109: 105-111.
- Sari P, Wijaya CW, Sajuthi D, Supratman U. (2012). Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins. *Food Chemistry*, 132: 1908–1914.

- Saura-Calixto F. (1998). Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potencial food ingredient. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (ACS Publications), 46: 4303–4306.
- Sayyar S, Abidin ZZ, Yunus R, Muhammad A. (2009). Extraction of oil from jatropha Sseds-Optimization and kinetics. *American Journal of Applied Sciences*, 6: 1390-1395.
- Shimadzu Corporation. Atomic absorption spectrophotometry cookbook, 1999.
- Shipp J, Abdel-Aal SM. (2010). Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *The Open Food Science Journal*, 4: 7-22.
- Silva EM, Rogez H. Larondelle Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55: 381–387.
- Siva R. (2007). Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. *Current Science*, 92: 916-925.
- Standard Methods for the examination of water and wastewater. (1999).
- Suárez Lepe JA, Íñigo Leal B. *Microbiología enológica. Fundamentos de la Vinificación*. 3ª ed. Ed. España: Aedos SA, 2004.
- Sykes P. *Investigación de mecanismos de reacción en química orgánica*. España: Reverté S.A., 1982.
- Torres B, Tiwari BK, Patras A, Cullen PJ, Brnton N, Donnell CP. (2011). Stability of anthocyanins and ascorbic acid of high pressure processed blood orange juice during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12: 93-97.

- Tristan F, Kraft B, Schmidt Bm, Yousef GG, Knigh CTG, Cuendet M. (2005). Chemopreventive potential of wild lowbush blueberry fruits in multiple stages of carcinogenesis. *Journal of Food Science*, 70: 159-S166.
- Türkyılmaz M, Özkan M. (2012). Kinetics of anthocyanin degradation and polymeric color formation in black carrot juice concentrates during storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 47: 2273–2281.
- Ullauri PG. Transporte de masa en extracción fase sólido – líquido. Quito: ReCiTeIA, 2010.
- Vargas-Simón G, Soto-Hernández RM, Rodríguez-González MT. (2002). Análisis preliminar de antocianinas en frutos de icaco (*Chrysobalanus icaco* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25:261-264.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas R, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73: 117-124.
- Vuarant CO, Lesa C, Zapata LM, Montti MT, Paz JM, Carbonell JV. (2010). Estudios de parámetros de calidad en pasas de arándanos en un proceso de deshidratado por infrarrojos. En: Arándanos, Avances Científicos-Tecnológicos en la región de Salto Grande”. Facultad de Ciencias de la Alimentación - Universidad Nacional de Entre Ríos. Compilación: Vuarant Carlos Omar.
- Wagner GJ. Cellular and subcellular location in plant metabolism. En: Creasy L, Hrazdina G (editors). *Recent advances in Phytochemistry*. New York: Plenum Press; 1982.
- Wang H, Cao G, Prior RL. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 304-309.

- Wang J, Mazza G. (2002). Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 850-857.
- Wang SY, Jiao H. (2000). Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5677-5684.
- Wang SY, Lin HS. (2000). Antioxidant activity in fruit and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry is affected by cultivar and maturity. *J Agric Food Chem.*; 48:140-146. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 140-146.
- Wang WD, Xu SY. (2007). Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*. 82: 271-275.
- Wrolstad RE, Durst RW, Lee J. (2005). Tracking colour and pigment changes in anthocyanins products. *Food Science & Technology* 16: 423–428.
- Wrolstad RE. Anthocyanins. In: Lauro GJ, Francis FJ, editors. *Natural Food Colorants*. New York, N.Y.: Marcel Dekker, Inc.; 2000.
- Wrolstad RE. Color and pigment analyses in fruit products. agricultural experiment station, Oregon State University, Station Bulletin 624, 1993.
- Yean-Yean S, Barlow PJ. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit sedes. *Food Chemistry*, 88: 411-417.
- You Q, Wang B, Chen F, Huang Z, Wang X, Luo pG. (2011). Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. *Food Chemistry*, 125: 201-108.
- Youngson R. ¿Qué son los radicales libres? En: *Antioxidantes y radicales libres*. Madrid: Acribia, 2004.

Zapata LM, Quinteros CF, Malleret AD, Vuarant CO, Rivadeneira JA, Gerard JA. (2010). Estudio de la capacidad antioxidante de especies de arándanos cultivadas en la región de salto grande. En: Arándanos, Avances Científicos-Tecnológicos en la región de Salto Grande". Facultad de Ciencias de la Alimentación - Universidad Nacional de Entre Ríos. Compilación: Vuarant Carlos Omar.