

Desarrollo de un aditivo colorante natural a base de cianidina obtenido a partir de frutos de *Arbutus unedo* L.: optimización de la extracción y estudio de su aplicación en gofres.

Cecilia Jiménez López

Revisión bibliográfica presentada al Instituto Politécnico de Bragança y a la Universidad de Salamanca para la obtención del Grado de Máster en Farmacia y Química de Productos Naturales

Orientado por:

Profesora Doctora Isabel C. F. R. Ferreira

Doctora Lillian Barros

Bragança

2017

Este trabalho é financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto NORTE-01-0145-FEDER-023289 (DeCodE) e Norte-01-0247-FEDER-024479 (projeto *Mobilizador* ValorNatural), e pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal, no âmbito do projeto 0377_Iberphenol_6_E.



AGRADECIMIENTOS

“Gracias a la vida, que me ha dado tanto...” Como la canción pregona, así me siento hoy al reflexionar sobre aquellas personas a quienes debo agradecimiento.

En primer lugar, he de agradecer a la profesora Isabel Ferreira, por su profesionalidad y a la vez su entrega, porque, aunque muchas veces no lo veamos, siempre está detrás supervisando, dirigiendo e intentando mejorar el ambiente de trabajo. Muchas gracias por todo lo que saca adelante, haciendo posible este, y muchos más proyectos.

Poco después, al llegar a Portugal, conocí a la doctora Lillian Barros, la primera persona que se sentó a mi lado a intentar que me ubicara en el nuevo país, la que ha estado preocupándose y apostando por mí en todo momento, sin ella, nada habría sido lo mismo. Muchas gracias por esa confianza y cercanía de principio a fin, así como por no perder la simpatía aun teniendo una de las agendas más concurridas que he visto nunca, la tendré como referencia en mi futura vida laboral.

También me gustaría agradecerle al profesor Pablo García su simpatía e implicación con los alumnos, cualidades que me animaron a inscribirme en el Máster.

Y cómo no estar agradecida a Cristina Caleja, que desde el día que nos asignaron como tutora-pupila, respectivamente, se comportó como mi segunda madre portuguesa, procurando siempre facilitar mi trabajo y que me sintiera acogida. Me habría gustado seguir trabajando contigo día a día, como al principio, ya que no me olvido de ese cariño y apoyo, muchas gracias chefinha.

Quisiera también agradecer a la doctora Eliana Pereira, que, aún sin conocerme y gratuitamente, dejó de lado su trabajo durante un rato para ayudarme a formalizar todo el papeleo administrativo que tenía pendiente, por eso y por preocuparte por Cristina y por Cata, muchas gracias, todavía te debo un café.

Por supuesto, no puedo dejar atrás al profesor Miguel Ángel Prieto, quien llegó inesperadamente, pero pisando fuerte con su sinceridad de expresión, y fue implicándose paulatinamente en este trabajo, incluso más de lo que le correspondía. A pesar de no tener en común más que la nacionalidad, hemos acabado por crear un vínculo de confianza, profesionalidad y complicidad de los que rara, pero gratificadamente se logra con un profesor. Muchas gracias por todos esos consejos, por las charlas y por el tiempo dedicado. Lo he escuchado y considerado más de lo que cree.

Agradecimientos

Y al grupo de trabajo completo, cada uno aportando su granito de arena para hacer del Centro de Investigación un lugar más agradable y eficiente. Incluso la señora de las fotocopias me inspira gratitud por sus sonrisas matutinas y su constante amabilidad. Gracias, a la Universidad de la Salamanca y al Instituto Politécnico de Bragança por las oportunidades que ofrecen, y enhorabuena por el gran equipo que forman.

A mis compañeros de clase, todos diferentes, cada uno con sus peculiaridades, me han mostrado una perspectiva nueva desde la que mirar la vida, gracias porque en la diversidad está la riqueza. En especial, quisiera agradecer a Ingrid Rita por sus inagotables ganas de agradar, por su dulzura, por ese cariño, casi maternal, con el que se preocupa por el bienestar de los demás, siempre recordaré lo buena anfitriona y amiga que eres, y todo lo que me has ayudado. Y, como no, a Catarina Lopes, mi compañera de clase, de casa, de aventuras. La que lleva todo el año enseñándome, animándome y soportándome; siempre intentando responder mis constantes preguntas lo mejor posible. Ella dice que tiene que ejercitar la paciencia, pero lo que tiene es que estimarse más, eres una persona muy especial. Muchas gracias a ambas por todos los momentos de risas y por todo lo que habéis hecho por mí, espero que esta amistad que hemos forjado perdure para siempre, porque sois un motivo más para sonreír.

Y, por último, pero no menos importante, a mi familia. Tantas veces me dijeron mis padres: “ya lo entenderás”, “te lo decimos por tu bien” o el famoso “algún día nos lo agradecerás”. Pues bien, ese día ha llegado, sin vuestras enseñanzas y al mismo tiempo, la libertad necesaria para aprender sola; vuestra entrega pero también exigencias, y sobretodo vuestro amor desmesurado pero con las riñas necesarias, no habría llegado a donde hoy me encuentro, a lo que soy. Me llena de orgullo teneros como guías del camino de la vida; y, ya que lo he entendido, siempre os estaré agradecida. Y del mismo modo, se lo estaré a mi pequeña pero gran hermana, desde que llegó a mi lado me anima y empuja a crecer con y para ella.

No puedo dejar de mencionar a mi abuelo, una de las personas más sabias que he conocido, siempre con alguna pregunta preparada para hacerme pensar, para que me cuestione las cosas, para despertar mis ganas de investigar. Gracias querido abuelo, eres un ejemplo a seguir. En general, gracias a toda mi familia y amigos, ¡qué afortunada soy de tener a tantísimas buenas personas alrededor, o protegiendo desde arriba!

Y, por supuesto, gracias a Dios, por crear las antocianinas para dar color a este mundo.



ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Uso de colorantes en la industria alimentaria	1
1.2. Ventajas de los colorantes naturales frente a los colorantes sintéticos	5
1.3. Antocianinas y sus fuentes naturales	9
1.4. Estabilidad de antocianinas en las diferentes técnicas de extracción	12
1.5. <i>Arbutus unedo</i> L.	16
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS	22
3.1. Muestras	22
3.2. Patrones y reactivos	22
3.3. Optimización y comparación de técnicas extractivas (EAC y EAU) para obtener antocianinas a partir de frutos de <i>Arbutus unedo</i> L.	23
3.3.1. Técnicas extractivas	23
3.3.1.1. Extracción asistida por calor (EAC).....	23
3.3.1.2. Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)	23
3.3.2. Identificación y cuantificación de antocianinas	23
3.3.2.1. Pretratamiento de las muestras obtenidas del proceso de optimización	23
3.3.2.2. Análisis mediante HPLC-DAD-ESI/MS	24
3.3.3. Análisis de la respuesta y formato de los valores de respuesta para la presentación de resultados	25
3.3.3.1. Valores de respuesta para la presentación de resultados	25
3.3.4. Diseño experimental, modelo de análisis y evaluación estadística	25
3.3.4.1. Diseño experimental.....	25



3.3.4.2. Modelo matemático.....	26
3.3.4.3. Procedimiento para optimizar las variables a su máxima respuesta.....	26
3.3.5. Análisis dosis-respuesta de la relación sólido/líquido.....	26
3.4. Producción de un extracto rico en antocianinas a partir de frutos de <i>Arbutus unedo</i> L. siguiendo las condiciones óptimas, para estudiarlo como colorante natural en escala preindustrial.....	27
3.5. Determinación de las propiedades bioactivas y toxicidad del extracto producido ..	28
3.5.1. Bioactividades.....	28
3.5.1.1. Evaluación de la actividad antioxidante.....	28
3.5.1.2. Poder reductor (PR).....	28
3.5.1.3. Inhibición de la decoloración de β -caroteno.....	29
3.5.1.4. Inhibición de la peroxidación lipídica utilizando sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	29
3.5.1.5. Evaluación de la citotoxicidad.....	30
3.5.1.6. Evaluación de la hepatotoxicidad.....	30
3.5.1.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	31
3.5.2. Evaluación de la respuesta y análisis estadísticos.....	32
3.6. Estabilidad en sistemas de solución acuosa, que simulan matrices alimentarias, del extracto producido rico en antocianinas.....	33
3.6.1. Variables utilizadas para el procedimiento de estabilidad.....	33
3.6.2. Procesamiento de los extractos, análisis de las respuestas y formato de los valores de respuesta para la presentación de resultados.....	34
3.6.2.1. Extractos y análisis de las respuestas.....	34
3.6.2.2. Valores de respuesta para la presentación de resultados.....	34
3.6.3. Evaluación de las respuestas y análisis.....	34
3.6.3.1. Modelo individual para el análisis de los efectos de la estabilidad.....	34
3.6.3.2. Análisis multivariable.....	35
3.7. Incorporación del extracto rico en antocianinas producido como aditivo colorante natural en gofres, y evaluación de los parámetros del color, composición nutricional y actividad antioxidante de las muestras a lo largo del tiempo.	36
3.7.1. Preparación de los gofres.....	36
3.7.2. Evaluación de la evolución del color y del pH de las muestras de gofres a lo largo del tiempo.....	36
3.7.3. Evaluación de la composición nutricional y de la actividad antioxidante de las diferentes muestras a lo largo del tiempo.....	37
3.8. Métodos numéricos, análisis estadístico e ilustraciones gráficas.....	39



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1. Optimización y comparación de las técnicas extractivas (extracción asistida por calor y extracción asistida por ultrasonidos) para obtener antocianinas a partir de frutos de <i>Arbutus unedo</i> L.	41
4.1.1. Experimentos preliminares para seleccionar las variables relevantes y los parámetros instrumentales, y centrar, así, sus dominios experimentales antes de aplicar el RSM	41
4.1.1.1. Selección de las técnicas para el análisis comparativo.....	41
4.1.1.2. Solvente más apropiado para la extracción de antocianinas	42
4.1.1.3. Principales condiciones de las variables que afectan a las técnicas seleccionadas.....	44
4.1.2. Análisis de la optimización mediante RSM de las tres variables	47
4.1.2.1. Modelos matemáticos derivados del RSM para un DCCC con tres variables, y evaluación estadística.....	47
4.1.2.2. Patrones de respuesta	52
4.1.2.3. Condiciones numéricas individuales y globales que maximizan la extracción	55
4.1.2.4. Estudio cinético complementario para determinar una respuesta máxima para la EAC	58
4.1.3. Análisis dosis-respuesta del efecto de la relación S/L en las condiciones óptimas.....	59
4.1.4. Comparación con otros estudios que comprenden la extracción de antocianinas	62
4.2. Producción de extractos naturales de antocianinas a partir de frutos de <i>Arbutus unedo</i> L. para usarlos como posibles sustitutos de los colorantes artificiales en escala pre-industrial, y su estabilización para su incorporación en productos alimentarios	63
4.2.1. Determinación de las bioactividades del extracto rico en antocianinas obtenido	63
4.2.1.1. Evaluación de las propiedades antioxidantes	64
4.2.1.2. Evaluación de la citotoxicidad	64
4.2.1.3. Evaluación de las propiedades antimicrobianas	65
4.2.2. Estabilidad de los extractos en sistemas de solución acuosa, simulando matrices alimentarias	67
4.3. Incorporación del extracto optimizado de cianidina-3-<i>O</i>-glucósido proveniente de <i>Arbutus unedo</i> L. en gofres, como posible sustituto de los actuales colorantes sintéticos	74
5. CONCLUSIÓN Y FUTUROS TRABAJOS	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estimación del incremento de la demanda de colorantes naturales, clasificados según su estructura química, entre 2014 y 2020. _____ 7
- Figura 2.** Grupo base de las antocianidinas. _____ 10
- Figura 3.** Antocianidinas más comunes en la naturaleza. _____ 10
- Figura 4.** Estructuras en equilibrio en medio acuoso de antocianidinas. _____ 13
- Figura 5.** Diferentes perspectivas de *A. unedo* (Fuentes: Pinterest.com: izquierda; Limón, 2016: derecha). _____ 16
- Figura 6.** Localización geográfica del fruto de *A. unedo* (izquierda), detalle de corteza (centro) y hojas (derecha) de *A. unedo* (Fuente: Cecilia Jiménez). _____ 17
- Figura 7.** Detalle de flores (izquierda) y frutos (derecha) de *A. unedo* (Fuente: Cecilia Jiménez). _____ 17
- Figura 8.** Diagrama de las diferentes etapas llevadas a cabo para optimizar las condiciones que maximizan las respuestas de extracción (Y_1 y Y_2) de los compuestos de antocianina y el residuo total extraído (*rendimiento*). _____ 43
- Figura 9.** Muestra los resultados gráficos de CT en términos del comportamiento de extracción para los tres formatos de respuesta (Y_1 , Y_2 y *rendimiento*). Cada figura está dividida en dos partes. *Parte A*: muestra el gráfico conjunto de análisis 3D, tanto para EAC como para EAU. Cada una de las superficies netas representa la superficie de respuesta 3D predicha gracias al polinomio de segundo orden de Ec. [1] mediante las acciones binarias entre dos variables, cuando la variable excluida se posiciona en el óptimo individual (**Tabla 9**). *Parte B*: Para ilustrar el beneficio del ajuste, se utilizan dos criterios básicos de estadística gráfica. El primero, la capacidad de simular los cambios de la respuesta entre los datos predichos y los observados; y el segundo, la distribución residual en función de cada una de las variables. _____ 49
- Figura 10.** Muestra las proyecciones de isolíneas optimizadas para la combinación de las tres principales variables involucradas (X_1 , X_2 y X_3) en la EAC, de los tres formatos de valor de respuesta (Y_1 , Y_2 , y *rendimiento*). para describir visualmente las tendencias de cada respuesta y guiar la selección de las condiciones más favorables, teniendo en cuenta, al mismo tiempo, todas las respuestas. Cada uno de los gráficos de contorno representa la proyección en el plano XY de la superficie de respuesta tridimensional teórica predicha gracias al polinomio de segundo orden de Ec. [1] mediante las acciones binarias entre variables, cuando la variable excluida se posiciona en el óptimo individual (**Tabla 9**). El diseño estadístico y los resultados experimentales se describen en la **Tabla 6**. Los valores paramétricos estimados se muestran en la **Tabla 7**. _____ 50
- Figura 11.** Muestra las proyecciones de isolíneas optimizadas para la combinación de las tres principales variables involucradas (X_1 , X_2 y X_3) en la EAU, de los tres formatos de valor de respuesta (Y_1 , Y_2 , y *rendimiento*), para describir visualmente las tendencias de cada respuesta y guiar la selección de las condiciones más favorables, teniendo en cuenta al mismo tiempo todas las respuestas. Cada uno de los gráficos de contorno representa la proyección en el plano XY de la superficie de respuesta tridimensional teórica predicha gracias al polinomio de segundo orden de Ec. [1] mediante las acciones



binarias entre variables, cuando la variable excluida se posiciona en el óptimo individual (**Tabla 9**). El diseño estadístico y los resultados experimentales se describen en la **Tabla 6**. Los valores paramétricos estimados se muestran en la **Tabla 7**. _____ 51

Figura 12. Resumen final de los efectos de todas las variables evaluadas para los sistemas de EAC y EAU. Muestra los gráficos 2D individuales de todas las respuestas estudiadas en función de todas las variables evaluadas. Las variables en cada uno de los gráficos 2D se colocaron en los valores óptimos individuales de las demás (**Tabla 9**). Los puntos (⊙), presentados a lo largo de cada línea, resaltan la ubicación del valor óptimo. Las líneas y los puntos son generados por los modelos teóricos polinomiales de segundo orden (**Tabla 8**). _____ 54

Figura 13. Resumen final de los efectos de todas las variables evaluadas para los sistemas de EAC y EAU. Muestra la respuesta a la dosis de la relación *S/L* en los valores óptimos globales de las otras tres variables (**Tabla 9**). Los resultados experimentales son los puntos (○), mientras que las líneas son el patrón predicho por la Ec. [2]. El valor límite (~150 g/L) muestra la concentración experimental máxima alcanzable, ya que llega un momento en que la muestra no se puede agitar físicamente a escala de laboratorio. _____ 61

Figura 14. Estabilidad de CT como una función de *t*, *T* y *pH* en un sistema acuoso que simula matrices alimentarias. La Sección A muestra el análisis gráfico individual dependiente del tiempo, de los resultados de estabilidad basados en el contenido de antocianinas como una función de *T* y *pH*. Cada gráfico muestra los efectos degradatorios de *t* (0-190 h) para cada *T* testada (5, 25, 40, 55 and 70 °C). Los puntos representan los datos experimentales de los diferentes *pHs* testados (● 2, ○ 3,5, ◆ 5, ◇ 6,5 and ★ 8) y las líneas (—), los resultados predichos por la Ec. [1]. Los resultados paramétricos y los coeficientes de determinación se presentan en la **Tabla 11**. La Sección B muestra los resultados del ajuste global multivariable resultante de aplicar la Ec. [5] para describir todos los datos multivariables: B1 muestra el patrón de la superficie neta paramétrica de la cinética *r* en función de sus respectivas variables de afectación (*pH* y *T*); y B2 muestra la correlación entre los valores experimentales y los pronosticados obtenidos con el modelo multivariable presentado en Eq. [5]. _____ 69

Figura 15. Estabilidad individual de C1, C2 y C3 como una función de *t*, *T* y *pH* en solución acuosa que simula matrices alimentarias. En esta figura se representan dos subsecciones para cada compuesto. En la Sección A se muestra el análisis gráfico individual dependiente del tiempo, de los resultados de estabilidad basados en el contenido de antocianinas como una función de *T* y *pH*. Cada gráfico muestra los efectos de degradación del tiempo (0-190 h) para cada *T* testada (4, 25, 40, 55 y 70 °C). Los puntos representan los datos experimentales de los diferentes *pHs* testados (● 2, ○ 3,5, ◆ 5, ◇ 6.5 y ★ 8) y las líneas (—), los resultados predichos por la Ec. [1]. Los resultados paramétricos y los coeficientes de determinación se presentan en la **Tabla 11**. La Sección B muestra los resultados del ajuste global multivariable resultante de aplicar la Ec. [5] para describir todos los datos multivariables del patrón de la superficie neta paramétrica de la cinética *r* en función de sus respectivas variables de afectación (*pH* y *T*). _____ 70

Figura 16. Diagrama que resume el trabajo realizado: la Sección 1 muestra el proceso de extracción de compuestos de antocianinas, en las *fig. 1.a* y *1.b* pueden verse los frutos de *A. unedo* enteros y pulverizados tras su liofilización, respectivamente; la Sección 2 describe la estabilidad en sistemas de solución acuosa, prediciendo su



aplicación potencial en matrices alimentarias (la *fig. 2.a* muestra las diferencias causadas por la variable *pH*); y la Sección 3 representa los resultados visuales de la adición del extracto rico en cianidina-3-*O*-glucósido de *A. unedo* a los gofres (la *fig. 3.a* muestra los gofres adicionados con extracto de *A. unedo*, y la *3.b*, los gofres control sin extracto). _____ 75



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Colorantes naturales y sintéticos de uso más frecuente autorizados en la UE.	4
Tabla 2. Ejemplos de colorantes y su toxicidad.	6
Tabla 3. Clasificación de colorantes naturales según su estructura química.	7
Tabla 4. Diferentes técnicas de extracción para cianidina-3- <i>O</i> -glucósido.	15
Tabla 5. Dominios experimentales y codificación de las variables independientes en el diseño factorial DCCC con cinco niveles de valores.	44
Tabla 6. Resultados experimentales de RSM del DCCC para la optimización de las tres variables principales involucradas (X_1 , X_2 y X_3) en la EAC y la EAU, para los tres formatos de valores de respuesta evaluados (Y_1 , Y_2 y <i>Rendimiento</i>). Las variables, los valores naturales y los rangos utilizados se recogen en la Tabla 5 . Se realizaron tres repeticiones para cada condición y para cada técnica.	45
Tabla 7. Resultados paramétricos de la ecuación polinómica de segundo orden de la Ec. [1] para las técnicas de extracción EAC y EAU, en términos del comportamiento de extracción de los tres formatos de valores de respuesta (Y_1 , Y_2 y <i>rendimiento</i>), de acuerdo con el DCCC con 5 niveles de rango (Tabla 5). El subíndice paramétrico 1, 2 y 3 representa las variables involucradas t (X_1), T o P (X_2) y S (X_3), respectivamente. El análisis de la significancia de los parámetros ($\alpha=0,05$) se presenta en valores codificados. Además, se presenta la información estadística del procedimiento de adaptación al modelo.	46
Tabla 8. Modelos matemáticos de los procesos extractivos derivados del modelo polinomial de segundo orden de Box-Behnken de la Ec. [1].	48
Tabla 9. Condiciones de las variables en valores naturales que conducen a valores de respuesta óptima para RSM utilizando un DCCC para cada una de las técnicas de extracción evaluadas (EAC y EAU), para los tres formatos de valor de respuesta (Y_1 , Y_2 y <i>rendimiento</i>) y para cada compuesto evaluado.	57
Tabla 10. Actividad antioxidante, citotóxica, hepatotóxica y antimicrobiana del extracto de <i>Arbutus unedo</i> L. (media \pm desviación estándar).	66
Tabla 11. Resultados de los parámetros e intervalos de confianza del contenido de CT, C1, C2 y C3 ajustados al modelo dependiente de t recogido en la Ec. [1] a diferentes condiciones de pH y T al evaluar la estabilidad durante el proceso de obtención del extracto enriquecido.	73
Tabla 12. Resultados de los parámetros del color, pH, valores nutricionales, contenidos de azúcar y ácidos grasos, y actividad antioxidante de las muestras de gofres.	77



LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
C	Compuesto antocianídico.
C1	Delfinidina-3- <i>O</i> -glucósido.
C2	Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido.
C3	Cianidina-3- <i>O</i> -pentósido.
CFI	Concentración Mínima Inhibitoria.
CT	Suma total de todos los compuestos de antocianina.
DAD	Detector de diodos.
DCCC	Diseño central compuesto circunscrito.
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> – “Medio Eagle modificado por Dulbecco”.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.
DW	El coeficiente de Durbin-Watson.
EAC	Extracción asistida por calor.
EAU	Extracción asistida por ultrasonidos.
Ec.	Ecuación.
EC₅₀	Concentración de extracto que consigue el 50 % de la actividad antioxidante ó 0.5 de la absorbancia en el ensayo del poder reductor.
ECM	Error cuadrático medio.
EE.UU.	Estados Unidos de América.
EPAM	Error porcentual absoluto medio.
ESI	Ionización por electrospray.
FAME	Estándar del éster metílico para ácidos grasos
GI₅₀	Concentración del extracto que logra el 50 % de la inhibición del crecimiento celular.
HCl	Ácido clorhídrico.
HeLa	Línea celular humana de carcinoma cervical.
HepG2	Línea celular humana de carcinoma hepatocelular.
HPLC	<i>High-performance Liquid Chromatography</i> – “Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia”.
IDA	Ingesta diaria aceptable o admisible.
INT	Iodonitrotetrazolio colorido.
MA	Agar extracto de malta.
MCF-7	Línea celular humana de adenocarcinoma mamario.
MS	<i>Mass Spectrometry</i> – “Espectrometría de masas”.
NCI-H460	Línea celular humana de carcinoma pulmonar.
ns	No significativo.
P o X₂	Variable <i>potencia de ultrasonidos</i> .
PLP2	<i>Porcine liver primary culture</i> – “Cultura primaria de células de hígado porcino”.
PR	Poder reductor.
R	Residuo del extracto.
R²	Coefficiente de determinación.



R²_{adj}	Coefficiente de determinación ajustado al modelo.
RECM	Raíz del error cuadrático medio.
RI	Índice de refracción
rpm	Rotaciones por minuto.
RSA	Actividad captadora de radicales libres
RSM	<i>Response surface methodology</i> – “Metodología de respuesta de superficie”.
S o X₃	Variable <i>porcentaje de etanol del solvente</i> .
S/L o X₄	Variable de la relación sólido/líquido.
SFB	Suero Fetal Bovino.
SRB	Sulfurodamina B.
t o X₁	Variable <i>tiempo</i> .
T o X₂	Variable <i>temperatura</i> .
t.a.	Temperatura ambiente.
TBARS	Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico.
TCA	Ácido tricloroacético.
TFA	Ácido trifluoroacético.
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico.
TSB	Medio de digerido de soja.
W	Vatios.
Y₁	Rendimiento de compuestos en el fruto seco (µg C/g de fruto seco).
Y₂	Rendimiento de cada compuesto en el residuo extraído (µg C/g R).



RESUMEN

El primer paso crítico de este estudio fue obtener las condiciones óptimas que maximizan la extracción de antocianinas a partir de frutos de *Arbutus unedo* L., mediante la comparación de dos técnicas extractivas asistidas por diferentes energías físicas, el calor y los ultrasonidos. Para ello, se aplicó una metodología de superficie de respuesta, utilizando el diseño compuesto central circunscrito de tres variables con cinco niveles. Se identificaron tres compuestos de antocianina por HPLC-DAD-ESI/MS, siendo cianidina-3-*O*-glucósido la molécula principal. La extracción asistida por calor resultó ser la técnica más efectiva, que produjo un rendimiento del 60,9 %, con un contenido total de antocianinas de 500,9 µg/g de fruto seco y 800,6 µg/g de extracto siguiendo unas condiciones de 5 min, 90 °C y 80 % de etanol acidificado. Además, estos valores se mejoraron ligeramente al estudiar el efecto de la relación sólido/líquido en un formato de dosis-respuesta (de 5 a 150 g/L), en las condiciones óptimas de extracción, manifestando valores de extracción prácticamente constantes entre los 5 y los 40 g/L.

Una vez conseguida la optimización de la extracción de antocianinas (principalmente cianidina-3-*O*-glucósido) a partir de frutos de *Arbutus unedo* L., se procedió a estudiar su potencial como aditivo natural colorante, con la finalidad de ser utilizado en la industria alimentaria como sustituto de colorantes sintéticos, cuya demanda va en decadencia progresiva. En primer lugar, se analizaron las propiedades bioactivas del extracto, analizando sus capacidades antioxidantes, antimicrobianas y citotóxicas. Los resultados mostraron que el extracto optimizado presentaba importantes propiedades antioxidantes, así como actividades citotóxicas (en líneas celulares tumorales) y antimicrobianas significativas. Complementariamente, se evaluó su posible toxicidad, corroborándose efectos nulos. Una vez analizadas minuciosamente las características del extracto, se procedió a su estabilización. Para ello se sometió el extracto rico en antocianinas a las condiciones más adversas de conservación (solución acuosa) y se estudió su comportamiento teniendo en cuenta las principales variables que afectan a la misma (tiempo, temperatura y pH). Los valores utilizados como respuestas fueron las concentraciones de antocianinas de cada muestra, determinadas por HPLC-DAD. Se usaron ecuaciones matemáticas fenomenológicas para describir las respuestas, y se



proporcionaron patrones para la estabilización del extracto rico en antocianinas en solución acuosa.

Finalmente, el extracto se incorporó en gofres como caso práctico de estudio en productos de pastelería, con el objeto de evaluar su posible aplicación en matrices alimentarias. La estabilidad completa del perfil nutricional, los azúcares libres, los ácidos grasos y la actividad antioxidante se controlaron justo después de que los gofres se hornearan y tras 3 y 6 días de almacenamiento. Por lo tanto, los resultados obtenidos proporcionan información para: i) la posible aplicación industrial del extracto de frutos de *A. unedo* como fuente alternativa de antocianinas para producir un aditivo natural colorante con propiedades bioactivas; ii) predicciones de vida útil en condiciones específicas de temperatura y pH; y iii) la incorporación del extracto de *A. unedo* rico en antocianinas no solo no causó cambios significativos en el valor nutricional de gofres en comparación con las muestras control, sino que dicha incorporación añadió propiedades colorantes y bioactivas al producto original, lo que respalda su posible aplicación en la preparación de productos de pastelería y panadería.



ABSTRACT

The first critical step of this study was to obtain the optimal conditions that maximize the anthocyanins extraction from fruits of *Arbutus unedo* L., by comparing two extractive techniques assisted by different physical energies, heat and ultrasounds. For this, a response surface methodology was applied, using the three-variable circumscribed central composite design with five levels. Three anthocyanin compounds were identified by HPLC-DAD-ESI/MS, being cyanidin-3-*O*-glucoside the major molecule. Heat assisted extraction proved to be the most effective technique, yielding a 60.9 %, with a total anthocyanin content of 500.9 $\mu\text{g/g}$ of dry fruit and 800.9 $\mu\text{g/g}$ of extract following conditions of 5 min, 90 °C and 80 % acidified ethanol. In addition, these values were slightly improved by studying the effect of the solid/liquid ratio under optimum conditions, in the dose-response format, showing constant extraction values between 5 and 40 g/L.

Once the extraction optimization of anthocyanins (mainly cyanidin-3-*O*-glucoside) from fruits of *Arbutus unedo* L. was achieved, its potential as a natural coloring additive was studied to replace, in the food industry, artificial additives, whose demand goes in progressive decay. First, the bioactive capacities of the extract were analyzed by testing its antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity properties, revealing high antioxidant properties, as well as significant cytotoxic (in tumor cell lines) and antimicrobial activities. Complementarily, the toxicity of the extract was evaluated, validating its non-toxic effects. Afterwards, a stability study of the extract was carried out, considering the main variables that could affect the extract (time, temperature and pH) under the most unfavorable conservation conditions (aqueous solution). Responses were measured by anthocyanin contents determined by HPLC-DAD. Mechanical and phenomenological equations were used to describe the responses, and patterns were provided for the stabilization of the rich extract in anthocyanins in aqueous solution. Finally, the extract was incorporated in waffles in order to study its possible application in food matrices, in this case, in a pastry product. A complete stability of the nutritional profile, free sugars, fatty acids and antioxidant activity were monitored right after the waffles were baked and subsequently with 3 and 6 days of storage. Therefore, the results obtained provide information for: i) the possible industrial application of *A. unedo* fruit extract as an alternative source of anthocyanins to produce a natural coloring additive with bioactive



properties; ii) predictions of shelf life under specific conditions of temperature and pH; and iii) the incorporation of *A. unedo* extract rich in anthocyanins, did not only cause significant changes in the nutritional value of waffles in comparison with the control samples, but also added color and bioactive properties to the original product, supporting its potential application in the preparation of pastry and bakery products.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Uso de colorantes en la industria alimentaria

Las primeras manifestaciones artísticas tuvieron lugar en el Paleolítico, y con ellas se demuestra que los primeros hombres fueron los pioneros en el uso de ciertos pigmentos. Estos primeros colorantes eran de origen natural y la mayor parte de ellos de naturaleza inorgánica, procedentes de yacimientos. Ejemplo de ellos son el ocre rojo [hematites (α - Fe_2O_3)], ocre amarillo [goetita (α - FeOOH)], negro carbón y calcita (CaCO_3) (San Andrés, Sancho, and De la Roja 2010). Con el tiempo y la evolución, el hombre fue capaz de extraer sustancias de carácter tintóreo a partir de plantas, insectos y moluscos, y ya en la cuna de las civilizaciones mesopotámica y egipcia surgió uno de los pigmentos de origen sintético más antiguos (c. 3.100 a.C), el *azul egipcio*, también designado como frita egipcia, azul de Alejandría o azul pompeyano; que pasó a ser uno de los pigmentos más utilizados por los países de la cuenca mediterránea durante aquel período de la historia (Riederer 1997; San Andrés et al. 2010). Posteriormente, nació la alquimia, doctrina relacionada con la elaboración de medicamentos, las artes metalúrgicas y la fabricación de cerámicas, pigmentos, colorantes y perfumes. Hasta el nacimiento de la química moderna, los pintores acudían a los alquimistas en busca de los conocimientos e instrumentos requeridos para la preparación de pigmentos y colorantes (Brock 1998; Holmyard 1990; San Andrés et al. 2010). Sin embargo, cuando la química nace como ciencia y se separa de la alquimia, la elaboración de materiales pictóricos es asumida enteramente por la primera. Por tanto, el desarrollo y la introducción de nuevos materiales colorantes y la mejora de sus procesos de aplicación práctica, han sido constantes desde los inicios de la historia (Gettens and Stout 1996; San Andrés et al. 2010).

También remontándonos al Paleolítico podemos encontrar el posible origen de la incorporación de sustancias a los productos alimenticios: la exposición de los alimentos al humo de un fuego favorecía su conservación. Más adelante, en el Neolítico, el hombre comienza a desarrollar la agricultura y la ganadería, lo que requiere a su vez la introducción de técnicas de manipulación para tratar dichos alimentos con el fin de que resulten más apetecibles o que se conserven mejor. Con el primer objetivo se utilizaron, entre otros, el azafrán y la cochinilla, lo que supuso que fuera en este período histórico



cuando se unificaron y complementaron los dos conceptos nacidos en el Paleolítico: los colorantes como aditivos alimenticios. (Vicent García 1991). El empleo de estas y otras muchas sustancias era empírico, pero con los avances experimentados por la química en el siglo XVIII y con las nuevas necesidades de la industria agroalimentaria del siglo XIX, la búsqueda de compuestos para añadir a los alimentos se hizo sistemática. El coloreado de los alimentos alcanzó su apogeo con el desarrollo, en el siglo XIX, de la industria de los colorantes orgánicos de síntesis. En 1860, en Francia se coloreaba el vino con fucsina; con el tiempo se colorearon los macarrones y la mantequilla con dinitrocresol, y poco a poco fueron aumentando los alimentos a los que se añadían colorantes (Ibañez, Torre and Irigoyen 2003).

Actualmente, la legislación referente a la industria alimentaria está minuciosamente regulada. A pesar de que la controversia sobre el valor de los aditivos se perpetúe en los años, la realidad es que los aditivos se someten a más controles que ningún otro componente de los alimentos (Durán 2001), y para que una sustancia sea admitida como aditivo debe estar bien caracterizada químicamente y superar los controles toxicológicos establecidos por parte de los correspondientes organismos sanitarios. Así, la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS), creó un conjunto de comités que evalúan diversos aspectos de los aditivos basándose en la información toxicológica disponible, incluyendo las pruebas efectuadas en animales y humanos. Al analizar los datos, se determina el “nivel sin efecto adverso observado” (*no observed adverse effect level*, *NOAEL*), que se emplea para determinar la cantidad de “ingesta diaria aceptable o admisible” (IDA) para cada aditivo (Ibañez, Torre and Irigoyen, 2003; Ortega 2004).

En la Unión Europea, previo estudio del Comité Científico de la Alimentación Humana, el Consejo de Europa emitió Directivas para armonizar la legislación de los países miembros en materia de aditivos. En este sentido se toma como referencia la Directiva 89/107/CEE, que se desarrolla a través de las Directivas 94/35/CEE (sobre edulcorantes), 94/36/CEE (sobre colorantes) y 95/2/CEE (sobre aditivos distintos de colorantes y edulcorantes). Los controles a los que se someten los aditivos, previa autorización, tienen en cuenta los factores de los que depende la toxicidad: dosis (cantidad de sustancia absorbida), frecuencia de administración (única o repetida), grado de toxicidad de la sustancia y tiempo para que se manifiesten los efectos. Asimismo, ha



de demostrarse su necesidad de tal modo que su uso suponga ventajas tecnológicas y beneficios para el consumidor. Ahora bien, el que se recoja legalmente la posibilidad de utilizar sustancias como aditivos, no significa que su uso sea obligatorio, sino que, si es necesaria su incorporación, sólo podrán emplearse en los alimentos señalados. Los motivos por los que deberá establecerse dicha necesidad son: i) conservar la calidad nutritiva de un alimento; ii) proporcionar alimentos con destino a un grupo de consumidores con necesidades dietéticas especiales; iii) Aumentar la estabilidad de un alimento o mejorar sus propiedades organolépticas e iv) Favorecer los procesos de fabricación, transformación o almacenado de un alimento, siempre que no se enmascare materias primas defectuosas o prácticas de fabricación inadecuadas (Multon, 2000).

Para la identificación de los aditivos se sigue la numeración asignada por la UE, que va precedida por la letra E. La cifra de las centenas indica el tipo de función que realiza un aditivo, de acuerdo con la siguiente lista: 1XX. Colorantes; 2XX. Conservantes; 3XX. Antioxidantes y reguladores del pH; 4XX. Agentes que actúan sobre la textura (estabilizantes, espesantes, gelificantes y emulsionantes); 5XX. Correctores de la acidez y sustancias minerales; 6XX. Potenciadores del sabor; 9XX. Otros aditivos (agentes de recubrimiento, gases de envasado y edulcorantes); 11XX. Enzimas; y 14XX. Almidones modificados (Cubero, Monferrer, and Villalta, 2002).

Los colorantes son de los aditivos más importantes hablando en términos de marketing, ya que el color puede ser considerado como uno de los atributos más atractivos y que más llaman la atención de los alimentos, es la primera sensación percibida, que influye directamente en las preferencias, gustos y elecciones de los consumidores, pudiendo a veces influir incluso en el olor y el sabor del mismo (Delgado-Vargas and Paredes-Lopez, 2003; Martins et al., 2016; Shim et al., 2011). Más aún, el coloreado puede condicionar el éxito o fracaso comercial de un producto, ya que no cabe duda del impacto que tienen la percepción, las opiniones y los deseos de los consumidores en la industria alimentaria (Carocho et al. 2014; Delgado-Vargas and Paredes-Lopez, 2003; Martins et al., 2016). Así que, para hacerlos más atractivos a los consumidores, deben colorearse de manera artificial en muchas ocasiones. Para ello, se pueden utilizar sustancias obtenidas de fuentes naturales o preparadas por métodos físicos o químicos, es decir, sintéticos (**Tabla 1**) (Ibañez, Torre and Irigoyen, 2003).



Tabla 1. Colorantes naturales y sintéticos de uso más frecuente autorizados en la UE.

COMPUESTO	OBTENCIÓN	APLICACIÓN	EFFECTOS Y LÍMITES
COLORANTES NATURALES			
Curcumina	Rizoma de la cúrcuma (<i>Curcuma longa</i> L.)	Color amarillo intenso (curry). Confituras, mermeladas, etc. Embutidos picados (crudos y cocidos).	Baja absorción en el intestino, toxicidad reducida y efectos teratógenos.
Cochinilla Carmín Ácido carmínico	Hembras del insecto <i>Dactylopus coccus</i> Costa, parásitos de algunas especies de cactus	Color rojo muy variable, utilizándose en conservas vegetales, mermeladas, helados, productos cárnicos y bebidas alcohólicas y no alcohólicas.	Se han señalado respuestas alérgicas en sujetos que han consumido bebidas con este colorante.
Clorofilas	Algas	Color verde característico aplicado a chicle, helados y bebidas refrescantes.	Baja absorción intestinal. IDA: sin asignar.
Caramelo	Calentamiento de azúcar (sacarosa y otros)	Productos de bollería, repostería y helados. Bebidas de cola y alcohólicas (ron, coñac, etc.).	Dosis de hasta 18 g/día tienen un ligero efecto laxante.
Carotenoides	Capsantina: pimiento rojo y del pimentón Licopeno: tomate	Fabricación de embutidos. Bebidas refrescantes.	Absorción intestinal muy baja. IDA: 5 mg/kg.
Rojo de remolacha	Remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i> L.)	Productos de repostería, helados y derivados lácteos dirigidos al público infantil.	Baja absorción intestinal El colorante absorbido se elimina sin cambios por la orina.
Antocianos	Extracto de piel de uva, bayas y frutos rojos, maíz morado, rábanos y lombarda.	Bebidas, refrescos, yogures, lácteos, golosinas, dulces y repostería.	Sin efectos secundarios. Potentes efectos antioxidantes.
COLORANTES SINTÉTICOS			
Cantaxantina	Color rojo estable	Se aplica al pienso de piscifactorías (salmón y trucha).	Se le asocia a lesiones en la retina. IDA: 0,03 mg/kg.
Tartracina	Color amarillo limón	Productos de repostería, galletas, derivados cárnicos, sopas, conservas vegetales, bebidas refrescantes.	Produce reacción alérgica en sujetos asmáticos (alrededor del 4%). IDA: hasta 7,5 mg/kg.
Rojo cochinilla	Color de "fresa"	Confitería, repostería helados y derivados cárnicos.	Efectos cancerígenos discutibles. IDA: hasta 4 mg/kg.
Amarillo de quinoleína	Color de "naranja"	Bebidas refrescantes y en bebidas alcohólicas.	Se absorbe menos del 3% en el aparato digestivo. IDA: hasta 0,5 mg/kg.
Eritrosina	Color de "fresa" poco estable, sobre todo en presencia de vit. C	Postres lácteos con sabor de fresa. Confitería y derivados cárnicos.	Baja absorción intestinal. IDA: hasta 0,6 mg/kg.

IDA: Ingesta Diaria Aceptable o Admisible



En 2012 el consumo mundial de colorantes en la industria alimentaria fue de 49.600 toneladas, y se concluyó que crecería según una tasa anual del 3,8 % entre 2013 y 2018. En el caso de EE.UU., el consumo de estos productos va en aumento significativamente en alimentos para niños, tales como golosinas, bebidas y aperitivos (Carmona, 2013).

Los colorantes se utilizan de cara al tercer objetivo de los aditivos nombrados anteriormente, aunque bien podrían complementar su acción aportando alguna ventaja al consumidor, traducible en un efecto farmacológico beneficioso para su salud; es decir, lo idóneo sería utilizar compuestos que, además de colorear los alimentos, presenten propiedades ventajosas para la salud de quien los ingiera (ejemplo, acción antioxidante). Esto invita a la búsqueda de nuevos compuestos de origen natural que cumplan dichas características, como son los antocianos (E163).

1.2. Ventajas de los colorantes naturales frente a los colorantes sintéticos

El color es una de las características organolépticas más influyentes a la hora de elegir un alimento, como ya se refirió anteriormente, ya que proporciona información valiosa como el grado de madurez de una fruta o si un trozo de carne está fresco o no. En el caso de los alimentos procesados como los helados, refrescos o productos de pastelería, el color también es fundamental, ya que indica el sabor más probable del alimento. Los colorantes usados con dichos fines pueden ser clasificados según sus características de disolución, según su color o según su origen, dando lugar esta última clasificación a los colorantes naturales y a los artificiales o sintéticos (Ortega and Paz, 2004).

Cuando inicialmente surgió la coloración de los alimentos, se usaban sustancias naturales extraídas de plantas o minerales, pero con el desarrollo de la industria, y debido a que éstos eran inestables con el tiempo, se empezaron a usar en mayor medida los colorantes sintetizados químicamente (Ortega and Paz, 2004). Desde el descubrimiento del primer colorante sintético, malva, a manos de Sir WH Perkin en 1856 y durante muchas décadas, los colorantes artificiales han contado con el monopolio del mercado. Pero no todas las sustancias colorantes son adecuadas con fines alimentarios, ya que algunas incluso pueden resultar perjudiciales para la salud. Tal es el caso de derivados de cobre, plomo y arsénico, que se usaron en el siglo XIX para colorear fraudulentamente los alimentos. Debido a que son los aditivos que con mayor frecuencia se asocian a patologías alérgicas, así como a cambios en el comportamiento de niños, provocando hiperactividad mayormente, actualmente, y en la medida de lo



posible, se recurre a colorantes naturales en lugar de sintéticos, ya que existe una presión importante por parte de los consumidores (Ibañez, Torre and Irigoyen, 2003; Olea, López, and Hug 2012). Los productos naturales derivados de plantas cada vez presentan mayor atracción a ojos de los consumidores y utilizadores, como chefs y demás profesionales implicados en alimentación. Por ello, la introducción de nuevas especies y colorantes obtenidos de plantas podría suponer nuevas oportunidades gastronómicas (Renna and Gonnella, 2012). Un dato que respalda esta propuesta es que la demanda de colorantes naturales aumentó casi en un 35 % desde 2005 hasta 2009, llegando alrededor del 55 % en 2015 y previéndose que esta cifra incremente hasta llegar al 60 % en 2026. Los colorantes naturales son considerados, en general, como inocuos y las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que se aplican a los colorantes de síntesis (Renna and Gonnella, 2012). Como puede observarse en la **Tabla 2**, la mayoría de los aditivos calificados como inofensivos son de origen natural.

Tabla 2. Ejemplos de colorantes y su toxicidad.

<i>Número</i>	<i>Nombre</i>	<i>Naturaleza</i>	<i>Toxicidad</i>
E100	Curcumina	Natural	Inofensivo
E101	Riboflavina (Lactoflavina)	Natural	Inofensivo
E102	Tartrazina	Sintético	Evitar
E103	Crisoína	Sintético	Evitar
E104	Amarillo de quinoleína	Sintético	Evitar
E105	Amarillo sólido	Sintético	Evitar
E106	Fosfato de lactoflavina	Natural	Inofensivo
E120	Ácido carmínico	Natural	Evitar
E127	Eritrosina	Sintético	Evitar
E140	Clorofilas	Natural	Inofensivo
E150	Caramelo	Natural/Sintético	Precaución (grandes dosis)
E151	Negro brillante	Sintético	Evitar
E155	Marrón chocolate HT	Sintético	Evitar
E160	β -Caroteno	Natural	Inofensivo
E161g	Cantaxantina	Natural/Sintético	Evitar
E162	Betanina	Natural	Inofensivo
E163	Antocianinas	Natural	Inofensivo

Centrándonos, pues, en el grupo de los colorantes naturales, son compuestos que, además de tener capacidad colorante, normalmente son beneficiosos para el organismo, ya que pertenecen a grupos químicos (**Tabla 3**) a los que se atribuyen bioactividades,



como puede ser un efecto antioxidante o antimicrobiano, entre otros (Ibañez, Torre and Irigoyen, 2003; Olea, López, and Hug 2012).

Tabla 3. Clasificación de colorantes naturales según su estructura química.

<i>NATURALEZA QUÍMICA</i>	<i>EJEMPLOS</i>	<i>COLOR PREDOMINANTE</i>	<i>A_{max} (nm)</i>
Tetrapirroles (lineales y cíclicos)	Ficobilinas	azul-verde	610-650 (ficocianinas)
	Ficobilinas	amarillo-rojo	540-570 (ficoeritrinas)
	Clorofila	verde	640-660
Carotenoides	Carotenoides	amarillo-anaranjado	400-500
Flavonoides	Flavonas	blanco-crema	310-350
	Flavonoles	amarillo-blanco	330-360
	Chalconas	amarillo	340-390
	Auronas	amarillo	380-430
	Antocianinas	rojo-azul	480-550
Xantonas	Xantonas	amarillo	340-400
Quinonas	Antraquinonas	rojo-púrpura	420-460
Derivados indoles	Betaláinas	amarillo-rojo	470-485 (betaxantinas)
Pirimidinas sustituidas	Pterinas	blanco-amarillo	350
	Flavinas	amarillo	360-450
	Fenoxazinas	amarillo-rojo	660-670
	Fenazinas	amarillo-púrpura	260-500

Un estudio sobre la evolución de la situación mercantil de los colorantes naturales menciona que de aquí a 2020 pone de manifiesto que el interés del consumidor por este tipo de aditivos seguirá aumentando, lográndose así que la demanda actual cambie y se centre en los colorantes obtenidos de la naturaleza, quedando distribuida según la **Figura 1** (Ortega and Paz, 2004).

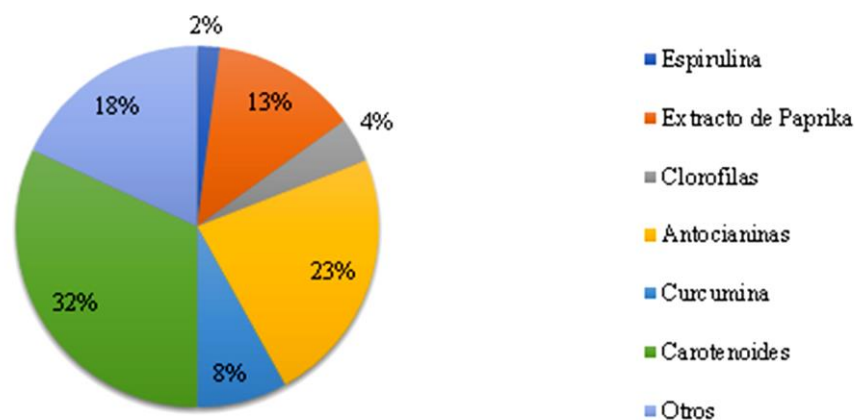


Figura 1. Estimación del incremento de la demanda de colorantes naturales, clasificados según su estructura química, entre 2014 y 2020.



Los carotenoides y las antocianinas son los compuestos que se sitúan a la cabeza según este ranking, pudiendo deberse tanto a la gran variedad de uso que presentan, como a las diversas fuentes naturales en las que se pueden encontrar, sin olvidar que su utilización no solo está considerada totalmente inofensiva, sino que además puede suponer ventajas beneficiosas al consumidor gracias a sus demostradas actividades biológicas (Ge and Ma 2013). Los carotenoides presentan colores desde naranja a amarillo y se obtienen de forma natural por extracción de zanahorias, aceite de palma y algas; o de forma sintética por biosíntesis de microorganismos. Se emplean en refrescos, zumos, jugos, néctares, batidos, margarinas, mantequillas, mayonesas, pasteles, dulces, cereales, comida precocinada y embutidos (Mak et al. 2013a). Las antocianinas, a su vez, cubren gamas que van desde el rojo (y rojo oscuro) al azul, pasando por morado, naranja y marrón, y se obtienen del extracto de piel de uva por ser el método más económico, pero se encuentran presentes en una amplia variedad de frutos rojos y bayas. Son utilizadas para colorear bebidas, refrescos, yogures y lácteos, golosinas, dulces y pasteles (Mak et al. 2013a). Las antocianinas en particular constituyen un grupo de gran interés, ya que, últimamente, su importancia está creciendo gradualmente no solo por su uso como colorante alimentario, sino también por sus propiedades antioxidantes y antibacterianas (Mak et al. 2013a).

En los últimos años, la industria alimentaria en general ha tenido que responder a dicha demanda mediante la sustitución de productos artificiales por aquellos naturales, y la industria pastelera no iba a ser menos; cada vez son más usados los ingredientes provenientes de fuentes naturales, incrementando su atracción si además presentan propiedades bioactivas, como afirma un estudio realizado sobre la sustitución de ingredientes en ciertos productos de pastelería, como los gofres (Ge and Ma 2013). La versión francesa de dichos pasteles, los *gaufres*, data de tiempos medievales. En el siglo XVIII llegaron a Estados Unidos desde Holanda. Actualmente son consumidos en todo el mundo, y, puesto que gran parte de los consumidores se encuentran en edad infantil o adolescente, la sustitución de los aditivos artificiales por compuestos naturales podría no solo evitar los efectos nocivos de los aditivos sintéticos, sino también suponer grandes ventajas para la salud (Caparrós and Verdú, 2010).

El mundo de los colorantes naturales y sus aplicaciones es un campo claramente inter y multidisciplinar, que ha vuelto a renacer, y puede tener por delante un futuro

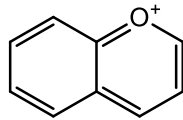


prometedor y benefactor para la Humanidad (Caparrós and Verdú, 2010). La incorporación en alimentos, como pueden ser los gofres, de antocianinas como colorantes, además de mejorar la apariencia del mismo, aportan efectos beneficiosos para la salud, ya que existe evidencia científica, según diversos estudios, de que los extractos ricos en antocianinas pueden mejorar la agudeza visual y el comportamiento cognitivo, presentan actividad antioxidante, pueden neutralizar radicales libres y actuar como agentes quimioprotectores (Garzón, 2008). Las antocianinas también juegan un papel en las propiedades antidiabéticas tales como control de lípidos, secreción de insulina y efectos vasoprotectores (Shipp and Abdel-Aal, 2010).

1.3. Antocianinas y sus fuentes naturales

La tendencia actual a preferir el consumo de alimentos naturales, complementada con la información aportada por numerosos estudios epidemiológicos, que ponen en duda la seguridad del uso de ciertos aditivos sintéticos por los posibles efectos perjudiciales que pueden provocar en la salud, ha contribuido a la búsqueda de nuevas fuentes de ingredientes en la naturaleza. En este contexto, los compuestos fenólicos, en especial las antocianinas, son de gran interés debido a sus propiedades antioxidantes y a su gran potencial como colorantes naturales (Melo, Pina, and Andary, 2009; Tsuda et al., 2003).

Las antocianinas son glucósidos hidrosolubles, producto del metabolismo secundario de los vegetales, formados a través de un enlace *O*-glucosídico que une una aglicona (antocianidina) con una molécula de azúcar. El grupo base de dichas agliconas es el ión flavilio (**Figura 2**), que normalmente se comporta como catión, y responde a la estructura del 2-fenil-benzopirilio, por lo que consta de dos grupos aromáticos (un benzopirilio y un anillo fenólico). Las antocianidinas (agliconas o geninas) raramente se encuentran libres en la naturaleza. Pertenecen al grupo de los flavonoides, y representan una atractiva fuente de pigmentos naturales responsables de los colores ciánicos, abarcando gamas que van desde rosa salmón hasta rojo y desde violeta hasta azul oscuro, como puede observarse en la mayoría de las angiospermas que se encuentran normalmente en la naturaleza, especialmente en flores y frutos (particularmente en las bayas), aunque pueden colorear todas las partes de la planta (Cavalcanti, Santos, and Meireles 2011).



Catión flavilio

Figura 2. Grupo base de las antocianidinas.

Se conocen hasta 20 estructuras diferentes de antocianidinas, pero las más comunes en los vegetales, y por tanto, las de mayor interés son pelargonidina (naranja), cianidina (naranja-rojo), delfinidina (azul-rojo), peonidina (naranja-rojo), malvidina (azul-rojo) y petunidina (azul-rojo) (**Figura 3**), nombres que derivan de la fuente vegetal de dónde se aislaron por primera vez; la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas. Los carbohidratos a los que comúnmente se encuentran unidos son la glucosa y la ramnosa, seguidos de galactosa, xilosa y arabinosa, y ocasionalmente, gentobiosa, rutinosa y soforosa (Ortíz et al., 2011). También es frecuente encontrar las antocianinas aciladas con ácidos orgánicos como lo son los ácidos cafeico, *p*-cumarico, malónico, succínico, oxálico, acético, málico y *p*-hidroxibenzoico, pudiendo combinarse y dar lugar a 600 antocianinas diferentes (Ge & Ma, 2013). El color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio; por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos provoca la formación del color rojo. También, factores extrínsecos, como el pH o la temperatura influyen en la coloración que presentan (Ortíz et al., 2011).

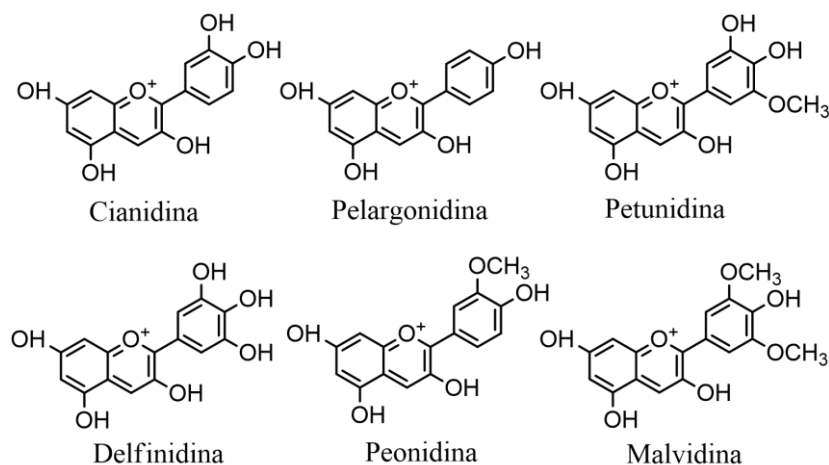


Figura 3. Antocianidinas más comunes en la naturaleza.



Además de embellecer la naturaleza con sus atractivos y fascinantes colores, las antocianinas poseen actividad antioxidante debido a su capacidad scavenger, como coinciden numerosos autores, jugando un papel esencial en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y otras patologías (Ge and Ma, 2013; Prior and Wu, 2006). Su alta capacidad antioxidante se debe principalmente a la presencia de los grupos hidroxilo fenólicos, que son capaces de prevenir eficazmente la peroxidación aportando átomos de hidrógeno que neutralizan los radicales libres y, consecuentemente, interrumpen la reacción en cadena de oxidación (Ge and Ma 2013; Sari et al., 2012).

De las citadas con anterioridad, la cianidina-3-*O*-glucósido es la más abundante de las antocianinas, tratándose de un compuesto que se encuentra de manera muy frecuente en la naturaleza, y que se toma muchas veces como antocianina de referencia para la cuantificación de compuestos antociánicos en diferentes estudios de extractos vegetales. Son varios los autores que le atribuyen bioactividades tales como quimiopreención y quimioterapéutica, ya que, en animales experimentales, demostró poseer potente actividad frente al crecimiento de células tumorales y frente a la metástasis de las mismas, provocando además una baja citotoxicidad en todos aquellos tejidos no tumorales analizados (Ding et al., 2006).

También hay evidencia de que un aporte diario de este compuesto en la dieta habitual tiene un efecto protector y preventivo frente a enfermedades como diabetes, aterosclerosis, obesidad y cardiopatías, además de su innegable actividad antioxidante, por lo que puede ser de gran interés realizar estudios más profundizados sobre esta particular antocianina (Chen et al., 2005; Sasaki et al., 2007; Tsuda et al., 2003; Xu, Ikeda, and Yamori, 2004).

Aunque las antocianinas están presentes en diferentes órganos de las plantas, así como en la mayoría de las angiospermas, las principales fuentes de antocianinas son frutas rojas, uvas, bayas, arándanos, moras, frambuesas, cerezas, maíz morado, rábanos y lombarda (Aditivos Alimentarios, 2017). Entre ellas, no cabe duda de que la piel de uva sigue constituyendo la principal fuente de antocianinas para la producción industrial de colorantes naturales, debido a su fácil y económica obtención en grandes cantidades, ya que es un producto de desecho proveniente de la industria vinífera. De dicha piel se extrae la llamada enocianina, o colorante E163.



Sin embargo, el uso de la pulpa de uva también presenta varios inconvenientes, como la disparidad en su calidad y cantidad según la época del año en la que se utilice. Por lo tanto, la industria agroalimentaria ha desarrollado un incrementado interés en identificar nuevas fuentes de antocianinas estables y económicamente viables (Melo et al., 2009).

1.4. Estabilidad de antocianinas en las diferentes técnicas de extracción

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento (Cevallos-Casals and Cisneros-Zevallos, 2004; Wrolstad, Giusti, and Kalt, 2000).

Factores como su propia estructura química, pH, concentración, temperatura, presencia de oxígeno, ácido ascórbico, y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento (Garzón, 2008).

Efecto del pH. En disolución acuosa los antocianos existen en forma de cuatro estructuras en equilibrio: catión flavilio (AH^+), anhidrobase quinoidal (oxidación de uno de los hidroxilos a cetona), pseudobase carbinol (hidratación de la estructura) y pseudobase calcona (se produce la hidrólisis del éter, quedando una cadena abierta), siendo la primera la más estable de las cuatro (**Figura 4**). La proporción entre estas formas está determinada principalmente por el pH, predominando el ión flavilio (básicamente el 100%) en medios muy ácidos, de $pH < 2$. Al elevarse el pH, la mayor parte del ión flavilio, de color rojo intenso, pierde el protón y se produce hidratación, formándose la pseudobase incolora carbinol que, al aproximarnos a pH neutro, se transforma dando lugar a una forma abierta o chalcona, que pueden ser neutras e incoloras, o ionizadas, con coloración amarilla. A valores de pH superiores a siete se presentan las formas quinoidales, de color azul-púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Hutchings, 1999). Existen tres tipos de reacciones básicas implicadas en estos cambios estructurales:

- i) equilibrio de transferencia de protón;
- ii) hidratación covalente del catión;
- iii) tautomería ciclo-cadena. (Castañeda-Sánchez and Guerrero-Beltrán, 2015; Garzón, 2008; Rivas et al., 2003).

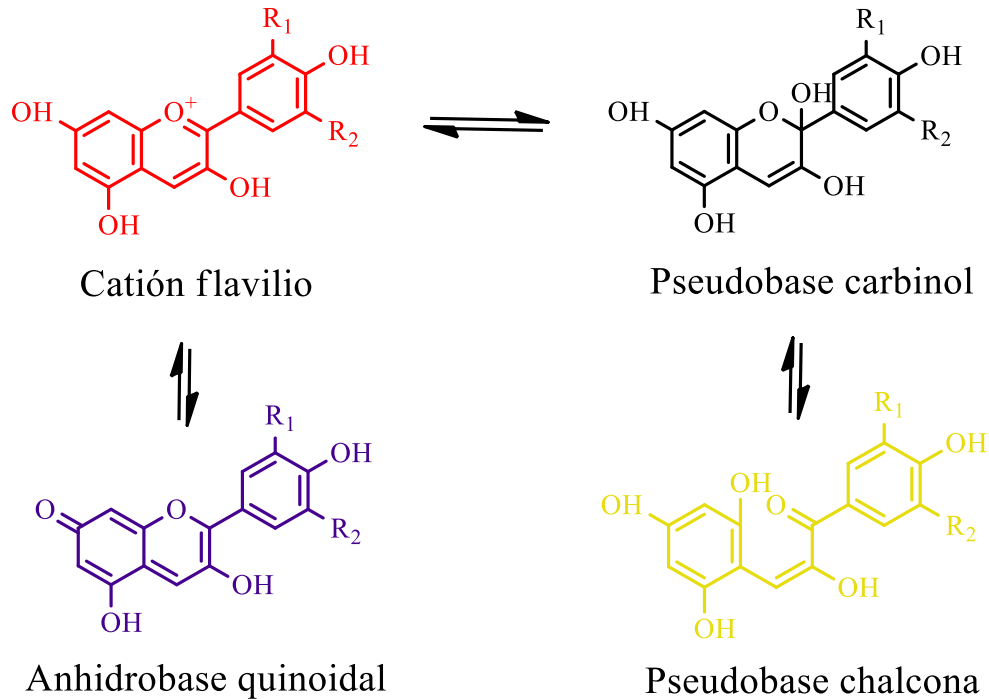


Figura 4. Estructuras en equilibrio en medio acuoso de antocianidinas.

Efecto de la temperatura. Incrementos de temperatura resultan en pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras y disminución de la estabilidad (Castañeda-Sánchez and Guerrero-Beltrán, 2015; Garzón, 2008; Timberlake, 1980).

Efecto de la luz. Varios autores coinciden en que la radiación luminosa acelera la degradación de las antocianinas (Sun et al. 2011).

El proceso de extracción es extremadamente importante en la producción de colorantes naturales. Por ello, diferentes grupos de investigación han dedicado un gran esfuerzo en desarrollar procesos extractivos eficientes (Fortalezas et al. 2010). Comúnmente, la técnica más usada para extraer de material vegetal los compuestos antioxidantes, predominantemente antocianinas, es la extracción sólido-líquido asistida por energía calorífica (EAC), que, si es óptimamente realizada, debería maximizar la extracción de los compuestos diana sin degradarlos, a la vez que servirse de tecnologías que sean respetuosas con el medioambiente, resultando en productos ricos en antocianinas con alta capacidad antioxidante. Por otro lado, ciertos grupos de investigación han utilizado la extracción asistida por energía de ultrasonidos (EAU) para obtener extractos de pigmentos como antocianinas (Chen et al. 2007; Corrales et al. 2008; Fortalezas et al. 2010; Ghassempour et al. 2008), carotenoides (Sun et al. 2011) y betalaínas (Sivakumar



et al. 2009; Vieira et al. 2013). La EAU puede mejorar la transferencia de masa, reduciendo así el tiempo de procesado y el consumo de solvente, si se compara con el uso de métodos convencionales (Vilkhu et al. 2008). Los ultrasonidos promueven que el solvente penetre en el producto gracias a la desorganización de las paredes celulares por cavitación acústica (Rastogi 2011; Vieira et al. 2013; Vilkhu et al. 2008). Algunos estudios sugieren que es preferible el uso de amplitudes bajas para la extracción de antocianinas mediante ultrasonidos, con el objeto de disminuir la degradación de los compuestos de interés (Cheok et al. 2013). El uso de una u otra técnica, así como las condiciones en que se llevan a cabo, dependen de la matriz vegetal de la que se trate y, por lo tanto, deben optimizarse el solvente, la energía y el tiempo aplicados (Pinela, Barros, et al. 2016; Pinela, Prieto, et al. 2016). Dicha optimización se lleva a cabo comúnmente mediante la aplicación de modelos matemáticos, como la metodología de superficie de respuesta (RSM), cuyo diseño permite la optimización simultánea de las variables teniendo en cuenta las interacciones complejas de las mismas, y ayuda en la predicción y maximización de las respuestas (Bezerra et al. 2008; Ferreira et al. 2007).

La extracción de antocianinas es comúnmente llevada a cabo con metanol o etanol conteniendo una pequeña cantidad de ácido (hasta un máximo de 15% de ácido clorhídrico (HCl, 1M) con el objetivo de obtener la forma del catión flavilio, es decir, la más estable. No hay diferencia significativa en lecturas de absorbancia o eficiencia de extracción entre el etanol y metanol (Abdel-Aal, Young, and Rabalski 2006), pero es preferible usar etanol ya que es menos tóxico, particularmente en usos alimenticios y ensayos clínicos. Adicionalmente, si los extractos contienen materiales lipídicos, la adición de un solvente orgánico tal como hexano al extracto puede eliminar algunas sustancias que contenga dichos materiales. El ácido puede causar hidrólisis parcial de las fracciones acil en antocianinas aciladas, especialmente en aquellas con ácidos dicarboxílicos tales como ácido malónico, por lo que el uso de ácidos débiles es deseable, tal como ácido tartárico o cítrico para mantener los sustituyentes dicarboxílicos intactos (Castañeda-Ovando et al. 2009; Escribano-Bailon, Santos-Buelga, and Rivas-Gonzalo 2004; Ortíz et al. 2011).

En la **Tabla 4** se recogen resultados de algunos estudios realizados.



Tabla 4. Diferentes técnicas de extracción para cianidina-3-*O*-glucósido.

Técnica extractiva	Planta	Parte	Condiciones extracción				Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido	Referencia	
			Solvente	Temp (°C)	Materia:solvente	Potencia (W)			Tiempo (horas)
EAC	<i>Ribes rubrum</i> L.	Fruto	Etanol (70%)	ta	50 g:100 mL	—	24	13,6864 mg/L	(Lapornik, Prošek, and
	<i>Ribes nigrum</i> L.	Fruto	Etanol (70%)	ta	50 g:100 mL		12	259,55 mg/L	Golc Wondra 2005)
	<i>Vitis sp.</i>	Fruto	Etanol (70%)	ta	50 g:100 mL		12	14,3392 mg/L	“
	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L.	Flores	Agua (100%)	ta	500 mg:50 mL		24	205,8 x10 ³ µg/100 g	(Mak, Chuah, Ahmad,
	<i>Cassia bicapsularis</i> L.	Flores	Etanol (100%)	ta	500 mg:50 mL		24	77,11x10 ³ µg/100 g	& Bhat, 2013)
	<i>Arbutus unedo</i> L.	Fruto	Metanol (80%)+0.5% TFA	ta	1 g:30 mL		1	11,40 µg/100 g	(Guimarães et al. 2013)
	<i>Prunus spinosa</i> L.	Fruto	Metanol (80%)+0.5% TFA	ta	1 g:30 mL		1	19,83 µg/100 g	(Guimarães et al. 2013)
	<i>Rosa canina</i> L.	Fruto	Metanol (80%)+0.5% TFA	ta	1 g:30 mL		1	0,68 µg/100 g	(Guimarães et al. 2013)
	<i>Rosa micrantha</i>	Fruto	Metanol (80%)+0.5% TFA	ta	1 g:30 mL		1	1,19 µg/100 g	(Guimarães et al. 2013)
<i>An ning</i>	Flores	Metanol (100%)+0.1% HCl	35	5 g:150 mL	10	353,6x10 ³ µg/100 g	(Ge and Ma 2013)		
EAU	<i>Garcinia mangostana</i> Linn	Corteza	Metanol (70%)+0.2% HCl	-	5 g:100 mL	100W	0.25	292 x10 ³ µg/100 g	(Cheok et al. 2013)
	<i>Nephelium lappaceum</i> L.	Fruto	Agua (100%)	50	1 g:20 mL	20W	0.17	10,16 x10 ³ µg/100 g	(Maran and Priya 2014)

ta: temperatura ambiente



1.5. *Arbutus unedo* L.

Arbutus unedo L., más comúnmente conocido como madroño, madroñera, borrachín, alboroceda o alborno, es un arbusto perteneciente a la subfamilia *Vaccinioideae* (o *Arbutoideae*, según los diferentes autores) de la familia *Ericaceae*. (Miguel et al. 2014). Basándonos en su etimología, *Arbutus* significa “arbolito” y *unedo*, “comer solo uno”, lo que hace referencia al dolor de cabeza e incluso embriaguez que puede producir el consumo excesivo de sus frutos (una vez que están bien maduros, ya que de este modo son más gratos al paladar, al perder su acidez) (Quert Font, 1988; López, 2001).

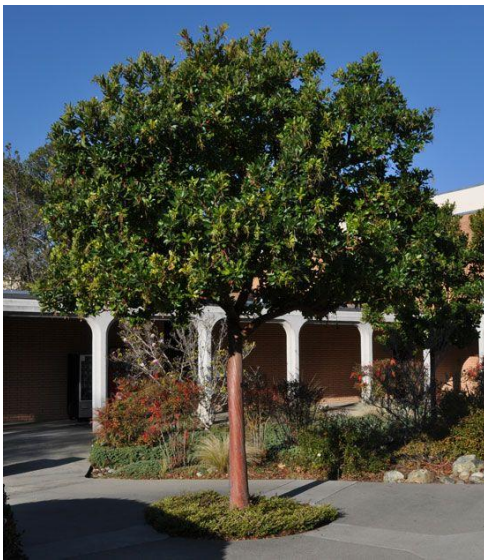


Figura 5. Diferentes perspectivas de *A. unedo* (Fuentes: Pinterest.com: izquierda; Limón, 2016: derecha).

El madroño es un arbusto o arbolito que puede llegar a medir hasta 8-10 m de altura, aunque habitualmente no supera los 3-5 m (**Figura 5**) (López 2001), pero puede hacerse árbol si se deja crecer a sus anchas (Quert Font 1988), mayormente dónde haya tierra sustanciosa, agua abundante y pH preferiblemente ácido, aunque poco alejado de la neutralidad (5–7.2) (Miguel et al. 2014), aunque su versatilidad ambiental la permite vivir en situaciones diferentes, participando en la formación de distintas agrupaciones vegetales de estructura y composición florística diversa (Rosúa et al. 2001), de ahí que su hábitat corresponda a los torrentes de las umbrías mediterráneas, el Sur y Suroeste de Europa, extendiéndose hacia el norte hasta el Suroeste de Irlanda, y encontrándose en espesuras perennifolias, linderos de bosques y laderas rocosas (Polunin 1989) de hasta



1200 m de altitud en ciertas ocasiones, tanto en terrenos calcáreos como silíceos, aunque, siguiendo la línea de las ericáceas, prefiere los últimos (Rosúa et al. 2001).



Figura 6. Localización geográfica del fruto de *A. unedo* (izquierda), detalle de corteza (centro) y hojas (derecha) de *A. unedo* (Fuente: Cecilia Jiménez).

La corteza del tronco (**Figura 6**) es de color pardo-rojiza o pardo-grisácea, muy escamosa, que se desprende fácilmente en plaquitas, las ramillas a menudo son de un color encarnado, abundantemente foliosas y muchas veces pilosas-granulosas. La copa es redondeada, espesa y oscura (López 2001). Las hojas son simples y perennemente verdes, brillantes por el haz y mates por el envés, como puede apreciarse en la **Figura 6**, en la fotografía de la derecha (Rosúa et al. 2001). Presentan disposición alterna, aunque se sitúan muy próximas unas a otras formando una especie de roseta; no son mucho menores que las del laurel, ya que miden 4-11 cm de longitud, y son lanceoladas u ovato-lanceoladas, dentadas o aserradas, con dientes ligeramente rojizos en el borde, algo correosas y sostenidas por corto rabillo (Quert Font 1988; Moro 1988).



Figura 7. Detalle de flores (izquierda) y frutos (derecha) de *A. unedo* (Fuente: Cecilia Jiménez).



Las flores, como se observa en la **Figura 7**, se disponen en panículas colgantes, formando ramilletes terminales, cortos y algo péndulos, con cinco pequeños sépalos soldados formando una sola pieza urceolada, de color crema tirando a verdoso o un poco sonrosado (Polunin 1989), de hasta 1 cm de longitud. Dentro de la corola se hallan los 10 estambres, con filamentos vellosos inferiormente y dos cuernecitos en cada antera. Los frutos son bayas globosas de 2-2.5 cm de diámetro (Quert Font 1988), amarillos que se vuelven de color carmesí fuerte en la madurez (Polunin 1989). Están erizados de pequeños gránulos, verrugas o picos (**Figura 7**); la pulpa es amarillenta y comestible, de textura farinácea, y contienen numerosas semillas de pequeño tamaño, color pardo y angulosas (Moro 1988).

El crecimiento es relativamente lento y sostenido, pero es una especie bastante longeva y con buena capacidad de reproducción, ya que aparte de por semilla, el madroño puede reproducirse por cepa, por lo que es frecuente obtener plantitas espontáneas que prenden con facilidad (Moro 1988). Florece a finales de verano o con las primeras lluvias otoñales; los frutos maduran al año siguiente, cuando la planta vuelve a florecer, de modo que se puede ver al mismo tiempo en flor y fruto, hasta que estos caen a finales de diciembre (Quert Font 1988). Popularmente en la zona de Vinhais (Portugal) se decía que eran frutos del diablo por el efecto que produce comerlos en exceso, y por eso se caían todos durante la Nochebuena, para evitar al hombre la tentación de comérselos (Carvalho 2010).

En el Norte de Portugal, más concretamente en los alrededores del Parque Natural de Montesinho, la sabiduría popular ha llevado a darle a esta planta varios usos: como combustible mediante la quema de los tallos, como planta ornamental adornando calles y jardines, como alimento para el ganado ovino y caprino, y para la preparación de licores y aguardiente (Carvalho 2010), uso que también se le da en España, donde, a modo de dato curioso, antiguamente se utilizaban más que actualmente para adornar los parques de los castillos, por el verde alegre de su follaje, su floración tardía y lo vistoso de sus frutos; sin embargo, se intentó plantar un cordón ornamental de madroños en ambos lados de una de las avenidas más importantes de Madrid, pero, desgraciadamente y debido a la excesiva contaminación que allí se constata, no han crecido debidamente y muchos han perecido (Moro 1988).



Respecto a su composición, la corteza contiene abundantes taninos (hasta 36 %), por lo que se emplea como curtiente. También las hojas y los vástagos jóvenes poseen la misma cantidad de materia tánica, y, además, un glucósido llamado unedósido, cuya hidrólisis produce unedol; cantidades imponderables de hidroquinona, sacarosa, etc. (Quert Font 1988).

Las hojas han sido utilizadas en medicina tradicional como astringentes, diuréticas, laxantes y vasodilatadoras y se utilizan en infusión en polvo para el tratamiento de la hipertensión (Miguel et al. 2014). Varios estudios le atribuyen también propiedades antioxidantes. Además, las hojas y la corteza, por su poder antiséptico, se usan para combatir las infecciones urinarias, las cistitis, los cálculos y cólicos renales, así como en casos de diarreas y disenterías. Las decocción con las hojas y la corteza secas se utilizan para afecciones urinarias (ingieren 2 o 3 tazas diarias) y para la diarrea (4 o 5 tazas diarias) (Quert Font 1988).

Los frutos están constituidos por una amplia variedad de compuestos, clasificados según su naturaleza química (Guimarães et al. 2013; Miguel et al. 2014):

Compuestos fenólicos: las subclases presentes y las cantidades de las mismas varían según la región geográfica, siendo uno de los grupos que presenta mayores diferencias. En Portugal, se determinaron como compuestos mayoritarios los flavan-3-oles (36,30 mg/100 g), como (+)-catequina (13,51 mg/100 g), procianidinas; derivados del ácido gálico (24,63 % mg/100 g); antocianinas (13,77 mg/100 g), principalmente cianidina-3-*O*-glucósido (la mayoritaria), delphinidina-3-*O*-glucósido y cianidina-3-*O*-pentosido; y flavonoles (10,86 mg/100 g), mayormente derivados de quercetina.

Vitaminas y otros: se encuentran en mayor cantidad en frutos inmaduros. Principalmente contienen vitamina E (α -, γ -, β - y δ -tocoferol), vitamina C (ácidos ascórbico y dehidroascórbico), β -caroteno, licopeno y triterpenos.

Ácidos orgánicos: su presencia normalmente va disminuyendo con la madurez y depende de la zona geográfica de dónde proceda el fruto, pudiendo encontrarse ácido málico y ácido quínico en frutos de Portugal, así como trazas de ácido fumárico, mientras que en Turquía este último es el ácido mayoritario, conteniendo también ácido láctico, málico, subérico y cítrico. En España, el ácido oxálico se presenta como mayoritario.



Azúcares: principalmente contienen fructosa (4-28 %) y glucosa (3-22 %), cuyas cantidades varían significativamente según la región en la que se encuentre y proporcionalmente al grado de madurez que presente el fruto. También se encuentran, aunque en menores cantidades, sacarosa y maltosa. En el Norte de Portugal, se han reportado cantidades de hasta 4,20 % de sacarosa, frente al 1,80 % en Turquía.

Sustancias volátiles: su presencia va disminuyendo conforme el fruto madura, lo que puede ser debido a la reducción de la actividad de la lipoxigenasa. Los compuestos mayoritarios en este grupo son alcoholes [(*Z*)-3-hexen-1-ol, 1-hexanol], seguidos de aldehídos [hexanal, (*E*)-2-hexenal] y ésteres [(*Z*)-3-hexenil acetato]. En bajas cantidades se encuentran también derivados de norisoprenoides, sesquiterpenos y monoterpenos. El aceite esencial obtenido del fruto está principalmente constituido por ácido hexadecanoico, etil dodecanoato, etil linoleato, ácido tetradecanoico y *trans*-carane.

Ácidos grasos: su concentración se ve poco afectada por el grado de madurez del fruto. Los mayoritarios son los insaturados (52%), entre los que destacan los ácidos α -linolénico, linoleico y oleico. El ácido graso saturado más importante que se encuentra presente es el palmítico.

Minerales: varían según las diferentes condiciones ambientales y la variedad de la que se trate, pero a modo general contienen K, Ca, P, Mg, Na como minerales mayoritarios (5000-10 mg/kg), y en menor cantidad, Fe, Cd, Cu, Ni, Mn y Zn (<10 mg/kg).

Ante la evidencia de que los frutos contienen buena cantidad de antocianinas, por los estudios realizados y el llamativo color que presentan, y que dicha materia prima es fácil de obtener en buenas cantidades en las zonas donde abundan, puede ser interesante utilizarlos como una nueva fuente de antocianinas, que contribuya, favorezca y promueva el uso de estos compuestos como colorantes naturales. Más aún, al ser la cianidina-3-*O*-glucósido el compuesto mayoritario dentro de la fracción de las antocianinas, podría ser ventajoso realizar, paralelamente, un estudio acerca de las bioactividades que presenta el extracto del fruto.



2. OBJETIVOS

El primer objetivo de este estudio fue comparar la extracción de antocianinas de frutos de *Arbutus unedo* L. mediante el uso de dos técnicas asistidas por diferentes energías físicas, el calor y los ultrasonidos. Para obtener las condiciones que maximizan la extracción de antocianinas, se usó una metodología de superficie de respuesta, utilizando el diseño compuesto central circunscrito de tres variables con cinco niveles. La identificación de los compuestos presentes en los extractos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de matriz de diodos y a un espectrómetro de masa con una fuente de ionización por electrospray (HPLC-DAD-ESI/MS).

El segundo objetivo fue estudiar el potencial del extracto natural rico en antocianinas obtenido como un aditivo natural con propiedades colorantes para reemplazar aquellos artificiales, cuya demanda va en decaimiento progresivo. Adicionalmente, las propiedades bioactivas del extracto fueron analizadas, en concreto, sus capacidades antioxidantes, antimicrobianas y citotóxicas. La estabilización del extracto se realizó teniendo en cuenta las principales variables involucradas (tiempo, temperatura y pH) en las condiciones más desfavorables de conservación (solución acuosa). Las respuestas se midieron a través de los contenidos en antocianinas, determinados por HPLC-DAD. Se usaron ecuaciones mecánicas y fenomenológicas para describir las respuestas, y se proporcionaron patrones de la estabilidad del extracto rico en antocianinas en solución acuosa.

Como último objetivo, se analizó la incorporación del extracto en gofres, como un caso práctico de su posible aplicación en matrices alimentarias, en este caso, en productos de pastelería. La estabilidad completa del perfil nutricional, los azúcares libres, los ácidos grasos y la actividad antioxidante de los gofres se controlaron en el tiempo 0, es decir, justo después de que fueran horneados, y después de 3 y 6 días de almacenamiento.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras

Los frutos de *Arbutus unedo* L. (madroño) fueron proporcionados por un productor local de Torre de Moncorvo, Portugal. Se liofilizaron (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EE.UU.) y se pulverizaron (~20 mallas). El polvo obtenido se mezcló para garantizar la homogeneidad de las muestras, y se almacenó en un congelador (-20 °C) protegido de la luz, hasta un análisis posterior.

3.2. Patrones y reactivos

El ácido fórmico, el etanol y el acetonitrilo de grado HPLC fueron obtenidos de Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). El estándar de cianidina-3-*O*-glucósido fue adquirido de Polyphenols AS (Sandnes, Noruega). El agua se trató en un sistema de purificación Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, EE.UU.).

El 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) procede de Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EE.UU.). El estándar del éster metílico para ácidos grasos (FAME), la mezcla 37 (estándar 47885-U), se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.), así como otros isómeros individuales de ácidos grasos, el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), la elipticina, la sulforodamina B (SRB) y los patrones de azúcares (fructosa, glucosa, sacarosa y melecitosa). El agar Mueller-Hinton y el agar extracto de malta (MA) se obtuvieron del Instituto de Inmunología y Virología de Torlak (Belgrado, Serbia). Se adquirieron medios de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina, una solución de aminoácidos no esenciales (2 mM) y otra de penicilina/estreptomicina (100 U/mL y 100 mg/mL, respectivamente) medio RPMI-1640 y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), de Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, EE.UU.), así como el ácido sulfúrico y el HCl. Todos los demás reactivos se adquirieron en tiendas especializadas.



3.3. Optimización y comparación de técnicas extractivas (EAC y EAU) para obtener antocianinas a partir de frutos de *Arbutus unedo* L.

3.3.1. Técnicas extractivas

A partir de una combinación de experimentos preliminares de una única variable y de una extensa revisión bibliográfica, se seleccionaron las variables relevantes, así como sus rangos apropiados, para cada una de las técnicas de extracción empleadas. En la **Tabla 5** se muestra una descripción detallada de los rangos de estudio para las variables seleccionadas en cada una de las técnicas de extracción. La relación sólido/líquido (*S/L*, gramos de materia prima por litro de solvente, constituido por una mezcla hidroalcohólica en nuestro caso) se mantuvo constante (30 g/L) para ambas técnicas.

3.3.1.1. Extracción asistida por calor (EAC)

Las muestras pulverizadas de los frutos (600 mg) se colocaron en frasquitos con 20 mL de solvente (acidificado con 0.05 % de HCl) para obtener la relación *S/L* deseada (30 g/L), y se introducían en un baño de agua termostático bajo agitación electromagnética, usando un Agitador Magnético Cimarec™ i micro, a una velocidad constante de agitación (500 rpm, Thermo Scientific, San Jose, CA, EE.UU.). Las variables y rangos evaluados fueron: *tiempo* (*t* o X_1 , 19,5 a 120,5 min), *temperatura* (*T* o X_2 , 21,4 a 88,6 °C) y *porcentaje de etanol del solvente* (*S* o X_3 , 0 a 100 %).

3.3.1.2. Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)

La extracción mediante ultrasonidos se llevó a cabo en un dispositivo ultrasónico (sonicadores QSonica, modelo CL-334, Newtown, Connecticut, EE.UU.). Las muestras (1,5 g) se extrajeron en 50 mL de solvente (acidificado con 0.05 % de HCl), manteniendo, así, la misma relación *S/L* de 30 g/L. En este caso, las variables y sus rangos fueron el *t* (o X_1 , 4,8 a 55,2 min), la *potencia* del aparato (*P* o X_2 , 98,6 a 401,4 W) y *S* (o X_3 , 0 a 100 %), mientras que la temperatura se controló para que se mantuviera por debajo de 30-35 °C, gracias a un baño de hielo.

3.3.2. Identificación y cuantificación de antocianinas

3.3.2.1. Pretratamiento de las muestras obtenidas del proceso de optimización

Después de los procesos extractivos, las soluciones de extracto se centrifugaron (centrífuga refrigerada Centorion K24OR) para separar el sólido, y los sobrenadantes se



filtraron a través de un filtro Whatman n° 4. Se separaron 10 mL y se dejaron evaporar en una estufa a 35 °C durante 24 h para eliminar el solvente y saber el peso seco extraído. Acto seguido, los pigmentos de antocianina secos se eluyeron adicionalmente con 5 mL de etanol:agua (20:80 v/v) acidificado y se filtraron a través de un disco de filtro LC desechable de 0,22 µm para el análisis por HPLC.

3.3.2.2. Análisis mediante HPLC-DAD-ESI/MS

Los extractos se analizaron utilizando un sistema de HPLC-DAD-ESI/MS (Dionex Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, EE.UU.). La separación se consiguió en una columna C18 de fase reversa Waters Spherisorb S3 ODS-2 C₁₈, (3 µm, 4,6 mm x 150 mm) (5 µm, 150 mm × 4,6 mm de diámetro interno) termostática a 35 °C. Los solventes utilizados fueron: (A) 0,1 % ácido trifluoroacético (TFA) en agua, y (B) 100 % acetonitrilo. El gradiente utilizado fue: 10 % de B durante 3 minutos, de 10 a 15 % de B durante 12 minutos, 15 % de B durante 5 min, de 15 a 18 % de B durante 5 min, de 18 a 30 % de B durante 20 min y de 30 a 35 % de B durante 5 min, y de 35 a 10 % de B durante 10 min. El tiempo total de cada análisis fue de 60 minutos, seguido del reacondicionamiento de la columna durante 10 minutos, utilizando en todo momento un caudal de 0.5 mL/ min. La doble detección se llevó a cabo por DAD, utilizando 520 nm como longitud de onda preferente, y por espectrometría de masas (MS). La MS se realizó en modo positivo, utilizando un espectrómetro de masas Linear Ion Trap LTQ XL (Thermo Finnigan, San José, CA, EE. UU.), equipado con una fuente ESI. El nitrógeno sirvió como gas envolvente (50 psi); operando con un voltaje de pulverización de 4.8 kV, a una temperatura de 320 °C, y un voltaje capilar de 14 V. El desplazamiento de la lente del tubo se mantuvo a un voltaje de 75 V. El escaneo completo cubrió el rango de masa de m/z de 100 a 1500. La energía de colisión utilizada fue de 20 (unidades arbitrarias). La adquisición de datos se realizó con el sistema de datos Xcalibur® (Thermo Finnigan, San José, CA, EE. UU.). Las antocianinas presentes en las muestras se caracterizaron de acuerdo con sus espectros ultravioleta y de masa, y los tiempos de retención en comparación con los estándares auténticos. Se encontraron e identificaron un total de tres compuestos de antocianina: delfinidina-3-*O*-glucósido (C1), cianidina-3-*O*-glucósido (C2) y cianidina-3-*O*-pentósido (C3). Para el análisis cuantitativo, se obtuvo una curva de calibración de 5 niveles por inyección de



concentraciones conocidas (50 - 0,25 $\mu\text{g/mL}$) de cianinina-3-*O*-glucósido ($Y = 243287x - 1000000$; $R^2 = 0,9953$).

3.3.3. Análisis de la respuesta y formato de los valores de respuesta para la presentación de resultados

3.3.3.1. Valores de respuesta para la presentación de resultados

Los tres compuestos de antocianina (C1, C2 y C3) más la suma total de todos los compuestos de antocianina (CT) fueron las respuestas cuantificadas para cada técnica estudiada. Cada una de las respuestas (C1, C2, C3 y CT) se expresó en dos valores de formato diferentes: Y_1 , en μg de compuesto de antocianina por g de fruto seco ($\mu\text{g C/g}$ de fruto seco), que se utilizó específicamente para analizar los rendimientos de extracción de cada compuesto; y Y_2 , en μg de cada uno de los compuestos contenidos en el residuo extraído ($\mu\text{g C/g R}$), que se utilizó específicamente para evaluar la pureza de antocianinas en los extractos. Además, se cuantificó el *rendimiento* (%) del extracto producido, que proporciona información sobre el residuo extraído (R) por cada g de material seco (g de R/g de fruto seco).

3.3.4. Diseño experimental, modelo de análisis y evaluación estadística

3.3.4.1. Diseño experimental

El estudio del impacto de las variables independientes seleccionadas se llevó a cabo utilizando un factor cada vez, para elegir el más influyente y para determinar el rango inicial de dichas variables estudiadas. A través del análisis de estos resultados experimentales, X_1 (en min), X_2 (en $^{\circ}\text{C}$ para EAC, o en W para EAU) y X_3 (en %) fueron elegidos como variables para el diseño RSM. Además, se estudió el efecto combinado de estas tres variables utilizando un diseño central compuesto circunscrito (DCCC), utilizando cinco niveles para cada uno de ellos (Heleno et al. 2016). Así, este diseño produce 20 combinaciones de respuestas, seis de las cuales son réplicas en el punto central del experimento y las demás son puntos experimentales independientes ubicados alrededor del centro en disposición esférica. El punto central se supone que está cercano a la posición óptima para la respuesta, por lo que se repite para maximizar la predicción. Con el fin de minimizar los efectos impredecibles en las respuestas observadas, los ensayos experimentales fueron aleatorios. Las expresiones matemáticas utilizadas para



calcular la distribución del diseño y para codificar y decodificar las variables probadas se pueden encontrar con detalle en la **Tabla 5**.

3.3.4.2. Modelo matemático

Los modelos de RSM se ajustaron mediante el cálculo de mínimos cuadrados usando la siguiente ecuación (Ec.) polinomial de segundo orden:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^n b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 \quad [1]$$

donde Y es la variable dependiente (variable de respuesta) a modelizar, X_i and X_j definen las variables independientes, b_0 es el coeficiente constante, b_i es el coeficiente de efecto lineal, b_{ij} es el coeficiente del efecto de la interacción, b_{ii} los coeficientes de efecto cuadrático y n es el número de variables. Como respuestas se utilizaron, los tres formatos de valores, Y_1 , Y_2 y *rendimiento*.

3.3.4.3. Procedimiento para optimizar las variables a su máxima respuesta

Para la optimización de la extracción de antocianinas, se logró un proceso maximizado de las respuestas producidas por el modelo, utilizando una herramienta de método simple para resolver problemas no lineales (Vieira et al. 2017). Se hicieron limitaciones a los valores codificados de las variables para evitar condiciones antinaturales (por ejemplo, t_s inferiores a 0)

3.3.5. **Análisis dosis-respuesta de la relación sólido/líquido**

Una vez que se determinaron los valores de las variables (X_1 , X_2 y X_3) que maximizan la extracción, la siguiente etapa de optimización fue describir el patrón de la relación S/L (o X_4 , expresada en g/L), en vista de una posible aplicación industrial. Siguiendo dichas condiciones óptimas de t (X_1), T o P (X_2), y S (X_3), se realizó un análisis para describir el comportamiento de la relación S/L (X_4), utilizando la ecuación de vatios (W) con algunas modificaciones para ajustarse a nuestros propósitos (Prieto, Curran, et al. 2015), como puede observarse:

$$W(S/L) = K \left\{ 1 - \exp \left[-\ln 2 (S/L/m)^a \right] \right\} \quad [2]$$



donde K es el valor máximo de extracción (unidades dependientes del formato de respuesta usado, por ejemplo, si se trata de Y_1 , las unidades serían $\mu\text{g C/g}$ de fruto seco), m (en las unidades de la relación S/L , en este caso g de fruto seco por L de solvente) se refiere a la dosis requerida para alcanzar el 50 % del valor máximo de extracción (K) y a es un parámetro de forma relacionado con la pendiente máxima de la respuesta. El parámetro de la velocidad del proceso (v , por ejemplo, si se evalúa el criterio de respuesta Y_1 , las unidades serían $\mu\text{g C/g}$ de fruto seco por g de fruto seco/ L) se pueden obtener usando los valores paramétricos de la Ec. [2] como sigue:

$$v = \frac{K\alpha}{m} (\ln 2)^{1/a} G^G \exp(-G); \text{ donde } G = \frac{\alpha - 1}{\alpha} \quad [3]$$

El parámetro v proporciona la información relativa al valor medio decreciente de la extracción en función del incremento de la variable S/L . Por lo tanto, los valores de los tres parámetros K , m y v , pueden utilizarse para evaluar las tendencias de la relación S/L .

3.4. Producción de un extracto rico en antocianinas a partir de frutos de *Arbutus unedo* L. siguiendo las condiciones óptimas, para estudiarlo como colorante natural en escala preindustrial

El extracto rico en cianidina-3-*O*-glucósido se obtuvo de *A. unedo* L. siguiendo el proceso previamente optimizado. Resumiéndolo brevemente, las muestras (7.5 g) se colocaron en frascos cerrados con 500 mL de etanol acidificado (con 0,05 % de HCl) al 80 %, siguiendo la relación S/L deseada (15 g/ L). Los frascos se colocaron en un baño de agua termostático bajo agitación electromagnética continua usando un Agitador Magnético Cimarec™ i con una velocidad de agitación fija (500 rpm, Thermo Scientific, San José, CA, EE. UU.), durante 5 min y a 90 °C. Luego, la solución de extracto se centrifugó (centrífuga refrigerada Centorion K24OR), se filtró a través del papel Whatman n° 4 y se evaporó en rotavapor a 35 °C para eliminar el etanol, quedando una solución más concentrada del colorante, que fue liofilizada (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EE.UU.) para los posteriores ensayos. Siguiendo este procedimiento, se puede obtener un extracto residual del ~60 % del fruto total seco, con un contenido total de antocianinas de ~500 $\mu\text{g/g}$ de fruto seco o ~800 $\mu\text{g/g}$ de residuo de extracto (R).



3.5. Determinación de las propiedades bioactivas y toxicidad del extracto producido

3.5.1. Bioactividades

3.5.1.1. Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad captadora de radicales (RSA) de DPPH fue realizada utilizando un lector de microplacas ELX800 (Bio-Tek instruments, Inc; Winooski, VT, EUA). Se realizaron diluciones del extracto, obteniendo distintas concentraciones que se depositaron en placas de 96 pocillos (30 μ L), donde se adicionaron 270 μ L de una disolución metanólica de DPPH (6×10^{-5} mol/L). Después de un intervalo de 60 min en ausencia de luz, se midió la reducción del radical DPPH a través de la lectura de absorbancia a 515 nm. La RSA se calculó como el porcentaje de decoloración de DPPH, usando la fórmula:

$$\% RSA = [(A_{DPPH} - A_S) / A_{DPPH}] \times 100$$

donde A_S es la absorbancia de las muestras a 515 nm y A_{DPPH} es la absorbancia de la solución de DPPH. Los resultados se expresan en base a la concentración de la muestra capaz de inhibir el 50 % de los radicales DPPH (EC_{50}).

3.5.1.2. Poder reductor (PR)

Este ensayo se desarrolló empleando el lector de microplacas descrito anteriormente. Las diferentes concentraciones del extracto (500 μ L) se mezclaron con 500 μ L de tampón fosfato de sodio (200 mmol/L; pH 6,6) y 500 μ L de ferricianuro de potasio (0,1 % p/v). La mezcla se incubó a 50 °C durante 20 min. Una vez finalizado este periodo, se adicionaron 500 μ L de ácido tricloroacético (TCA, 10 % p/v) y se transfirieron 800 μ L de la solución final a placas de 48 pocillos, donde se adicionaron otros 800 μ L de agua desionizada y 160 μ L de cloruro de hierro. De la misma forma, se preparó un blanco con el solvente de extracción. La absorbancia se midió a 690 nm. Se evaluó el PR por la capacidad de convertir Fe^{3+} a Fe^{2+} , los resultados se expresan en base a la concentración del extracto que muestra el 0,5 de absorbancia (EC_{50}), que se calculó a partir del gráfico de absorbancia a 690 nm frente a la concentración del extracto.



3.5.1.3. Inhibición de la decoloración de β -caroteno

Se preparó en primer lugar la solución de β -caroteno disolviendo 2 mg de β -caroteno en 10 mL de cloroformo. Se transfirieron 2 mL de esta solución a un matraz redondo donde se evaporó el disolvente en el rotavapor a 40 °C. Después se adicionaron 40 mg de ácido linoleico, 400 mg de Tween 80, 100 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente. Se transfirieron alícuotas de 4,8 mL de esta emulsión a tubos de ensayos que contenían las diferentes concentraciones del extracto (0,2 mL), se agitaron en un agitador Vortex y se midió a tiempo cero la absorbancia a 470 nm (espectrofotómetro AnalytikJena). Seguidamente se incubaron en baño a 50 °C durante 2 h, tras las que se determinó nuevamente la absorbancia a 470 nm. De la misma forma, se preparó un blanco control con el solvente de extracción. La inhibición de la decoloración de β -caroteno se evaluó a través del ensayo β -caroteno/linoleato, que se basa en determinar la neutralización de los radicales libres del linoleato, lo que evita la decoloración del β -caroteno, que es cuantificada por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Decoloración} = (A_{\text{después 2h}}/A_{\text{inicial}}) \times 100$$

Los resultados se expresan en base a la concentración del extracto que muestra el 50 % de la capacidad antioxidante (EC_{50}), que se calculó a partir del gráfico del porcentaje de decoloración frente a la concentración del extracto.

3.5.1.4. Inhibición de la peroxidación lipídica utilizando sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para la realización de este ensayo se empleó tejido cerebral de cerdo (*Sus scrofa*), que se homogeneizó en frío con tampón tris-HCl (20 mM; pH 7,4), centrifugando (centrífuga refrigerada Centorion K24OR) a 3500g durante 10 min, con el fin de producir un homogeneizado de tejido cerebral en proporción 1:2 (p/v). Se incubó una alícuota de 100 μ L de sobrenadante con las diferentes concentraciones del extracto (200 μ L), en presencia de 100 μ L de $FeSO_4$ (10 μ M) y 100 μ L de ácido ascórbico (0,1 mM), a 37 °C durante 1 h. La reacción se finalizó con la adición de 500 μ L TCA (28 %, v/v), seguida de 380 μ L de ácido tiobarbitúrico (2 %, p/v), colocándose la mezcla en baño a 80 °C durante 20 min. A continuación, se centrifugó a 3000g durante 10 min, para eliminar el precipitado de proteínas, y se midió la intensidad del color del sobrenadante a través de su absorbancia a 532 nm. De la misma forma, se preparó un blanco con el solvente de



extracción. La inhibición de la peroxidación lipídica fue evaluada por la disminución TBARS; la intensidad de color del ácido tiobarbitúrico-malondialdehído (MDA-TBA) fue medida por su absorbancia a 532 nm; y el porcentaje de inhibición se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [(A - B)/A] \times 100$$

donde A es la absorbancia del blanco y B la absorbancia de la muestra. Los resultados se expresan en base a la concentración del extracto que muestra el 50 % de la inhibición de la peroxidación lipídica (EC_{50}), que se calculó a partir del gráfico del porcentaje de inhibición TBARS frente a la concentración del extracto (Barros et al. 2013).

3.5.1.5. Evaluación de la citotoxicidad

La actividad citotóxica se evaluó siguiendo la metodología previamente descrita por (Guimarães et al. 2013), utilizando 4 líneas de células tumorales humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (cáncer de pulmón no microcítico), HeLa (carcinoma cervical) y HepG2 (carcinoma hepatocelular). Las células se mantuvieron rutinariamente como cultivos celulares adherentes en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 mg/mL, a 37 °C, en una incubadora de aire humidificado que contenía 5 % de CO₂. Cada línea celular se inoculó en una densidad apropiada ($1,0 \times 10^4$ células/pocillo) en placas de 96 pocillos y se dejaron adherir durante 24 h. Las células se trataron luego durante 48 h con diversas concentraciones de extracto. Después de este período de incubación, las células adherentes se fijaron mediante la adición de TCA al 10 % frío (100 µL) y se incubaron durante 60 min a 4 °C. Las placas se lavaron luego con agua desionizada y se secaron. Acto seguido, se añadió la solución de SRB (0,1 % en ácido acético al 1 %, 100 µL) a cada placa y se incubaron durante 30 minutos a t.a.. La SRB sobrante (no unida) se eliminó mediante lavado con ácido acético al 1 %. Las placas se secaron al aire, tras lo que la SRB unida se solubilizó con Tris 10 mM (200 µL) y la absorbancia se midió a 540 nm en un lector de microplaca ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.).

3.5.1.6. Evaluación de la hepatotoxicidad

Un cultivo de células fue preparado a partir de un hígado de cerdo, recién adquirido, obtenido de un matadero local y fue designado como PLP2. Resumiendo brevemente,



los tejidos del hígado fueron enjuagados en solución salina equilibrada de Hank conteniendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y divididos en explantes de 1x1 mm³. Algunos de estos explantes fueron colocados en frascos para tejidos de 25 cm², en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB, 2 mM de aminoácidos no esenciales y 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e incubado a 37 °C con atmósfera humidificada que contenía el 5 % de CO₂. El medio se cambió cada dos días. Se continuó el cultivo de las células con monitorización directa cada 2-3 días usando un microscopio invertido (Nikon Eclipse Ts 100) (Guimarães et al. 2013). La determinación fue realizada utilizando el método de SRB descrito en el apartado de la citotoxicidad.

3.5.1.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad antibacteriana se evaluó frente a cuatro bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* (ATCC 35210), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076)) y cuatro bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus cereus* (aislado de ambiente clínico), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240) y *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973)). Estos microorganismos fueron obtenidos del laboratorio de Micología del Departamento de Planificación de Plantas, del *Institute for biological research "Siniša Stanković"* de la Universidad de Belgrado, Serbia. Resumidamente, se ajustaron los cultivos frescos de bacterias, mediante espectrofotometría, a una concentración de 1x10⁵ CFU/mL. Las CFU/mL solicitadas correspondieron a una suspensión bacteriana determinada en un espectrofotómetro a 625 nm (DO₆₂₅). Diferentes diluciones del inóculo se cultivaron en un medio sólido para comprobar la ausencia de contaminación y comprobar la validez del inóculo. Las muestras se pipetearon en los pozos de las microplacas, que contenían previamente 100 µL de medio de digerido de soja (TSB) y 10 µL de inóculo que se añadió a todos los pocillos. Las microplacas se incubaron durante 24 horas a 37 °C. La concentración mínima que produjo una inhibición significativa (alrededor del 50%) del crecimiento de las bacterias, en comparación con el control positivo, se identificó como el *CFI* (concentración mínima inhibitoria), y fue determinada mediante la adición de 40 µL de iodinitrotetrazolio colorido (INT) (0,2 mg/mL), tras lo que se incubaron las placas a 37 °C durante 30 min antes de realizar la lectura. Los *CFIs* obtenidos para las diferentes bacterias, utilizando las muestras



examinadas, también se determinaron por el método colorimétrico microbiano de viabilidad, basado en la reducción del color del INT, y comparado con un control positivo para cada una de las bacterias (Soković et al. 2010).

También se evaluó la actividad antifúngica frente a siete hongos: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium ochrochloron* (ATCC 9112), *Candida crusei* (aislado de ambiente clínico) y *Penicillium verrucosum* (aislado de alimentos). Estos organismos también se obtuvieron del laboratorio de Micología, del Departamento de Planificación de Plantas, del *Institute for biological research "Siniša Stanković"* de la Universidad de Belgrado, Serbia. Los hongos se mantuvieron en agar extracto de malta (MA) y los cultivos se almacenaron a 4 °C, subcultivándose una vez al mes. Las esporas de los hongos se lavaron de la superficie de placas de agar con solución salina estéril al 0,85% que contenía Tween 80 al 0,1% (v/v) y se ajustaron a una concentración de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ en un volumen final de 100 μL /pocillo. Los inóculos se almacenaron a 4 °C para su uso posterior. Las diluciones de los inóculos se cultivaron en MA sólido para verificar la ausencia de contaminación y para verificar la validez del inóculo. La determinación de *CMIs* se realizó mediante una técnica de dilución en serie utilizando microplacas de 96 pocillos. Las soluciones de las muestras se añadieron al MA que contenía el inóculo fúngico. Las microplacas se incubaron durante 72 h a 28 °C. Las concentraciones más bajas sin crecimiento visible (usando un microscopio binocular) se definieron como *CMI* (Soković and van Griensven 2006).

3.5.2. Evaluación de la respuesta y análisis estadísticos

Las muestras liofilizadas se redisolviaron en etanol (5 mg/mL), agua (8 mg/mL) y 5% DMSO (10 mg/mL) para las actividades antioxidante, de citotoxicidad y antimicrobiana, respetivamente. A continuación se prepararon diluciones sucesivas de concentraciones diferentes para la determinación de los valores de respuesta específicos para cada test realizado, como se detalla a continuación:

- Las respuestas antioxidantes se evaluaron a través de los valores de EC_{50} , en $\mu\text{g/mL}$ (concentración de la muestra que logró el 50 % de la actividad antioxidante, o el 0.5 de la absorbancia en el ensayo del PR). Como control positivo se utilizó el Trolox.



- Las respuestas de citotoxicidad y hepatotoxicidad se determinaron y se expresaron mediante los valores de GI_{50} , en $\mu\text{g/mL}$ (concentración de la muestra que consigue el 50 % de la inhibición del crecimiento celular neto, es decir, el 50 % de la actividad antitumoral).
- Las respuestas antimicrobianas se evaluaron mediante la CMI en $\mu\text{g/mL}$. La estreptomicina y la ampicilina fueron los compuestos usados como control positivo para el crecimiento bacteriano, así como el bifonazol y el ketoconazol se usaron para el crecimiento fúngico. El 5% dimetilsulfóxido (DMSO) se utilizó como control negativo

3.6. Estabilidad en sistemas de solución acuosa, que simulan matrices alimentarias, del extracto producido rico en antocianinas

3.6.1. Variables utilizadas para el procedimiento de estabilidad

El extracto producido (50 g) se disolvió en agua destilada acidificada (500 mL, al 0,05 % de HCl). Esta solución se dividió en 5 matraces diferentes con 100 mL cada uno, y se ajustó con la adición de HCl a diferentes valores de pH (2, 3,5, 5, 6,5 y 8). Luego, las muestras se subdividieron en viales ámbar de 2 mL (50 viales por cada pH testado) y las muestras se almacenaron a diferentes temperaturas (T) de 4, 25, 40, 55 y 70 °C para la monitorización de la estabilidad de las antocianinas a lo largo del tiempo (t). Las muestras se recogieron a diferentes valores de t del período de almacenamiento, dependiendo de la T aplicada, por ejemplo, para todos los valores de pH conservados a 4 °C solo se usaron 3 valores de t (0, 72 y 140 h), mientras que para los conservados a 70 °C se usaron 12 valores de t (0, 2, 4, 8, 12, 20, 48, 72, 96, 140, 164 y 190 h). Se recogieron un total de 250 puntos experimentales individuales para comprender la estabilidad de los compuestos del extracto en solución acuosa. Como criterios de respuesta, se analizó el contenido de antocianinas de cada punto mediante HPLC-DAD. Todas las medidas independientes se obtuvieron por triplicado ($n = 3$).



3.6.2. Procesamiento de los extractos, análisis de las respuestas y formato de los valores de respuesta para la presentación de resultados

3.6.2.1. Extractos y análisis de las respuestas

Una vez que transcurría el tiempo asignado a cada muestra, eran recogidas y se procesadas como se describe en la Sección 3.4, de modo que se sometieron a un pretratamiento para adecuarlos a la cuantificación mediante HPLC de los compuestos presentes en cada uno de ellos.

3.6.2.2. Valores de respuesta para la presentación de resultados

Los valores obtenidos de C1, C2, C3 y CT fueron las respuestas cuantificadas para el análisis de la estabilidad. Cada una de las respuestas (C1, C2, C3 y CT) se expresó en dos valores de formato diferentes: Y_1 , que se utilizó específicamente para analizar los rendimientos de extracción de cada compuesto; y Y_2 , que se utilizó específicamente para evaluar la pureza de antocianinas en los extractos. Además, se cuantificó el *rendimiento* del extracto producido.

3.6.3. Evaluación de las respuestas y análisis

El contenido de antocianinas se estudió como una función de ecuaciones funcionales comúnmente aplicada en procesos similares.

3.6.3.1. Modelo individual para el análisis de los efectos de la estabilidad

Para el efecto de t , se aplicó una función exponencial básica:

$$e(t) = k \exp(-rt) \quad [4]$$

donde k representa el punto inicial, y r es la tasa de descomposición de los compuestos.

El efecto de la T en la respuesta de estabilidad sigue el modelo de la ecuación de Arrhenius, que establece que la constante de velocidad de una reacción química es una función de la T absoluta, de acuerdo con la siguiente relación:

$$e(T) = A \exp\left(-\frac{Ea}{RT}\right) \quad [5]$$



donde el factor pre-exponencial A representa la frecuencia de las colisiones entre las moléculas que reaccionan, E_a es la energía de activación (kJ) y R , la constante de los gases (8.31 kJ/mol.K). En este contexto, A y E_a pueden considerarse como parámetros de ajuste.

Con respecto al efecto del pH en la respuesta de estabilidad, la solución característica para su descripción es una función exponencial, similar a la utilizada para el efecto t , que generalmente se encuentra en muchas respuestas del sistema biológico y puede expresarse de la siguiente manera (Komatsu et al., 2014; Prieto, Vázquez, & Murado, 2012b):

$$e(pH) = s \exp(-bpH) \quad [6]$$

donde s representa el punto inicial y b es la tasa de degradación de los compuestos.

3.6.3.2. Análisis multivariable

El desarrollo de un modelo teórico se ve facilitado en gran medida por la posibilidad de combinar todos los datos experimentales en una única curva maestra capaz de explicar simultáneamente todas las variables influyentes (Prieto, Vázquez, & Murado, 2012a). Tal solución permite controlar la mayoría de los factores que afectan al sistema, ayudando a estandarizar las variables clave para producir protocolos reproducibles y, por lo tanto, para obtener resultados reproducibles. A pesar de la existencia de resultados muy rigurosos en cuanto a la cinética de la curva y a los factores que afectan a la misma, en función de variables como T y pH (Prieto and Vázquez, 2014; Prieto et al., 2015a; Rosso et al., 1995; Tijssens et al., 1997), las soluciones simultáneas no se realizan siempre, y al aplicarlas, podemos proporcionar un conocimiento más amplio para comprender parcialmente los mecanismos que rigen el sistema.

Para poder desarrollar un análisis multivariable de estas tres variables, el enfoque lógico es insertar las ecuaciones que describen la respuesta del pH y la T en la Ec. [4], que gobierna la variable del t modificando sus parámetros: el valor inicial (k) y la tasa de degradación (r). Incluso si las tres variables son totalmente independientes, cualquier evento que pueda ocurrir en el entorno de una reacción siempre debe referirse a la variable t . Por lo tanto, una posible descripción global de la estabilidad a nivel molecular podría describirse mediante el siguiente enfoque:



$$e(t, pH, T) = k^* \exp(-r^* t) \quad \text{donde} \quad \begin{aligned} k^*(pH, T) &= k \times e(T) \times e(pH) \\ r^*(pH, T) &= r \times e(T) \times e(pH) \end{aligned} \quad [7]$$

donde k^* representa el punto inicial y r^* es la tasa de degradación de los compuestos causada por el efecto del t , como se describe en la Ec. [4], pero modificada por las ecuaciones que describen el efecto de la T (Ec. [5]) y el pH (Ec. [6]).

3.7. Incorporación del extracto rico en antocianinas producido como aditivo colorante natural en gofres, y evaluación de los parámetros del color, composición nutricional y actividad antioxidante de las muestras a lo largo del tiempo.

3.7.1. Preparación de los gofres

Se siguió una receta tradicional para preparar los gofres: 165 g de harina de trigo se mezclaron con 100 g de azúcar y 1 g de levadura. Luego, se añadieron poco a poco 130 g de mantequilla a la mezcla, mientras se agitaba vigorosamente con un mezclador eléctrico a 450 W durante 5 minutos y, por último, se añadieron 2 huevos y 20 mL de jugo de limón. Se prepararon dos lotes de gofres (18 unidades por lote, 6 gofres por cada tiempo de almacenamiento): i) control de gofres, sin aditivos naturales ni sintéticos; ii) gofres con extracto de *A. unedo* rico en cianidina-3-*O*-glucósido (5,50 g). Los gofres se hornearon en una máquina de gofres durante 10 minutos. Todas las muestras fueron congeladas, liofilizadas, finamente trituradas y analizadas por triplicado, inmediatamente después de la preparación y después de tres y seis días de almacenamiento (a t.a. y empaquetadas en bolsas de plástico selladas y envueltas en papel de aluminio).

3.7.2. Evaluación de la evolución del color y del pH de las muestras de gofres a lo largo del tiempo

El color de las muestras se midió en tres puntos diferentes: por ambos lados de los gofres y en su interior, usando un colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc., Tokio, Japón). Se utilizó el iluminador C y una abertura de diafragma de 8 mm, y se calibró previamente con un blanco estándar. Los valores de espacio de color (CIE) L^* (luminosidad), a^* (verde/rojo), b^* (azul/amarillo) se registraron utilizando un software de datos “Spectra Magic Nx” (versión CM-S100W 2.03.0006) (Fernandes et al. 2012).



El pH de las muestras se midió en tres puntos diferentes, introduciendo directamente en las muestras un medidor de pH HI 99161 (Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, EE.UU.).

3.7.3. Evaluación de la composición nutricional y de la actividad antioxidante de las diferentes muestras a lo largo del tiempo

Siguiendo métodos estandarizados, se determinó el contenido de proteínas, grasas, carbohidratos y cenizas. La energía total se calculó siguiendo la ecuación: $E \text{ (kcal)} = 4 \times (\text{g de proteínas} + \text{g de hidratos de carbono}) + 9 \times (\text{g de lípidos})$. El contenido de proteína total ($N \times 5,70$) se calculó como contenido de nitrógeno, por el método de Kjeldahl, mientras que el cálculo de la grasa contenida se basó en la extracción de muestras liofilizadas con éter de petróleo, utilizando un aparato Soxhlet. Por último, el contenido de ceniza se determinó mediante incineración a $550 \pm 15 \text{ }^\circ\text{C}$ (Barros et al. 2013).

Los ácidos grasos de las muestras fueron determinados por un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)/columna capilar, después del procedimiento de trans-esterificación, según el procedimiento previamente descrito por el grupo (Barros et al. 2013). La grasa obtenida después de la extracción por Soxhlet se sometió a un proceso de metilación con 5 mL de metanol:ácido sulfúrico:tolueno 2:1:1 (v:v:v), durante 12 h en baño maría a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ y 160 rpm; luego se añadieron 3 mL de agua desionizada, para obtener la separación de fases; se recuperaron los FAME añadiendo 3 mL de dietil éter, agitando en un agitador Vortex y pasando la fase superior a través de una micro-columna de sulfato de sodio anhidro, con el objetivo de eliminar el agua. La muestra fue recogida en un vial con Teflón y filtrada con un filtro nylon Whatman de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ antes de la inyección.

El análisis fue llevado a cabo en un sistema de cromatografía de gases modelo DANI 1000, equipado con un inyector *split/splitless* y un detector de ionización de llama (FID) a $260 \text{ }^\circ\text{C}$, así como una columna Macherey-Nagel (Düren, Alemania) (50 % cianopropil-metil-50 % fenilmetilpolisiloxano, 30 m x 0,32 mm i.d. x 0,25 μm). La temperatura del sistema fue programada de la siguiente manera: la temperatura inicial de la columna fue $50 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 min, luego se aumentaron $30 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta los $125 \text{ }^\circ\text{C}$, después se fueron aumentando $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta los $160 \text{ }^\circ\text{C}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta los $180 \text{ }^\circ\text{C}$, $3 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta los $200 \text{ }^\circ\text{C}$, y, por último, $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta los $220 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura que se mantuvo durante 15 min. El gas portador fue hidrogeno con un flujo de 4.0



mL/min (0.61 bar). La inyección *Split* fue realizada a 250 °C. La identificación de los ácidos grasos fue realizada por comparación de los tiempos de retención de los picos FAMES de las muestras con patrones estandarizados. Los resultados fueron recogidos y procesados usando el Software CSW 1.7 (DataApex 1.7), y expresados en porcentaje relativo de cada ácido graso.

Los azúcares libres se determinaron por HPLC acoplada a un detector de índice de refracción (RI), según el procedimiento ya descrito previamente (Barros et al. 2013). Las muestras en forma de polvo seco (1 g) fueron enriquecidas con melecitosa, para usarla como patrón interno (5 mg/mL de melecitosa), y los azúcares fueron extraídos con 40 mL de etanol al 80 %, a 80 °C y durante 30 min. La suspensión resultante fue centrifugada (Centurion K24OR refrigerated centrifuge, West Sussex, UK) a 15000 g durante 10 min. El sobrenadante fue concentrado a 60 °C bajo presión reducida y se realizaron, además, tres lavados sucesivos con 10 mL de éter etílico. Después de concentrarlo mediante evaporación del solvente a 40 °C, el residuo sólido obtenido fue disuelto en agua hasta un volumen final de 5 mL y se filtró a través de discos de nylon 0,22 µm (Millipore).

Tras el pretratamiento descrito, los azúcares fueron analizados utilizando un HPLC con un sistema integrado con una bomba (Knauer, Smartline system 1000, Berlin, Germany), sistema desgasificador (Smartline manager 5000), automuestreador (AS-2057 Jasco, Easton, MD, USA) y un detector RI (Knauer Smartline 2300). Los datos fueron analizados usando el Software Clarity 2.4 (DataApex). La separación cromatográfica se logró con una columna Eurospher 100-5 NH₂ (5 µm, 4,6 mm x 250 mm, Knauer), operando a 35 °C (7971 R horno Grace). La fase móvil consistió en acetonitrilo/agua desionizada, 70:30 (v/v) con un flujo de 1 mL/min. Los compuestos fueron identificados gracias a la comparación cromatográfica con patrones. La cuantificación se realizó usando el método del patrón interno y el contenido de azúcares fue expresado en g/100 g de gofre.

Para la evaluación de la actividad antioxidante, las muestras se sometieron a los ensayos de DPPH y PR, descritos en la Sección 3.5.1 Evaluación de la actividad antioxidante.



3.8. Métodos numéricos, análisis estadístico e ilustraciones gráficas

Todos los procedimientos de ajuste, las estimaciones de coeficientes y los cálculos estadísticos se realizaron con una hoja de cálculo de Microsoft Excel. La adaptación y el análisis estadístico de los resultados experimentales, según las ecuaciones propuestas, se llevaron a cabo en cuatro fases:

- *Determinación de los coeficientes*: las estimaciones paramétricas se obtuvieron mediante la minimización de la suma de las diferencias cuadráticas entre los valores obtenidos y los predichos por el modelo, utilizando el método no lineal de mínimos cuadrados (quasi-Newton) proporcionado por el macro Solver en Microsoft Excel 2003, que permite el análisis rápido de una hipótesis y de sus consecuencias (Murado and Prieto 2013).
- *Significancia de los coeficientes*: la determinación de los intervalos de confianza de los parámetros se realizó mediante 'SolverAid' (Prieto, Vázquez, and Murado 2015b). El modelo fue simplificado, desechando los términos que no fueron estadísticamente significativos para el valor de p ($p > 0,05$).
- *Consistencia del modelo*: el test F de Fisher ($\alpha=0,05$) se usó para determinar si los modelos construidos eran adecuados para describir los datos obtenidos.
- *Otros criterios de evaluación estadística*: Para volver a verificar la uniformidad del modelo, se aplicaron los siguientes criterios: i) Se utilizó la macro "SolverStat" para la evaluación de las incertidumbres de predicción de parámetros y modelos (Prieto and J. A. Vázquez 2014); ii) El R^2 se interpretó como la proporción de versatilidad de cada variable dependiente explicada por el modelo; iii) El coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}) fue una corrección de R^2 , teniendo en cuenta el número de variables utilizadas en el modelo; iv) Se calculó el sesgo y los factores de precisión de todas las ecuaciones para evaluar la calidad de la adaptación a los datos experimentales, como el error cuadrático medio (ECM), raíz del error cuadrático medio (RECM) y el error porcentual absoluto medio (EPAM); v) El coeficiente de Durbin-Watson (DW) se utilizó para verificar si los residuos del modelo no estaban autocorrelacionados; y vi) Se utilizó la tabla de análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el poder explicativo de las variables.



Los resultados obtenidos de la incorporación del extracto rico en antocianinas (composición nutricional y de la actividad antioxidante), se analizaron mediante una prueba de *t* de Student para determinar la diferencia significativa entre menos de tres muestras diferentes, con $p = 0,05$, y este tratamiento se llevó a cabo utilizando el programa SPSS v. 23,0.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización y comparación de las técnicas extractivas (extracción asistida por calor y extracción asistida por ultrasonidos) para obtener antocianinas a partir de frutos de *Arbutus unedo* L.

4.1.1. Experimentos preliminares para seleccionar las variables relevantes y los parámetros instrumentales, y centrar, así, sus dominios experimentales antes de aplicar el RSM

Las antocianinas han llamado la atención tanto del sector científico como del industrial debido a su amplia gama de posibles aplicaciones, incluyendo como aditivos colorantes para alimentos o como alimentos funcionales. Como metabolitos secundarios de la planta que son, la obtención de antocianinas se aborda principalmente mediante técnicas de extracción sólido-líquido de tejidos de plantas (Antolovich et al. 2000). Sin embargo, las características inherentes a las matrices, el tipo de solvente utilizado y la susceptibilidad de las antocianinas a la degradación en ciertos intervalos de temperatura, tiempo y pH, son variantes que dificultan la extracción de estos compuestos. Por lo tanto, la selección de un método extractivo adecuado, las proporciones correctas de solventes y las condiciones óptimas de extracción cobran especial relevancia. En este sentido, se han hecho esfuerzos para desarrollar y comparar los procesos de extracción con el objeto de mejorar los rendimientos de producción (Silva et al. 2017). Sin embargo, es difícil comparar los resultados de diferentes técnicas de extracción al usar diferentes muestras, ya que las variaciones entre matrices dificultan comparaciones directas. Por lo tanto, para proporcionar una mejor comprensión del potencial de las técnicas de extracción, en el presente trabajo, se compararon dos técnicas sólido-líquido, utilizando un conjunto similar de rangos para las principales condiciones de extracción. Las técnicas, los solventes y los rangos de las condiciones principales se seleccionaron según las razones discutidas a continuación.

4.1.1.1. Selección de las técnicas para el análisis comparativo

La extracción asistida por calor (EAC) es el método convencional de extracción sólido-líquido, utilizado con frecuencia para obtener compuestos de antocianinas a partir de matrices vegetales. El procedimiento consiste en agitar la muestra en un solvente, durante un cierto tiempo y a una temperatura específica. Es una técnica sencilla con



pocos requisitos en términos de equipamiento, pero con mucha frecuencia implica largos períodos de tiempo y/o altas temperaturas. Desde que las tecnologías verdes avanzaron y adquirieron importancia, un amplio espectro de procedimientos sólido-líquido está disponible y es bastante útil para la extracción de antocianinas. Algunas de estas tecnologías emergentes incluyen extracción supercrítica, extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción asistida por líquido presurizado (Alonso-Salces et al. 2001; Dai and Mumper 2010; Ince, Şahin, and Şümnü 2013). Como técnica alternativa para compararla con los métodos de EAC, se seleccionó la EAU, porque es una de las técnicas más adecuadas para extraer compuestos fitoquímicos debido a la rotura de las paredes celulares de la planta, causada por los efectos de cavitación, produciéndose así un aumento del área de contacto entre el sólido y el solvente (Ghasemzadeh et al. 2014; Herrera and Luque De Castro 2004; Pingret et al. 2012). Los EAU han sido reportados como una técnica energéticamente menos exigente, que, con frecuencia, permite una reducción del consumo de solventes y que, generalmente, produce extractos con rendimientos de pureza más altos que las técnicas convencionales.

4.1.1.2. Solvente más apropiado para la extracción de antocianinas

El tipo de solvente y su composición son factores clave para la extracción exitosa de los compuestos deseados. Los solventes normalmente utilizados para extraer antocianinas de los tejidos vegetales son agua, solventes polares (tales como metanol, etanol o acetona) y mezclas de solventes orgánicos acuosos (Piñeiro, Palma, and Barroso 2004; Vuong et al. 2010). Se sugieren solventes acidificados debido a la inestabilidad de las antocianinas a $\text{pH} > 4$. El tipo de ácido usado afecta la extracción de forma diferente, pero parece ser común la idea de que el ácido cítrico, HCl o TFA combinados con solventes polares constituyen la mejor combinación para la extracción de antocianinas. Muchos autores usan la acidificación de solventes; en este sentido, los resultados de la revisión de la literatura muestran que se obtienen cantidades significativamente mayores en las extracciones llevadas a cabo con la acidificación del solvente. Teniendo en cuenta los principios de la química verde, se seleccionaron mezclas binarias de etanol con agua como solvente para la extracción. En todas las pruebas se utilizó una mezcla acidificada (HCl al 0,05 %) de etanol con agua de 0 a 100 %, para determinar la idoneidad y conseguir la optimización de la extracción de antocianinas.

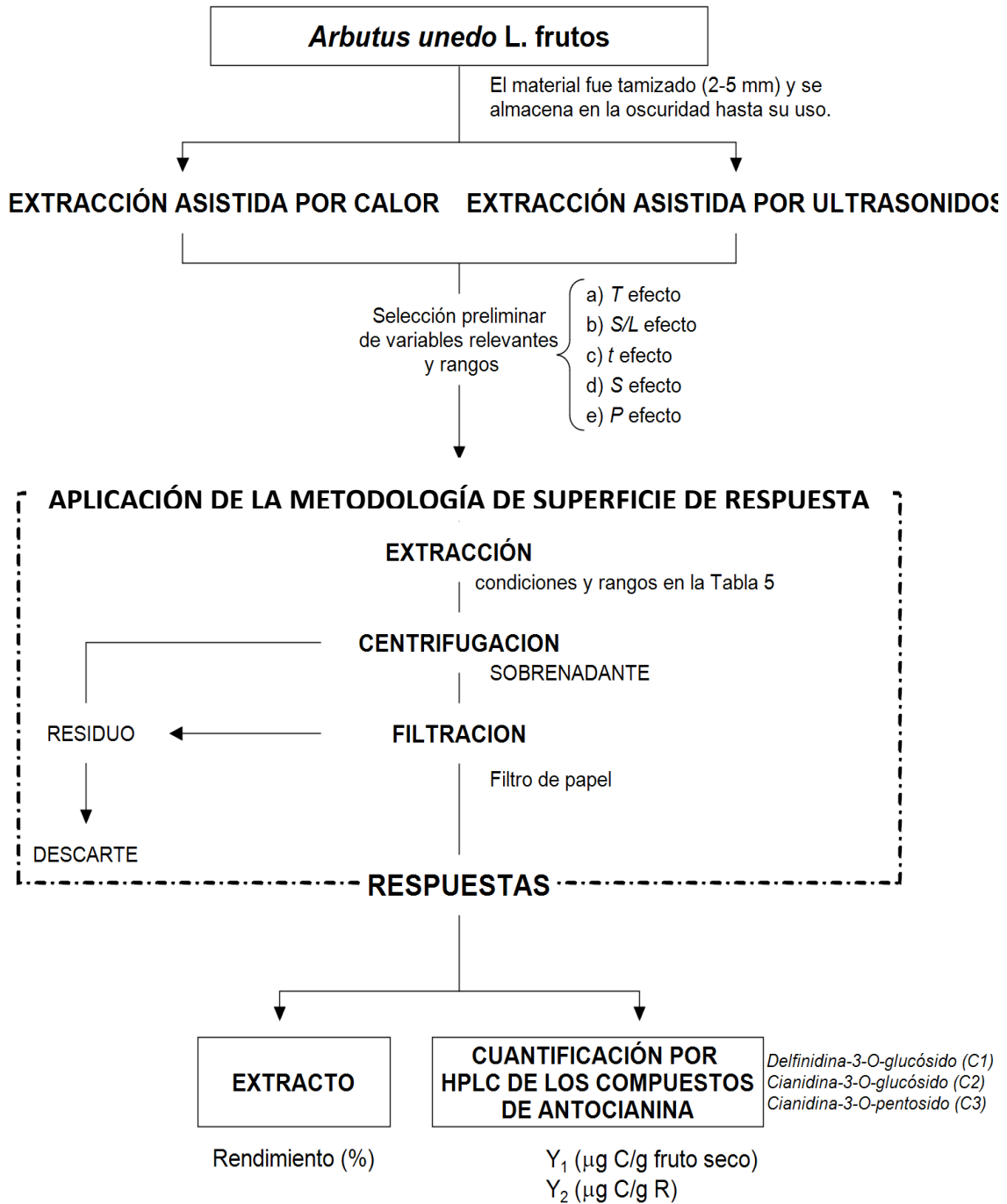


Figura 8. Diagrama de las diferentes etapas llevadas a cabo para optimizar las condiciones que maximizan las respuestas de extracción (Y_1 y Y_2) de los compuestos de antocianina y el residuo total extraído (*rendimiento*).



4.1.1.3. Principales condiciones de las variables que afectan a las técnicas seleccionadas

Se han reportado varios factores asociados a los cambios químicos del proceso de extracción que afectan al rendimiento. Aunque dependen del tipo de técnica empleada, los más comúnmente reportados en la literatura son la combinación de T y t para EAC, y de P y t para EAU. Así, se seleccionaron para EAC, rangos de t (19,5-120,5 min) y de T (21,4-88,6 °C); y para EAU, t (4,8-55,2 min) y P (98,6-401,4 W) (**Tabla 5**).

Tabla 5. Dominios experimentales y codificación de las variables independientes en el diseño factorial DCCC con cinco niveles de valores.

VALORES CODIFICADOS	VALORES NATURALES					
	EAC			EAU		
	t (min)	T (°C)	S (%)	t (min)	P (W)	S (%)
-1,68	19,5	21,4	0	4,8	98,6	0
-1	40	35	20,3	15	160	20,3
0	70	55	50	30	250	50
+1	100	75	79,8	45	340	79,8
+1,68	120,5	88,6	100	55,2	401,4	100

Además, otros factores relacionados con el principio de transferencia de masa, como la relación S/L , se mencionan repetidamente en la bibliografía (Silva et al. 2017). Se ensayó un amplio intervalo de S/L , encontrando que valores más bajos conducen a un rendimiento de extracción mejorado. Aunque las diferencias fueron significativas, se descartó inicialmente como variable a optimizar por RSM, y se seleccionó el valor de 30 g/L para ser utilizado en ambas técnicas de extracción.

En conclusión, la eficacia de los procesos EAC y EAU de extracción de antocianinas a partir de frutos de *A. unedo* se realizó mediante la aplicación de RSM de tres variables (t , T y S para EAC, y t , P y S para EAU) en un DCCC con cinco niveles de valores para cada variable. Este accesorio multivariable constituye una fiable herramienta que minimiza los errores experimentales con un corto número de ensayos, a la vez que optimiza las condiciones de las variables, basándose en modelos empíricos matemáticos que predicen el máximo rendimiento de extracción. Una vez determinadas las condiciones óptimas de las variables analizadas, se optimizó el patrón de relación S/L (g/L) mediante un análisis dosis-respuesta, en vista de una posible aplicación industrial. En la **Figura 8** se presenta un resumen exhaustivo de las diferentes etapas de optimización.



Tabla 6. Resultados experimentales de RSM del DCCC para la optimización de las tres variables principales involucradas (X_1 , X_2 y X_3) en la EAC y la EAU, para los tres formatos de valores de respuesta evaluados (Y_1 , Y_2 y *Rendimiento*). Las variables, los valores naturales y los rangos utilizados se recogen en la **Tabla 5**. Se realizaron tres repeticiones para cada condición y para cada técnica.

VALORES CODIFICADOS DE LAS VARIABLES			RESPUESTAS EXPERIMENTALES																	
			EXTRACCIÓN ASISTIDA POR CALOR (EAC)										EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS (EAU)							
			Rend.	C1		C2		C3		CT		Rend.	C1		C2		C3		CT	
				Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2		Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2
-1	-1	-1	70,0	38,3	54,7	176,8	252,8	47,2	67,5	262,3	374,9	71,1	33,5	47,2	105,3	168,1	37,6	60,0	176,4	281,7
1	-1	-1	67,5	37,4	55,5	170,7	253,0	45,9	68,0	254,1	376,5	81,0	32,0	39,5	71,9	100,9	33,4	46,9	137,3	192,7
-1	1	-1	69,0	38,5	55,8	198,3	287,4	50,2	72,7	287,0	415,9	77,8	32,1	41,2	80,4	117,4	34,3	50,1	146,8	214,3
1	1	-1	65,5	31,3	47,7	56,8	86,7	34,4	52,5	122,5	186,8	97,5	31,1	31,9	54,7	63,8	31,7	37,0	117,5	137,0
-1	-1	1	60,6	36,8	60,7	137,1	226,3	43,2	71,4	217,1	358,3	65,4	38,7	59,1	177,6	308,5	47,8	83,0	264,1	458,7
1	-1	1	70,5	40,5	57,4	183,6	260,5	48,7	69,2	272,8	387,1	74,7	37,9	50,7	176,2	268,1	46,8	71,2	260,9	396,9
-1	1	1	65,3	38,8	59,5	220,6	337,6	51,4	78,6	310,8	475,7	74,2	38,5	51,9	172,8	264,6	46,9	71,9	258,3	395,5
1	1	1	74,5	34,6	46,4	133,5	179,2	40,9	54,9	209,1	280,5	79,0	38,6	48,8	181,1	260,5	47,2	67,9	266,9	383,9
-1,68	0	0	67,3	37,4	55,6	174,3	258,8	47,8	71,0	259,6	385,4	72,4	38,6	53,4	190,9	299,7	48,0	75,4	277,5	435,8
1,68	0	0	73,1	34,9	47,8	131,7	180,2	41,9	57,3	208,5	285,4	93,6	36,3	38,8	154,6	187,6	43,7	53,0	234,6	284,6
0	-1,68	0	70,6	37,5	53,1	181,4	257,0	47,6	67,5	266,5	377,6	69,0	37,0	53,5	155,7	256,4	43,5	71,6	236,2	388,8
0	1,68	0	73,1	34,7	47,5	150,9	206,2	43,6	59,6	229,2	313,4	73,9	36,1	48,9	133,3	205,0	42,5	65,4	211,9	325,9
0	0	-1,68	64,0	35,7	55,7	128,5	200,6	40,7	63,6	204,9	319,9	86,5	34,0	39,3	102,2	134,3	38,0	49,9	174,3	228,9
0	0	1,68	65,2	38,9	59,7	184,0	282,4	47,9	73,5	270,7	415,5	58,7	34,6	59,0	95,9	185,7	36,7	71,1	167,2	323,8
0	0	0	74,1	38,7	52,2	200,7	271,0	49,5	66,8	288,9	390,1	83,6	41,7	49,9	228,2	310,1	54,5	74,1	324,4	440,9
0	0	0	74,5	39,2	52,6	202,7	272,2	50,5	67,7	292,4	392,6	82,8	42,1	50,8	223,9	307,2	53,4	73,3	319,4	438,2
0	0	0	74,6	38,7	51,8	203,7	273,0	50,4	67,5	292,7	392,3	82,6	41,4	50,1	242,4	333,3	54,0	74,3	337,8	464,5
0	0	0	73,8	39,2	53,1	203,5	275,7	50,0	67,7	292,7	396,4	83,8	41,1	49,1	237,4	321,9	58,3	79,1	336,9	456,8
0	0	0	73,8	38,3	51,9	202,3	274,0	50,4	68,3	291,0	394,2	82,4	42,2	51,3	237,7	327,8	55,4	76,5	335,4	462,5
0	0	0	74,4	38,4	51,6	205,6	276,3	50,4	67,7	294,4	395,7	83,8	41,7	49,7	228,0	309,1	53,5	72,5	323,2	438,1



Tabla 7. Resultados paramétricos de la ecuación polinómica de segundo orden de la Ec. [1] para las técnicas de extracción EAC y EAU, en términos del comportamiento de extracción de los tres formatos de valores de respuesta (Y_1 , Y_2 y *rendimiento*), de acuerdo con el DCCC con 5 niveles de rango (**Tabla 5**). El subíndice paramétrico 1, 2 y 3 representa las variables involucradas t (X_1), T o P (X_2) y S (X_3), respectivamente. El análisis de la significancia de los parámetros ($\alpha=0,05$) se presenta en valores codificados. Además, se presenta la información estadística del procedimiento de adaptación al modelo.

CRITERIO	AJUSTE DE COEFICIENTES OBTENIDO TRAS APLICAR EL MODELO BOX-BEHNKEN										INFORMACIÓN ESTADÍSTICA DEL MODELO DE AJUSTE									
	Origen b_0	Efecto lineal			Efecto cuadrático			Efecto interactivo			Obs	R ²	R ² _{adj}	ECM	RECM	EPAM	DW			
		b_1	b_2	b_3	b_{11}	b_{22}	b_{33}	b_{12}	b_{13}	b_{23}										
EAC	<i>Rend.</i>	74,2±1,0	2,2±0,7	ns	ns	-1,8±0,7	-0,7±0,5	-4,0±0,7	ns	3,2±0,9	1,2±0,9	60	0,9709	0,941	0,152	0,390	1,06	1,82		
	Y_1	C1	38,7±0,2	-0,9±0,2	-1,0±0,2	0,8±0,2	-0,8±0,2	-0,8±0,2	-0,4±0,2	-1,8±0,2	0,9±0,2	0,3±0,2	60	0,9503	0,926	0,000	0,021	1,54	2,18	
		C2	203,0±3,3	-19,0±2,2	-8,1±2,2	12,1±2,2	-16,9±2,1	-12,2±2,1	-15,7±2,1	-33,6±2,9	13,4±2,9	15,7±2,9	60	0,9585	0,937	0,002	0,041	2,12	2,15	
		C3	50,2±0,4	-2,3±0,3	-1,1±0,3	1,4±0,3	-1,8±0,3	-1,5±0,3	-1,9±0,3	-3,8±0,4	1,5±0,4	1,1±0,4	60	0,9722	0,932	0,117	0,343	4,55	2,19	
		CT	291,9±3,8	-22,3±2,5	-10,2±2,5	14,2±2,5	-19,4±2,5	-14,5±2,5	-18,1±2,5	-39,2±3,3	15,9±3,3	17,1±3,3	60	0,9673	0,946	0,239	0,489	5,26	2,12	
	Y_2	C1	52,3±0,4	-2,7±0,3	-2,1±0,3	1,2±0,3	ns	-0,4±0,3	2,2±0,3	-2,3±0,4	-1,1±0,4	-0,7±0,4	60	0,9666	0,957	0,002	0,040	2,30	2,14	
		C2	273,5±4,9	-33,4±3,3	-13,7±3,3	19,1±3,3	-17,7±3,2	-13,4±3,2	-9,9±3,2	-49,2±4,3	9,5±4,3	20,2±4,3	60	0,9636	0,932	0,004	0,063	2,88	2,11	
		C3	67,6±0,6	-5,0±0,4	-2,2±0,4	2,2±0,4	-0,9±0,4	-1,1±0,4	0,7±0,4	-5,3±0,5	-0,8±0,5	ns	60	0,9732	0,950	0,161	0,401	3,55	2,17	
		CT	393,2±5,7	-41,2±3,8	-18,0±3,8	22,6±3,8	-18,4±3,7	-14,9±3,7	-7,0±3,7	-56,8±5,0	7,6±5,0	19,9±5,0	60	0,9679	0,931	0,339	0,582	4,20	2,11	
	EAU	<i>Rend.</i>	83,5±1,1	5,8±0,9	3,3±0,9	-5,9±0,9	ns	-3,7±0,9	-3,3±0,9	ns	-1,9±1,2	-1,3±1,2	60	0,91260	0,9045	0,172	0,441	1,20	2,06	
		Y_1	C1	41,7±0,4	-0,5±0,3	ns	2,9±0,3	-1,3±0,3	-1,6±0,3	-3,8±0,3	ns	ns	0,4±0,3	60	0,95130	0,9217	0,233	0,024	1,74	2,46
			C2	232,3±7,8	-8,3±5,2	-5,8±1,2	45,0±5,2	-17,4±5,0	-27,3±5,0	-67,6±5,0	ns	8,2±1,7	ns	60	0,94780	0,9354	0,012	0,046	2,40	2,43
C3			54,8±1,1	-1,1±0,7	ns	5,8±0,7	-2,6±0,7	-3,6±0,7	-8,8±0,7	ns	ns	ns	60	0,93260	0,9298	0,132	0,388	5,14	2,47	
CT			328,8±8,9	-9,9±5,9	-6,6±1,9	53,7±5,9	-21,3±5,8	-32,6±5,8	-80,2±5,8	ns	9,2±2,7	ns	60	0,91930	0,9071	0,270	0,553	5,94	2,40	
Y_2		C1	50,2±0,6	-3,9±0,5	-2,2±0,5	6,7±0,5	-1,8±0,5	ns	-1,5±0,5	ns	0,7±0,6	ns	60	0,91880	0,9021	0,223	0,045	2,60	2,42	
		C2	317,6±11,6	-25,9±7,7	-16,5±7,7	76,4±7,7	-21,9±7,5	-26,5±7,5	-83,6±7,5	ns	ns	ns	60	0,93840	0,9265	0,145	0,071	3,25	2,38	
		C3	74,9±1,5	-5,8±1,0	-3,3±1,0	12,3±1,0	-3,6±1,0	-2,1±1,0	-8,4±1,0	ns	1,3±0,3	ns	60	0,93730	0,9197	0,182	0,453	4,01	2,45	
		CT	449,5±12,6	-36,2±8,4	-22,3±8,4	96,4±8,4	-27,6±8,1	-28,6±8,1	-93,8±8,1	ns	11,6±10,9	ns	60	0,93540	0,9267	0,383	0,658	4,75	2,38	

ns: coeficiente no significativo; R^2 : coeficiente de determinación; R^2_{adj} : coeficiente de determinación ajustado; *ECM*: Error cuadrático medio, *RECM*: Raíz del error cuadrático medio, *EPAM*: Error porcentual absoluto medio; y *DW*: Coeficiente de Durbin-Watson.



4.1.2. Análisis de la optimización mediante RSM de las tres variables

4.1.2.1. Modelos matemáticos derivados del RSM para un DCCC con tres variables, y evaluación estadística

Antes de evaluar el proceso de optimización, los compuestos presentes en las muestras tenían que caracterizarse. El perfil de antocianinas de frutos de madroño obtenido del análisis mediante HPLC-DAD-ESI/MS estaba formado por tres antocianinas: C1, C2 y C3, siendo la cianidina-3-O-glucósido (C2) el compuesto más abundante, como reportaron con anterioridad algunos autores (Guimarães et al. 2013). Otros autores realizaron un estudio que recoge las seis antocianidinas más comunes en la naturaleza, resultando que la cianidina es el compuesto más abundante en todas las bayas estudiadas (arándano, arándano negro, uva negra, frambuesa y fresa) y, por lo tanto, su forma glucosilada se utiliza como antocianina de referencia (Corona et al. 2011).

Los resultados obtenidos por el DCCC estadístico se muestran en la **Tabla 6** para cada una de las técnicas de extracción comparadas. Mediante el ajuste del modelo polinomial de segundo orden de la Ec. [1] a las respuestas obtenidas, utilizando estimaciones de mínimos cuadrados no lineales, se obtienen los valores paramétricos que se presentan en la **Tabla 7**. Aquellos coeficientes que mostraron valores de intervalo de confianza ($\alpha=0.05$) superiores al valor del parámetro, se consideraron como ns y no se utilizaron para el desarrollo del modelo. En la **Tabla 8** se muestran los modelos resultantes (Ecs. [8] a [25]) para cada uno de los criterios de respuesta evaluados (Y_1 , Y_2 y *rendimiento*), para C1, C2, C3 y CT; y para cada una de las técnicas de extracción evaluadas (EAC y EAU). Las Ecs. [8] a [25] traducen los patrones de respuesta para los dos formatos de criterios de respuesta (Y_1 y Y_2) y el *rendimiento* de extracción de R, mostrando una complejidad relativamente alta de los escenarios posibles.

En términos estadísticos, las pruebas utilizadas para evaluar la competencia de los modelos mostraron que los parámetros no significativos de ambos enfoques de RSM (**Tabla 7**) no mejoraron la solución alcanzada y, en contraste, todos los parámetros significativos fueron altamente consistentes ($p<0,01$) Esto también fue verificado por los altos valores de R^2 y R^2_{adj} , indicando el porcentaje de variabilidad calculado por el modelo. El ajuste estadístico (ECM, RECM, EPAM, DW) utilizado para probar la adecuación de los modelos desarrollados demostró que se logró una mejora no



considerable mediante la inclusión de los parámetros estadísticamente no significativos (Tabla 7).

Además, la concordancia entre los valores experimentales y los predichos implica que los resultados obtenidos pueden ser aceptablemente explicados por las variables independientes utilizadas. Por lo tanto, los modelos desarrollados en las Ecs. [8] a [25] son completamente funcionales y adecuados para ser utilizados para la predicción y la optimización del proceso.

Tabla 8. Modelos matemáticos de los procesos extractivos derivados del modelo polinomial de segundo orden de Box-Behnken de la Ec. [1].

Para el formato de respuesta Y_1 (mg C/g fruto seco):		
EAC	<i>C1:</i> $EAC_{Y_1}^{C_1} = 38.7 - 0.9t - 1.0T + 0.8S - 0.8t^2 - 0.8T^2 - 0.4S^2 - 1.8tT + 0.9tS + 0.3TS$	Ec.[8]
	<i>C2:</i> $EAC_{Y_1}^{C_2} = 203.0 - 19.0t - 8.1T + 12.1S - 16.9t^2 - 12.2T^2 - 15.7S^2 - 33.6tT + 13.4tS + 15.7TS$	Ec.[9]
	<i>C3:</i> $EAC_{Y_1}^{C_3} = 50.2 - 2.3t - 1.1T + 1.4S - 1.8t^2 - 1.5T^2 - 1.9S^2 - 3.8tT + 1.5tS + 1.1TS$	Ec.[10]
	<i>CT:</i> $EAC_{Y_1}^{C_T} = 291.9 - 22.3t - 10.2T + 14.2S - 19.4t^2 - 14.5T^2 - 18.1S^2 - 39.2tT + 15.9tS + 17.1TS$	Ec.[11]
EAU	<i>C1:</i> $EAU_{Y_1}^{C_1} = 41.7 - 0.5t + 2.9S - 1.3t^2 - 1.6P^2 - 3.8S^2 + 0.4PS$	Ec.[12]
	<i>C2:</i> $EAU_{Y_1}^{C_2} = 232.3 - 8.3t - 5.8P + 45.0S - 17.4t^2 - 27.3P^2 - 67.6S^2 + 8.2tS$	Ec.[13]
	<i>C3:</i> $EAU_{Y_1}^{C_3} = 54.8 - 1.1t + 5.8S - 2.6t^2 - 3.6P^2 - 8.8S^2$	Ec.[14]
	<i>CT:</i> $EAU_{Y_1}^{C_T} = 328.8 - 9.9t - 6.6P + 53.7S - 21.3t^2 - 32.6P^2 - 80.2S^2 + 9.2tS$	Ec.[15]
Para el formato de respuesta Y_2 (mg C/g R):		
EAC	<i>C1:</i> $EAC_{Y_2}^{C_1} = 52.3 - 2.7t - 2.1T + 1.2S - 0.4T^2 + 2.2S^2 - 2.3tT - 1.1tS - 0.7TS$	Ec.[16]
	<i>C2:</i> $EAC_{Y_2}^{C_2} = 273.5 - 33.4t - 13.7T + 19.1S - 17.7t^2 - 13.4T^2 - 9.9S^2 - 49.2tT + 9.5tS + 20.2TS$	Ec.[17]
	<i>C3:</i> $EAC_{Y_2}^{C_3} = 67.6 - 5.0t - 2.2T + 2.2S - 0.9t^2 - 1.1T^2 + 0.7S^2 - 5.3tT + 0.8tS$	Ec.[18]
	<i>CT:</i> $EAC_{Y_2}^{C_T} = 393.2 - 41.2t - 18.0T + 22.6S - 18.4t^2 - 14.9T^2 - 7.0S^2 - 56.8tT + 7.6tS + 19.9TS$	Ec.[19]
EAU	<i>C1:</i> $EAU_{Y_2}^{C_1} = 50.2 - 3.9t - 2.2T + 6.7S - 1.8t^2 - 1.5S^2 + 0.7tS$	Ec.[20]
	<i>C2:</i> $EAU_{Y_2}^{C_2} = 317.6 - 25.9t - 16.5T + 76.4S - 21.9t^2 - 26.5T^2 - 83.6S^2$	Ec.[21]
	<i>C3:</i> $EAU_{Y_2}^{C_3} = 74.9 - 5.8t - 3.3T + 12.3S - 3.6t^2 - 2.1T^2 - 8.4S^2 + 1.3tS$	Ec.[22]
	<i>CT:</i> $EAU_{Y_2}^{C_T} = 449.5 - 36.2t - 22.3T + 96.4S - 27.6t^2 - 28.6T^2 - 93.8S^2 + 11.6tS$	Ec.[23]
Para el formato de respuesta de rendimiento (%):		
EAC	Residuo: $EAC_{Yield} = 74.2 + 2.2t - 1.8t^2 - 0.7T^2 - 4.0S^2 + 3.2tS + 1.2TS$	Ec.[24]
EAU	Residuo: $EAU_{Yield} = 83.5 + 5.8t + 3.3T - 5.9S - 3.7T^2 - 3.3S^2 - 1.9tS + 1.3TS$	Ec.[25]

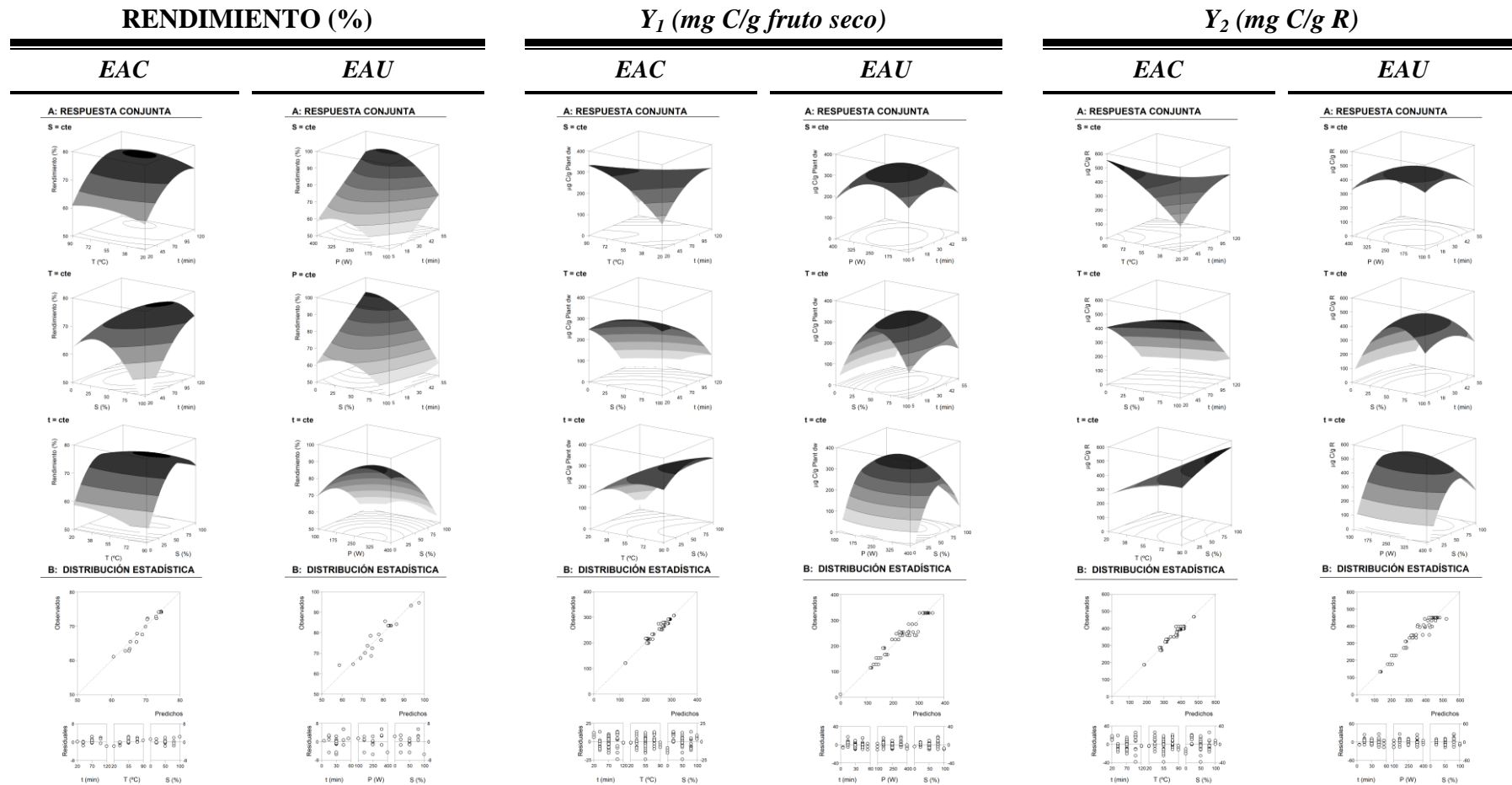


Figura 9. Muestra los resultados gráficos de CT en términos del comportamiento de extracción para los tres formatos de respuesta (Y_1 , Y_2 y *rendimiento*). Cada figura está dividida en dos partes. *Parte A:* muestra el gráfico conjunto de análisis 3D, tanto para EAC como para EAU. Cada una de las superficies netas representa la superficie de respuesta 3D predicha gracias al polinomio de segundo orden de Ec. [1] mediante las acciones binarias entre dos variables, cuando la variable excluida se posiciona en el óptimo individual (**Tabla 9**). *Parte B:* Para ilustrar el beneficio del ajuste, se utilizan dos criterios básicos de estadística gráfica. El primero, la capacidad de simular los cambios de la respuesta entre los datos predichos y los observados; y el segundo, la distribución residual en función de cada una de las variables.

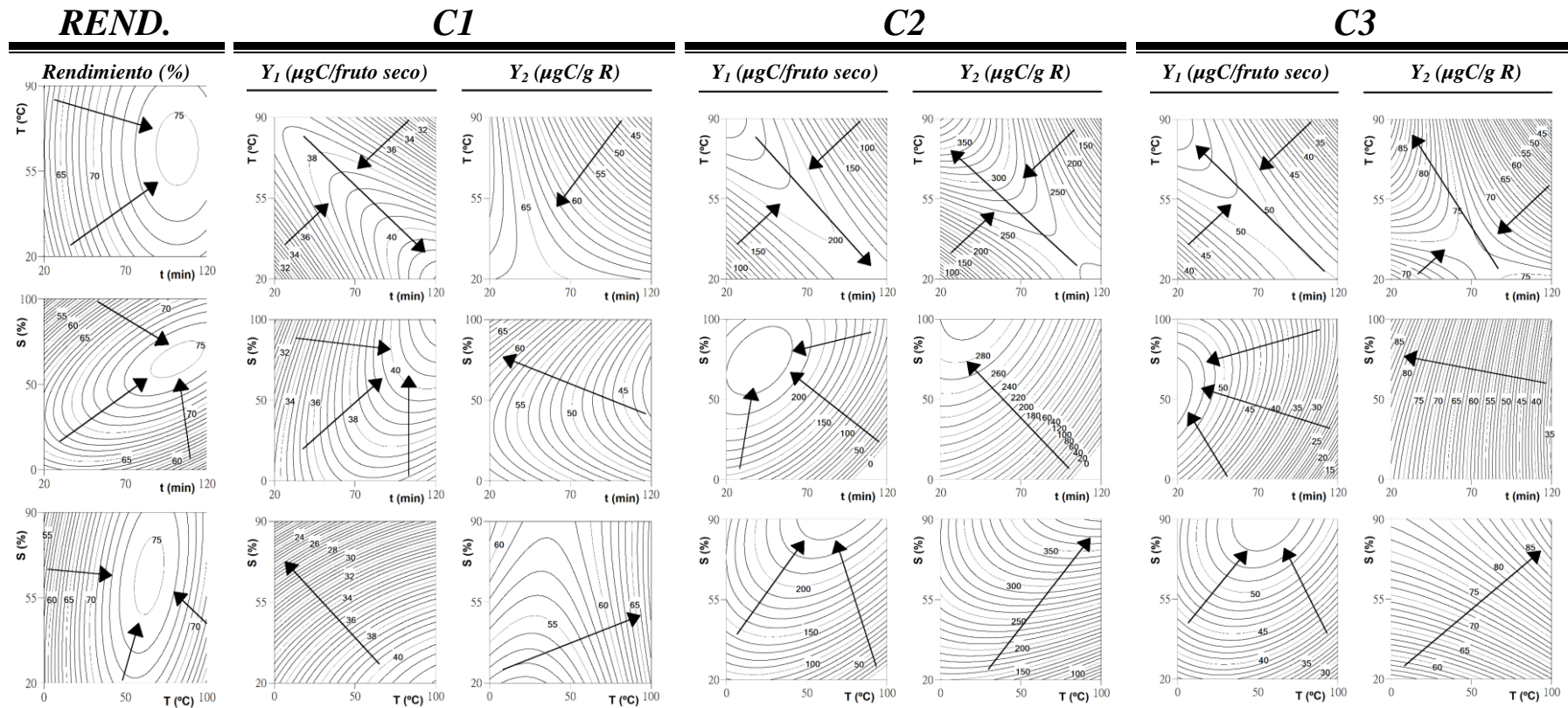


Figura 10. Muestra las proyecciones de isolíneas optimizadas para la combinación de las tres principales variables involucradas (X_1 , X_2 y X_3) en la EAC, de los tres formatos de valor de respuesta (Y_1 , Y_2 , y *rendimiento*). para describir visualmente las tendencias de cada respuesta y guiar la selección de las condiciones más favorables, teniendo en cuenta, al mismo tiempo, todas las respuestas. Cada uno de los gráficos de contorno representa la proyección en el plano XY de la superficie de respuesta tridimensional teórica predicha gracias al polinomio de segundo orden de Ec. [1] mediante las acciones binarias entre variables, cuando la variable excluida se posiciona en el óptimo individual (**Tabla 9**). El diseño estadístico y los resultados experimentales se describen en la **Tabla 6**. Los valores paramétricos estimados se muestran en la **Tabla 7**.

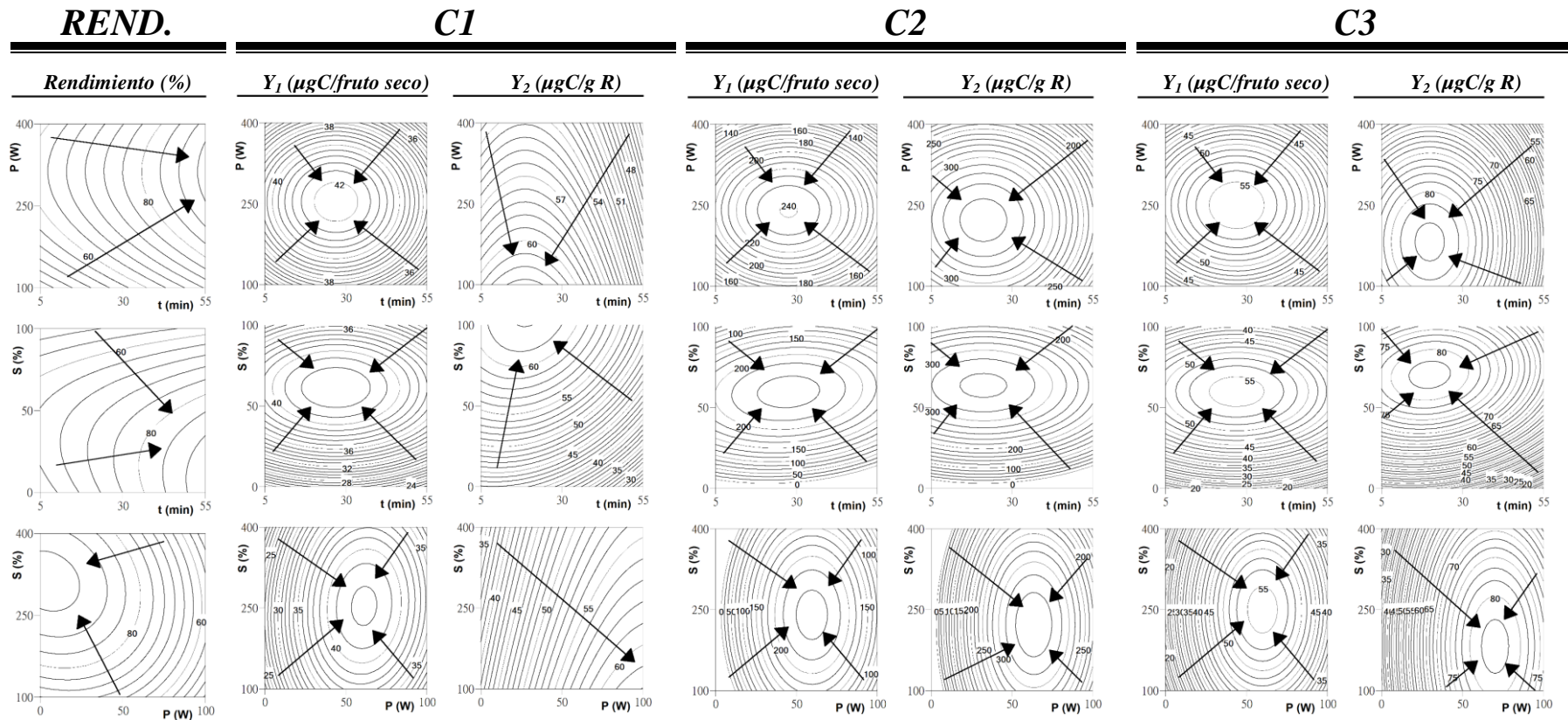


Figura 11. Muestra las proyecciones de isolíneas optimizadas para la combinación de las tres principales variables involucradas (X_1 , X_2 y X_3) en la EAU, de los tres formatos de valor de respuesta (Y_1 , Y_2 , y *rendimiento*), para describir visualmente las tendencias de cada respuesta y guiar la selección de las condiciones más favorables, teniendo en cuenta al mismo tiempo todas las respuestas. Cada uno de los gráficos de contorno representa la proyección en el plano XY de la superficie de respuesta tridimensional teórica predicha gracias al polinomio de segundo orden de Ec. [1] mediante las acciones binarias entre variables, cuando la variable excluida se posiciona en el óptimo individual (**Tabla 9**). El diseño estadístico y los resultados experimentales se describen en la **Tabla 6**. Los valores paramétricos estimados se muestran en la **Tabla 7**.



4.1.2.2. Patrones de respuesta

Los valores paramétricos presentados en la **Tabla 7**, derivados de los modelos de RSM, nos brindan una información global relevante de las respuestas, pero también de la idoneidad del método utilizado. Por un lado, los efectos lineales y cuadráticos desempeñan un papel importante y significativo en todos los casos (cada uno de los criterios de respuesta evaluados en las técnicas EAC y EAU). La presencia de efectos lineales y cuadráticos implica que casi todas las respuestas mostraron patrones no lineales y que tales patrones son característicos de la naturaleza de las variables involucradas en las técnicas EAC y EAU. Por otro lado, los valores paramétricos interactivos pueden actuar como valores de control de las necesidades reales del análisis de RSM para la comprensión de las variables evaluadas. De hecho, si están presentes en los modelos matemáticos derivados, indica que, al estudiar las respuestas por separado en lugar de hacerlo con un análisis multivariable (como el RSM), no será posible definir las condiciones óptimas adecuadas y, por lo tanto, en tal caso, los rendimientos máximos de las extracciones nunca se definirán correctamente. Con respecto a los efectos interactivos encontrados en los análisis realizados (**Tabla 7**), la EAC muestra un efecto representativo en casi todas las posibles interacciones de respuesta (tT , tS y TS) con valores muy influyentes en el efecto de tS ; mientras que para la EAU no se dan interacciones de respuesta para el tP , hay dos interacciones significativas para PS y, en casi todos los casos, interacciones positivas entre las variables tS . En conclusión, se necesitó un análisis multivariable no lineal para ajustarse completamente a los resultados experimentales encontrados. Además, las variables evaluadas en la EAC mostraron interacciones claras, mientras que en la EAU, solo el efecto interactivo de tS presentó resultados relevantes.

La **Figura 9** muestra los resultados para EAC y EAU del rendimiento de extracción del R y los resultados de CT en los dos valores de formato de respuesta de Y_1 y Y_2 . Cada figura está dividida en tres columnas, en las que se muestran los resultados para cada una de las técnicas probadas. Además, cada columna está dividida en dos secciones (A y B). La sección A muestra los gráficos de superficie en 3D para las tres posibles combinaciones de variables producidas por las Ecs. [8] a la [25] mediante la acción binaria entre variables, cuando la excluida se encuentra en el valor individual óptimo pronosticado (parte A de la **Tabla 9**). La sección B ilustra la capacidad de predecir los



resultados obtenidos y la distribución del residuo en función de cada una de las variables consideradas. Tomando la distribución de los residuos presentados en la **Figura 9** como ejemplo de todas las respuestas logradas, se puede percibir que están arbitrariamente alrededor de cero y no se observaron grupos de valores o autocorrelaciones.

La **Figura 10** y la **Figura 11** muestran las respuestas optimizadas en los gráficos de contorno (Y_1 , Y_2 y *rendimiento*) para cada uno de los compuestos identificados (C1, C2 y C3) como una función de las tres variables principales involucradas en EAC y EAU, respectivamente. Las isolíneas representan la proyección en el plano XY de la superficie de respuesta tridimensional teórica predicha gracias al polinomio de segundo orden de la Ec. [1] mediante las acciones binarias entre dos variables, cuando la variable excluida se coloca en el valor individual óptimo pronosticado (parte A de la **Tabla 9**). En la **Figura 10** y en la **Figura 11**, la respuesta de *rendimiento* se muestra repetidamente para facilitar la comprensión de los cambios producidos en las respuestas Y_1 y Y_2 .

La **Figura 12** muestra las respuestas 2D individuales resumidas como una función de las variables definidas para las técnicas de extracción EAC y EAU, para encaminar la selección de las condiciones más favorables. La línea representa el patrón de respuesta variable cuando los demás se ubican en los valores óptimos, presentados en la tercera parte de la **Tabla 9**. Los puntos (⊙) representados junto a la línea resaltan la ubicación del valor óptimo. Las respuestas adecuadamente optimizadas muestran patrones en los que la cantidad de compuestos extraídos aumenta a un valor óptimo y luego disminuye en función de cada una de las variables independientes evaluadas. Por lo tanto, se puede encontrar un óptimo absoluto en un solo punto, lo que permite calcular las condiciones que conducen a ese valor. Este tipo de respuestas se puede representar fácilmente mediante modelos tridimensionales de las respuestas presentadas en la **Figura 9**, la **Figura 10** y la **Figura 11**. Por ejemplo, casi todas las respuestas derivadas de la EAU produjeron respuestas óptimas absolutas claras para todas las variables, mientras que las soluciones menos concluyentes se obtuvieron para la EAC, aunque las tendencias hacia un óptimo absoluto se observan visualmente. Esto probablemente se debe a las limitaciones que supone aumentar la variable T sin aumentar la presión del recipiente (agregando otra variable al sistema).



VARIABLES OPTIMIZADAS DE RSM

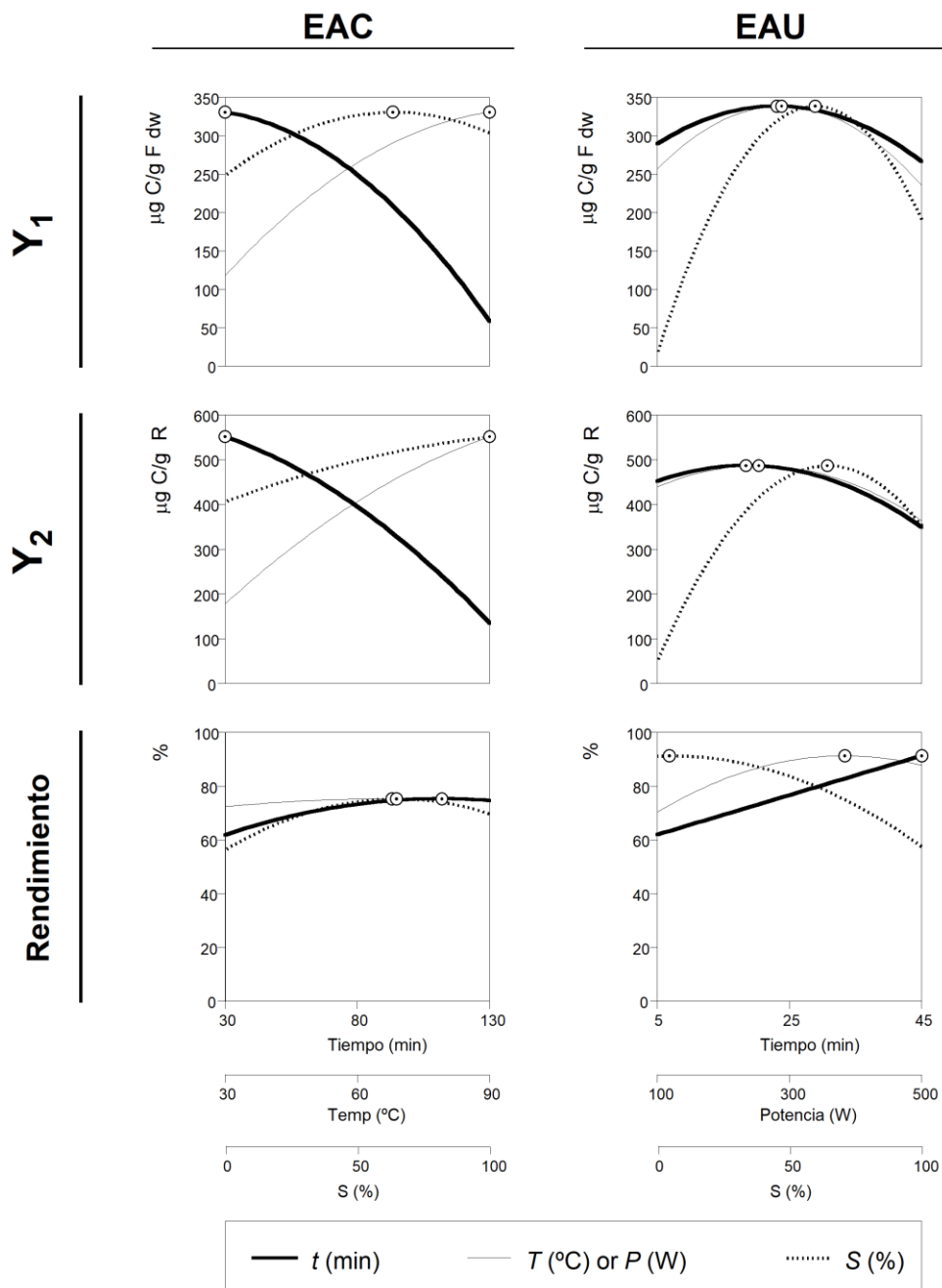


Figura 12. Resumen final de los efectos de todas las variables evaluadas para los sistemas de EAC y EAU. Muestra los gráficos 2D individuales de todas las respuestas estudiadas en función de todas las variables evaluadas. Las variables en cada uno de los gráficos 2D se colocaron en los valores óptimos individuales de las demás (Tabla 9). Los puntos (⊙), presentados a lo largo de cada línea, resaltan la ubicación del valor óptimo. Las líneas y los puntos son generados por los modelos teóricos polinomiales de segundo orden (Tabla 8).



4.1.2.3. Condiciones numéricas individuales y globales que maximizan la extracción

Las condiciones óptimas absolutas o relativas (marcadas con *) que maximizan los criterios de respuestas individuales y globales de los resultados, presentadas en las **Figura 9**, **Figura 10** y **Figura 11**, se muestran numéricamente en la **Tabla 9**, y gráficamente en la **Figura 12**. Estos valores fueron obtenidos por un simple procedimiento de inserción de restricciones a los rangos experimentales.

Concretamente, la parte A de la **Tabla 9** muestra las condiciones individuales para EAC y EAU de los criterios de respuesta Y_1 y Y_2 para C1, C2, C3 y CT. El compuesto de antocianina más abundante fue C2, ya sea como valores de formato de respuesta Y_1 (~240 μg C2/g fruto seco por EAU), o Y_2 (~400 μg C2/g R por EAC), seguido de C3 y, por último, C1. Las mayores respuestas de extracción de CT fueron obtenidas mediante EAC, logrando $330,8 \pm 17,6$ μg C/g de fruto seco obtenidos utilizando *20,0 min, *90,0 °C y *63,5 % de etanol acidificado (valor del formato de respuesta Y_1); y $551,6 \pm 24,3$ μg C/g R, obtenidos bajo las condiciones de *20,0 min, *90,0 °C y *100 % de etanol acidificado (valor del formato de respuesta Y_2). Las respuestas alcanzadas por los EAU fueron cercanas a las producidas por el EAC, presentando valores de $338,7 \pm 23,7$ μg C/g de fruto seco (Y_1 , a 27,6 min, 241,0 W y 59,7 % de etanol acidificado) y $487,0 \pm 28,4$ μg C/g R (Y_2 , a 21,8 min, 215,1 W y 64,3% de etanol acidificado). Además, la parte A de la **Tabla 9** muestra el rendimiento de extracción del material residual, que fue del $75,3 \pm 3,9$ % del fruto total seco para EAC (101,9 min, 64,1 °C y 64,7 % de etanol acidificado); y $85,4 \pm 12,9$ % del fruto total seco para EAU (55,0 min, 312,7 W y 4,5 % de etanol acidificado).

Combinando la información producida por los tres criterios de respuesta (Y_1 , Y_2 y *rendimiento* del extracto), el comportamiento completo de cada variable relevante que influye en las respuestas se define en términos globales. Los resultados globales de optimización se presentan en la parte B de la **Tabla 9**, y se resumen a continuación:

- Para la EAC: las condiciones globales óptimas fueron de *20,0 min, *90,0 °C y *63,5 % de etanol acidificado, produciendo un rendimiento de respuesta del $62,8 \pm 6,6$ % del fruto total seco, valor de CT, proveniente, en el formato de respuesta de Y_1 de $39,1 \pm 4,5$ μg C1/g de fruto seco, $236,5 \pm 25,1$ μg C2/g de fruto seco, $54,0 \pm 6,1$ μg C3/g de fruto seco, resultando $329,5 \pm 34,7$ μg CT/g de fruto seco; y, en el formato de respuesta Y_2 , de $59,2 \pm 6,2$ μg de C1/g de R, $364,5 \pm 38,2$



μg de C2/g de R, $82,2 \pm 8,3$ μg de C3/g de R, por lo que la suma es igual a $506,3 \pm 52,9$ μg de CT/g de R.

- Para la EAU: las condiciones globales óptimas fueron de 27,6 min, 243,7 W y 59,9 % de etanol acidificado, produciendo un rendimiento de respuesta del $79,97 \pm 9,2$ % del fruto total seco, valor de la suma de todos los compuestos, que en formato de respuesta Y_1 proviene de $42,2 \pm 5,7$ μg C1/g de fruto seco, $240,6 \pm 26,1$ μg C2/g de fruto seco, $55,8 \pm 6,3$ μg C3/g de fruto seco, resultando $338,6 \pm 36,2$ μg CT/g de fruto seco; y en el formato de respuesta Y_2 , de $53,1 \pm 5,5$ μg de C1/g de R, $338,7 \pm 36,8$ μg de C2/g de R, $79,2 \pm 8,9$ μg de C3/g de R, dando lugar a $477,6 \pm 50,5$ μg de CT/g de R.

Para ambas técnicas, las condiciones que conducen a los valores óptimos fueron reevaluadas experimentalmente para garantizar la precisión de los resultados presentados y se encontraron respuestas ligeramente menos eficientes con EAU. Debido a la naturaleza de la energía aplicada, los EAU parecen ser la técnica que debería extraer mayores cantidades de antocianinas, pero los resultados muestran lo contrario. Estos resultados se corroboran con estudios similares en los que el material extraído de la pulpa del fruto de *Vitis vinifera* L. mediante EAU produce valores de ~ 6350 $\mu\text{g/g}$ de fruto seco (Bosiljkov et al. 2017), mientras que al usar EAC, los valores alcanzados fueron de hasta ~ 17000 $\mu\text{g/g}$ de fruto seco (Elisia et al. 2006).

Con respecto al disolvente utilizado en las extracciones, una revisión de la literatura muestra que en la mayoría de los casos, las mezclas hidroalcohólicas consiguen extraer cantidades mayores que el alcohol puro o agua pura, como se muestra en dos estudios que describen la extracción de antocianinas del cáliz de *Hibiscus sabdariffa* L., según los que se obtuvieron ~ 200 $\mu\text{g/g}$ de vegetal seco cuando se usó agua o alcohol puros (Alarcón-Alonso et al. 2012), mientras que usando una mezcla alcohólica al 50 % como solvente, se conseguía extraer ~ 1250 $\mu\text{g/g}$ de vegetal seco (Salazar-González et al. 2012).



Tabla 9. Condiciones de las variables en valores naturales que conducen a valores de respuesta óptima para RSM utilizando un DCCC para cada una de las técnicas de extracción evaluadas (EAC y EAU), para los tres formatos de valor de respuesta (Y_1 , Y_2 y *rendimiento*) y para cada compuesto evaluado.

CRITERIO	CONDICIONES ÓPTIMAS DE LAS VARIABLES			RESPUESTA ÓPTIMA				
	X_1 : t (min)	X_2 : T (°C) o P(W)	X_3 : S (%)					
A) Condiciones óptimas individuales de las variables								
EXTRACCIÓN ASISTIDA POR CALOR (EAC)	<i>Rend.</i>	101.9	64.1	64.7	75.3±3.9	%		
	Y_1	C1	120.0*	20.0*	100.0*	41,7±6,2	µg C1/g fruto seco	
		C2	20.0*	90.0*	65.2	238,2±14,9	µg C2/g fruto seco	
		C3	20.0*	90.0*	55.1	54,0±7,1	µg C3/g fruto seco	
		CT	20.0*	90.0*	63.5	330,8±17,6	µg CT/g fruto seco	
	Y_2	C1	20.0*	72.9	100.0*	68,6±3,1	µg C1/g R	
		C2	20.0*	90.0*	100.0*	392,5±19,1	µg C2/g R	
		C3	20.0*	90.0*	100.0*	89,3±1,3	µg C3/g R	
		CT	20.0*	90.0*	100.0*	551,6±24,3	µg CT/g R	
	EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (EAU)	<i>Rend.</i>	55.0	312.7	4.5	85.4±12,9	%	
		Y_1	C1	26.9	253.8	61.3	42,3±14,4	µg C1/g fruto seco
			C2	27.6	240.5	59.6	240,6±19,9	µg C2/g fruto seco
C3			27.0	250.0	59.8	55,9±6,8	µg C3/g fruto seco	
CT			27.6	241.0	59.7	338,7±23,7	µg CT/g fruto seco	
Y_2		C1	18.6	100.0*	100.0*	62,0±2,6	µg C1/g R	
		C2	21.2	222.2	63.6	345,3±29,8	µg C2/g R	
		C3	19.9	181.9	70.2	82,3±9,7	µg C3/g R	
		CT	21.8	215.1	64.3	487,0±28,4	µg CT/g R	
B) Condiciones óptimas globales de las variables								
EXTRACCIÓN ASISTIDA POR CALOR (EAC)		<i>Rend.</i>				62,8±6,6	%	
		Y_1	C1				39,1±4,5	µg C1/g fruto seco
	C2					236,5±25,1	µg C2/g fruto seco	
	C3					54,0±6,1	µg C3/g fruto seco	
	CT		20.0*	90.0*	65.4	329,5±34,7	µg CT/g fruto seco	
	Y_2	C1				59,2±6,2	µg C1/g R	
		C2				364,5±38,2	µg C2/g R	
		C3				82,2±8,3	µg C3/g R	
		CT				506,3±52,9	µg CT/g R	
	EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (EAU)	<i>Rend.</i>				79,97±9,2	%	
		Y_1	C1				42,2±5,7	µg C1/g fruto seco
			C2				240,6±26,1	µg C2/g fruto seco
C3						55,8±6,3	µg C3/g fruto seco	
CT			27.4	243.7	59.9	338,6±36,2	µg CT/g fruto seco	
Y_2		C1				53,1±5,5	µg C1/g R	
		C2				338,7±36,8	µg C2/g R	
		C3				79,2±8,9	µg C3/g R	
		CT				477,6±50,5	µg CT/g R	



4.1.2.4. Estudio cinético complementario para determinar una respuesta máxima para la EAC

Las antocianinas son conocidas por su sensibilidad al calor y, por lo tanto, el tiempo de extracción es una variable particularmente importante, pero depende en gran medida de la matriz utilizada. Las frecuencias de los ultrasonidos tienen la capacidad de facilitar la hidratación de los materiales de la planta, logrando la ampliación de los poros de la pared celular, y provocando su ruptura, lo que acelera el proceso de extracción de los compuestos (Silva et al. 2017). Al mismo tiempo, los fenómenos de cavitación crean corrientes y fuerzas disruptivas que aumentan la temperatura del solvente que, en reactores refrigerados como el que se aplicó, puede alcanzar hasta 70 °C, factor que puede comprometer la estabilidad de las antocianinas (Clifford, 2000).

Al comparar los resultados de las eficiencias de extracción entre las técnicas, la EAC obtuvo valores significativamente más altos. Los valores máximos de extracción de la EAU se tienen en cuenta con condiciones óptimas dentro de los rangos estudiados en el DCCC, produciendo valores óptimos absolutos. Mientras tanto, para el caso de la EAC, las condiciones óptimas propuestas muestran que períodos más cortos de t que los diseñados en DCCC, combinados con altas T podrían favorecer la extracción de antocianinas. Dado que la EAC fue la técnica que más favorece la extracción, basándonos en los resultados presentados en la **Figura 12**, se estudiaron periodos más cortos de t con una T más alta (por encima de 90 °C) que podrían mejorar potencialmente las respuestas obtenidas. Debido a los fuertes efectos interactivos de tS encontrados en los análisis de RSM (**Tabla 7**), se incluyeron tres niveles diferentes de la variable S (60, 80 y 100 % de etanol acidificado). En consecuencia, para describir todo el potencial de la EAC, se llevó a cabo un estudio cinético en el que se establecieron periodos de t de 1 a 60 min, a la T óptima de 90 °C, y tres valores de S diferentes (60, 80 y 100 % de etanol acidificado). Solo el CT fue representado porque la extracción C1, C2 y C3 se comportó de manera similar. Los datos obtenidos mostraron que un t más corto (~5 min) favorece la extracción; menor de 5 min no sería suficiente para extraer el contenido total de antocianinas y t valores superiores a 5 min comenzarían a descomponer la estructura de los compuestos a cualquier valor de S y a 90 °C. Varias condiciones podrían aceptarse como óptimas, pero en un esfuerzo por determinar aquellas más adecuadas para un uso industrial, 5 min, 80 % de etanol acidificado y 90



°C se consideran los valores más propicios, que producen un rendimiento de respuesta del 60,9 % del total del fruto seco, valores correspondientes a la cantidad total de compuestos en el valor de formato de respuesta de Y_1 de 500,9 $\mu\text{g CT/g}$ fruto seco, y de 800,6 $\mu\text{g CT/g R}$ en el formato de respuesta de Y_2 . En comparación con los valores obtenidos en el RSM como condiciones óptimas relativas, se produce una reducción del extracto de R producido, un aumento de la proporción de etanol acidificado necesaria (de 63 a 80 %) y un aumento en la concentración de antocianinas totales de 506,3 a 744,6 $\mu\text{g de CT/g R}$.

La extracción de antocianinas de *A. unedo* mediante EAC no tiene un único punto óptimo, sino que varias condiciones de t (1 a 6 min) y S (60 a 100 % de etanol) a alta T (90 °C) son capaces de producir una elevada y concentrada respuesta. Esto hace que, desde el punto de vista industrial, la cinética de extracción de antocianinas de este fruto sea un fenómeno muy peculiar y práctico.

4.1.3. Análisis dosis-respuesta del efecto de la relación S/L en las condiciones óptimas

La cantidad ideal de solvente debería ser suficiente para disolver los compuestos diana (Albuquerque et al. 2017). La estructura de la matriz afectará la capacidad del solvente para permeabilizar y extraer los compuestos deseados (Pinela et al. 2017). Por lo tanto, se realizó un estudio S/L en las condiciones óptimas globales predichas por los modelos polinómicos obtenidos para las técnicas de extracción EAC y EAU. Basado en resultados preliminares, el proceso de extracción de dosis-respuesta fue diseñado para verificar los patrones S/L desde 5 g/L hasta 150 g/L. El efecto S/L se puede describir mediante una simple relación no lineal utilizando la ecuación [2]. Los resultados de la dosis-respuesta de la relación S/L para EAC y EAU se presentan en la **Figura 13** para todos los criterios de respuesta, pero solo para el CT se representa porque la extracción de los compuestos individuales (C1, C2 y C3) se comportó en modo similar. En todos los casos, las respuestas obtenidas a través de los sistemas EAC y EAU son consecuentes con los resultados anteriores. El aumento de la relación S/L conduce a una disminución en la capacidad de extracción del solvente; en consecuencia, las respuestas de extracción alcanzan un valor máximo a valores mínimos de S/L y un mínimo a valores más altos de S/L , justificándose las pérdidas respectivas por los resultados paramétricos derivados de la ecuación [2] y [3]. Teniendo en cuenta esto, los resultados obtenidos para EAC y EAU en términos del criterio de respuesta Y_1 son los siguientes.



- Para la EAC: el valor de K que representa el valor máximo alcanzado fue de $500,9 \pm 22,1$ $\mu\text{g/g}$ de fruto seco; el valor de m que contabiliza el valor de S/L que proporciona el 50 % del valor del parámetro K fue $98,9 \pm 11,7$ g de fruto seco/L; el valor de v que proporciona la tasa promedio de proceso decreciente fue de $1,16 \pm 0,21$ $\mu\text{g/g}$ de fruto seco por g fruto seco/L; el coeficiente de determinación R^2 logrado fue de 0,9471; y el parámetro adimensional a fue $0,66 \pm 0,11$.
- Para la EAU: K fue igual a $348,6 \pm 21,5$ $\mu\text{g/g}$ de fruto seco; m tomó el valor de $122,8 \pm 8,5$ g fruto seco/L; v equivale a $3,16 \pm 0,63$ $\mu\text{g/g}$ de fruto seco por g de planta seca/L; $R^2 = 0,9411$; y $a = 3,21 \pm 0,83$.

Los resultados en términos del criterio de respuesta Y_2 fueron:

- Para EAC: $K = 800,6 \pm 31,5$ $\mu\text{g/g}$ de R; $m = 104,5 \pm 10,2$ g fruto seco/L; $v = 1,73 \pm 0,17$ $\mu\text{g/g}$ de R por g fruto seco/L; $R^2 = 0,9102$; y $a = 0,65 \pm 0,13$.
- Para EAU: $K = 499,2 \pm 70,1$ $\mu\text{g/g}$ de R; $m = 127,0 \pm 41,3$ g fruto seco/L; $v = 4,32 \pm 0,96$ $\mu\text{g/g}$ de R por g fruto seco /L; $R^2 = 0,9490$; y $a = 3,17 \pm 1,01$.

Los resultados en términos del criterio de respuesta *rendimiento* fueron (solo el parámetro K mostró valores significativos debido a la falta de cambios de la respuesta como una función de la variable S/L):

- Para la EAC: $K = 60,9 \pm 10,3$ % con un $R^2 = 0,9954$.
- Para la EAU: $K = 66,8 \pm 6,5$ % con un $R^2 = 0,9940$.

En términos estadísticos, los modelos matemáticos de las ecuaciones [2] y [3], utilizados para evaluar las tendencias S/L no lineales, mostraron parámetros altamente significativos para todas las técnicas, hecho que también fue verificado por los altos valores de R^2 alcanzados, lo que indica la buena correlación del modelo con los resultados experimentales obtenidos. A partir de este análisis paramétrico, se pueden determinar las diferentes tendencias del efecto S/L en las condiciones óptimas de extracción logradas para cada una de las técnicas analizadas por medio de los parámetros más relevantes (K , m y v).



Patrones de relación sólido-líquido

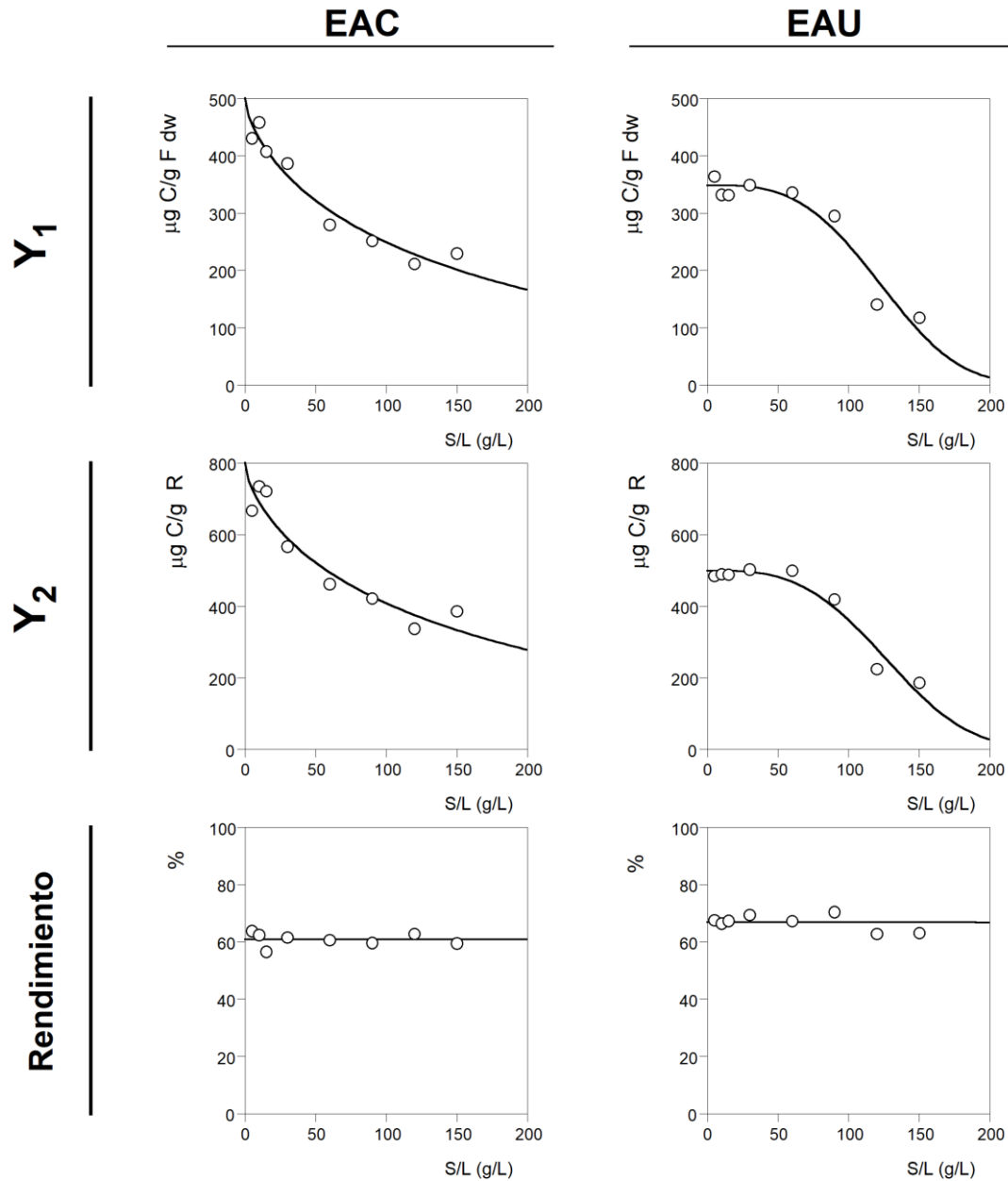


Figura 13. Resumen final de los efectos de todas las variables evaluadas para los sistemas de EAC y EAU. Muestra la respuesta a la dosis de la relación S/L en los valores óptimos globales de las otras tres variables (**Tabla 9**). Los resultados experimentales son los puntos (\circ), mientras que las líneas son el patrón predicho por la Ec. [2]. El valor límite (~ 150 g/L) muestra la concentración experimental máxima alcanzable, ya que llega un momento en que la muestra no se puede agitar físicamente a escala de laboratorio.



En conclusión, se puede observar que la EAC es la técnica con la que se lograron mayores rendimientos de CT, en el intervalo de S/L de 5 a 40 g/L, corroborado por los valores más altos del parámetro K . La disminución observada con la EAU es levemente más alta que la observada en la EAC, como señalan los parámetros m y v . De hecho, la EAC es más eficiente para extraer CT en rangos S/L de 50 a 150 g/L que la EAU, donde la pérdida es mayor al aumentar la relación S/L , lo que indica que los rendimientos de extracción son más eficientes en el sistema EAC. Se encontró un comportamiento similar para los otros criterios de respuesta (Y_2 y *rendimiento*).

4.1.4. Comparación con otros estudios que comprenden la extracción de antocianinas

El uso de los frutos del madroño no está muy extendido, tal vez debido a la falta de cultivos especializados y/o al hecho de que su sabor solo es agradable si se consumen bastante maduros. En consecuencia, la información científica sobre la composición química y la concentración de los compuestos presentes en esta matriz es escasa. El contenido total de antocianinas optimizadas en los frutos de madroño reportados en este documento es ~ 500 $\mu\text{g/g}$ de fruto seco o ~ 800 $\mu\text{g/g}$ de R. Estos valores se ubican dentro de los valores medios descritos por otros autores en muestras de plantas similares. Las antocianinas pueden estar presentes en todas las partes de las plantas, aunque se encuentran principalmente en frutos, verduras y flores, confiriéndoles una amplia gama de colores (Brouillard 1982; Delgado-Vargas and Paredes-Lopez 2003).

El contenido de antocianinas varía ampliamente en muestras de frutos similares, desde los ~ 20 $\mu\text{g/g}$ de fruto seco de la ciruela (Timberlake C.F. 1988) a los ~ 15000 $\mu\text{g/g}$ de fruto seco de la baya del saúco (Clifford 2000). Los resultados obtenidos están en sintonía con los valores reportados para frutos similares y conocidos por alto contenido de antocianinas como *Nitraria tangutorum* Bobr. (~ 650 $\mu\text{g/g}$ de fruto seco) (Sang et al. 2017) y *Aristotelia chilensis* L. (400 a 1500 $\mu\text{g/g}$ de fruto seco) (Gironés-Vilaplana et al. 2014).

Además, el contenido de antocianinas de los frutos de madroño es similar a los valores obtenidos en cálices de *Hibiscus sabdariffa* L., que oscilan entre 300 y 1250 $\mu\text{g/g}$ de planta seca (Salazar-González et al. 2012). En cuanto a las semillas y los tubérculos, aunque hay excepciones, por lo general presentan un valor de rendimiento más bajo de antocianinas que los frutos; tal es el caso de *Vitis vinifera* L., cuyos valores rondan los



~25 $\mu\text{g/g}$ de semillas secas (Ghafoor et al. 2009), o los tubérculos de *Ipomoea batatas* L., que apenas alcanzan los ~300 $\mu\text{g/g}$ de tubérculos secos (Zhu et al. 2017).

4.2. Producción de extractos naturales de antocianinas a partir de frutos de *Arbutus unedo* L. para usarlos como posibles sustitutos de los colorantes artificiales en escala pre-industrial, y su estabilización para su incorporación en productos alimentarios

Siguiendo los requisitos legales y comerciales que van surgiendo, la industria alimentaria tiende a usar preferentemente ingredientes naturales (Carmona 2013). En el caso de los colorantes, las antocianinas representan una atractiva y natural alternativa a los sintéticos. La estabilidad de las antocianinas es esencial para garantizar la calidad y el desarrollo de un colorante basado en estos componentes bioactivos. Sin embargo, los extractos naturales ricos en antocianinas son susceptibles a la degradación por varios factores y la estabilidad de estos compuestos durante su aplicación es un paso crucial. Los principales factores identificados que afectan la estabilidad son el tiempo (t), la temperatura (T) y el pH (Komatsu et al., 2014b; Zhu et al., 2002). No obstante, otros factores como la exposición a la luz, el contenido de humedad o el contenido de iones metálicos entre otros, también se han señalado como relativamente importantes (Li, Taylor, & Mauer, 2011).

Se realizó un estudio de la estabilidad del extracto de antocianinas obtenido según las condiciones óptimas determinadas. Además, realizamos pruebas sobre su bioactividad, analizando su efectividad como antitumoral, antimicrobiano y antioxidante, y, finalmente, procedimos a la aplicación de su uso incorporándolo en una matriz alimentaria, en este caso, en un producto de confitería, gofres.

4.2.1. Determinación de las bioactividades del extracto rico en antocianinas obtenido

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado previamente algunos trabajos que utilizan frutos de *A. unedo* debido a su uso tradicional en el Noreste de Portugal. Inicialmente, los estudios revelaron propiedades antioxidantes gracias a la presencia de importantes moléculas con capacidad scavenger como tocoferoles y carotenoides (Barros et al. 2010; Guimaraes et al. 2010). Posteriormente, (Guimarães et al. 2013) se llevó a cabo una extensa caracterización de los compuestos fenólicos presentes en dichos frutos. Más tarde, (Guimarães et al. 2014) se prepararon dos extractos



enriquecidos en compuestos fenólicos para evaluar y comparar sus bioactividades por separado: uno rico en compuestos fenólicos no antocianídicos, y un extracto rico en compuestos antocianinas. En el presente estudio, se realizó la optimización de la extracción para obtener un extracto rico en cianidina-3-*O*-glucósido de estos frutos. Dicho punto óptimo obtenido también fue evaluado teniendo en cuenta sus propiedades bioactivas y sus capacidades colorantes.

4.2.1.1. Evaluación de las propiedades antioxidantes

Existen varias técnicas que pueden usarse para evaluar la actividad antioxidante de compuestos puros o mezclas complejas (como en el caso de extractos de plantas). En nuestro estudio, para evaluar la actividad antioxidante del extracto de *A. unedo*, se seleccionaron cuatro ensayos complementarios *in vitro*: actividad captadora de radicales de DPPH, ensayo del poder reductor, inhibición de la decoloración del β -caroteno e inhibición de la formación de TBARS. Los resultados se expresan en valores de EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) como se resume en la **Tabla 10**. El extracto obtenido de frutos de *A. unedo* mostró, tener una alta actividad antioxidante en los diferentes ensayos, pero principalmente en la capacidad de inhibir la formación de TBARS donde, se obtuvo el valor más bajo de EC_{50} .

En un estudio reciente, se preparó un extracto de *A. unedo* rico en catequina y se demostró su alta actividad antioxidante (Takwa et al. 2018). Los resultados de dicho estudio revelaron que, solo en el ensayo del PR, el valor de EC_{50} ($328 \pm 2 \mu\text{g/mL}$) fue menor que el obtenido en el presente trabajo, para los ensayos restantes nuestro extracto reveló un mayor potencial antioxidante.

4.2.1.2. Evaluación de la citotoxicidad

Los efectos potenciales de muchos compuestos naturales como agentes anticancerígenos, *in vitro* e *in vivo*, se han descrito en diferentes estudios (Carocho & Ferreira, 2013). Por lo que se decidió determinar los efectos de los extractos obtenidos en el presente estudio sobre el crecimiento de cuatro líneas de células tumorales humanas (MCF-7, NCI-H460, HeLa y HepG2), obteniéndose diferentes valores de GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$), que son detallados en la **Tabla 10**. El extracto de *A. unedo* rico en cianidina-3-*O*-glucósido no mostró resultados positivos para las líneas celulares NCI-H460 y HepG2 ($GI_{50} > 400$), pero sí un efecto moderado para las líneas celulares HeLa e MCF-7. El extracto de *A. unedo* rico en cianidina-3-*O*-glucósido no demostró citotoxicidad en



líneas celulares PLP2 ($GI_{50} > 400$). Un estudio donde se evaluaron las propiedades bioactivas de diferentes plantas medicinales incluye también resultados que revelan que *A. unedo* no presentó citotoxicidad para el hígado (Ziani et al. 2015).

4.2.1.3. Evaluación de las propiedades antimicrobianas

El potencial antimicrobiano también se estudió contra un total de ocho bacterias y siete hongos, elegidos debido a su importancia en la salud pública. Los resultados obtenidos, expresados como valores *CMI* ($\mu\text{g/mL}$), se presentan en la **Tabla 10** y se dividen en actividad antibacteriana y actividad antifúngica. Los resultados mostraron que extracto de *A. unedo* rico en cianidina-3-*O*-glucósido, además de una alta actividad antioxidante, también posee una alta actividad antimicrobiana, particularmente contra *Salmonella enteritidis* y *Bacillus cereus*. Así mismo, también se confirmó la alta actividad antifúngica del extracto rico en antocianinas, siendo *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus ochraceus* los hongos más sensibles, con los valores *CMI* más bajos.

Según algunos autores, la alta capacidad antioxidante y antimicrobiana demostrada por el extracto de *A. unedo* rico en cianidina-3-*O*-glucósido puede explicarse por la presencia de niveles significativos de compuestos fenólicos que presenta dicho extracto (Albuquerque et al. 2016; Guimarães et al. 2013).



Tabla 10. Actividad antioxidante, citotóxica, hepatotóxica y antimicrobiana del extracto de *Arbutus unedo* L. (media \pm desviación estándar).

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	Extracto de <i>A. unedo</i>		Control (Trolox)	
	<i>EC</i> ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		<i>EC</i> ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
Actividad captadora de radicales DPPH	295 \pm 13		41 \pm 1	
Poder reductor	447 \pm 4		41.7 \pm 0.3	
Inhibición de la oxidación de β -caroteno	901 \pm 41		18 \pm 1	
TBARS	257 \pm 4		23 \pm 1	

CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS DE CÉLULAS TUMORALES	Extracto de <i>A. unedo</i>		Control (Elipticina)	
	<i>GI</i> ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		<i>GI</i> ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
NCI-H460 (cáncer de pulmón no microcítico)	>400		1.0 \pm 0.1	
HeLa (carcinoma cervical)	350 \pm 10		1.91 \pm 0.06	
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	>400		1.1 \pm 0.2	
MCF-7 (adenocarcinoma de mama)	338 \pm 14		0.91 \pm 0.04	

CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS DE CÉLULAS NO TUMORALES	Extracto de <i>A. unedo</i>		Control (Elipticina)	
	<i>GI</i> ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		<i>GI</i> ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
PLP 2 (células primarias de hígado de cerdo)	>400		3.2 \pm 0.7	

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	Extracto de <i>A. unedo</i>		Control (Ampicilina)	
	<i>CFI</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>CMB</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>CFI</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>CMB</i> ($\mu\text{g/mL}$)
Bacterias Gram negativas				
<i>Escherichia coli</i>	-	-	400	500
<i>Salmonella enteritidis</i>	150	300	300	600
<i>Salmonella typhimurium</i>	200	300	400	750
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	250	500
Bacterias Gram positivas				
<i>Staphylococcus aureus</i>	300	600	250	450
<i>Bacillus cereus</i>	150	450	250	400
<i>Micrococcus flavus</i>	300	600	250	400
<i>Listeria monocytogenes</i>	300	600	400	500

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	Extracto de <i>A. unedo</i>		Control (Ketoconazol)	
	<i>CFI</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>CFM</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>CFI</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>CFM</i> ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	150	450	250	500
<i>Aspergillus ochraceus</i>	200	450	1500	2000
<i>Aspergillus versicolor</i>	300	600	200	500
<i>Penicillium funiculosum</i>	450	600	200	500
<i>Penicillium ochrochloron</i>	300	600	2500	3500
<i>Candida crusei</i>	300	600	075	150
<i>Penicillium verrucosum</i>	450	600	200	300

Los valores de *EC*₅₀ corresponden a la concentración de muestra que alcanza el 50% de actividad antioxidante ó 0,5 de absorbancia en el ensayo del poder reductor. Los valores de *GI*₅₀ corresponden a la concentración de muestra que alcanza el 50% de la inhibición del crecimiento de líneas celulares tumorales humanas, o en el cultivo primario de hígado PLP2. Los valores *CFI* corresponden a la concentración mínima de muestra que inhibe el crecimiento bacteriano; *CMB* o *CFM* corresponden a las concentraciones mínimas bactericida o fungicida, respectivamente.



4.2.2. Estabilidad de los extractos en sistemas de solución acuosa, simulando matrices alimentarias

El extracto natural de frutos de madroño (*A. unedo*) rico en antocianinas (principalmente cianidina-3-*O*-glucósido) presenta un contenido optimizado total de ~500 µg/g de fruto seco u ~800 µg/g de R (sabiendo que era el ~60% del fruto total seco). Dichos valores pueden ubicarse dentro de los valores medios descritos por otros autores en muestras vegetales similares, aunque el contenido de antocianinas puede variar ampliamente según la matriz de la que se trate, mismamente entre frutos similares, desde ~20 µg/g de fruto seco (ciruela) (Timberlake C.F. 1988) hasta ~15000 µg/g de fruto seco (baya del saúco) (Clifford 2000). Los resultados alcanzados están dentro de los valores medios contenidos en frutas conocidas por su alto contenido de antocianinas como *Nitraria tangutorum* Bobr. (~650 µg/g de fruto seco) (Sang et al. 2017) y *Aristotelia chilensis* L. (400 a 1500 µg/g de fruto seco) (Gironés-Vilaplana et al. 2014). Las variables no controlables, como el cultivo del suelo, la exposición al sol, el tiempo de cosecha, etc., y las variables controlables, como las condiciones de extracción (tiempo, solvente, temperatura, etc.) y las técnicas usadas (extracción asistida por ultrasonidos, por calor, por microondas, etc.), pueden afectar a la concentración de los compuestos, aumentando o disminuyendo las eficiencias de rendimiento. Sin embargo, las buenas eficiencias de extracción de antocianinas alcanzadas con los frutos de *A. unedo*, en comparación con otras fuentes, enfatizan la necesidad de realizar evaluaciones más detalladas de la estabilidad de los compuestos obtenidos. Desde el punto de vista de la estabilidad, los principales factores incluyentes son el *t* (Komatsu et al. 2014), el *pH* (Su et al. 2003), la *T* (Demeule et al. 2002), el nivel de oxígeno (Labbé et al. 2008) y la concentración de otros compuestos, como los antioxidantes, iones metálicos y otros componentes (Zhu et al. 1997). Ya que, aunque todos estos parámetros son relevantes, la mayoría de los autores coinciden en que los esenciales son *t*, *pH* y *T* (Komatsu et al. 2014; Li et al. 2012, 2011), a continuación, se controlará la estabilidad del contenido de antocianinas en función de dichas variables, en un sistema de solución acuosa que simula un entorno alimentario.

Por lo tanto, se investigaron los efectos de *t*, *pH* y *T* sobre la estabilidad de los compuestos presentes en el extracto natural optimizado. Para todas las respuestas, la estabilidad se controló mediante cuantificación de compuestos por HPLC-DAD.



El análisis gráfico individual dependiente de t de los resultados de estabilidad del contenido total de antocianinas en la solución acuosa, en función del pH y T , se presenta en la sección A de la **Figura 14**, mientras que en la **Figura 15** (secciones A) se muestra la estabilidad individual de los compuestos de antocianina (C1, C2 y C3). Cada gráfico muestra los efectos degradatorios de t (0-24 h) a cada T probada (4, 25, 40, 55 y 70 °C). Los puntos son los datos experimentales de los diferentes pH s evaluados (● 2, ○ 3.5, ◆ 5, ◇ 6.5 y ★ 8) y las líneas (-), los resultados predichos por la Ec. [4]. Los resultados paramétricos y los coeficientes de correlación se presentan en la **Tabla 11**. Para poder describir esos efectos de una forma multivariada, el parámetro de la tasa de degradación (r) tiene en cuenta todos los efectos de perturbación causados por las variables pH y T . El aumento en las unidades de estas dos variables provoca un aumento exponencial en la tasa de degradación del contenido de antocianinas. El efecto T se comporta siguiendo la definición del concepto de Arrhenius, presentada en Ec. [5]. Debido a que los efectos del pH no pueden describirse mediante ninguna función físico-química estándar, los mecanismos que rigen su efecto en reacciones químicas básicas o en organismos vivos complejos son muy diferentes. Para el caso particular de la estabilidad de los compuestos de antocianina en sistema acuoso, el efecto del pH sigue una relación exponencial como se describe en la Ec. [6]. Por tanto, se puede desarrollar un modelo multivariable global que controle el efecto de t , pH y T en la estabilidad del sistema acuoso, mediante la sustitución del parámetro r de la Ec. [4] con las ecuaciones que rigen la T (Ec. [5]) y el efecto del pH (Ec. [6]), de la siguiente manera:

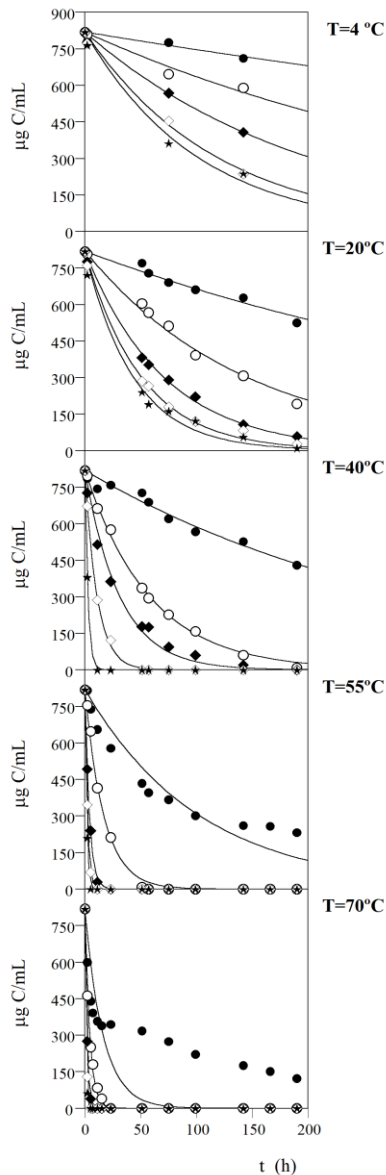
$$e(t, pH, T) = k \exp\left(-p \exp\left(-\frac{Ea}{RT} + bpH\right)t\right) \quad [26]$$

Al sustituir el parámetro r por el resultado de multiplicar las Ecs. [5] y [6], la nueva expresión resultante comparte un factor preexponencial (A y s) y su uso en conjunto será redundante, por lo tanto, un nuevo factor se describe y se señala como p . Todas las demás notaciones paramétricas son como se define en la sección de material y métodos. La Sección B de las **Figura 14** y **Figura 15** muestran los resultados globales de ajuste multivariable de la aplicación de la Ec. [26] para describir los datos multivariados completos.

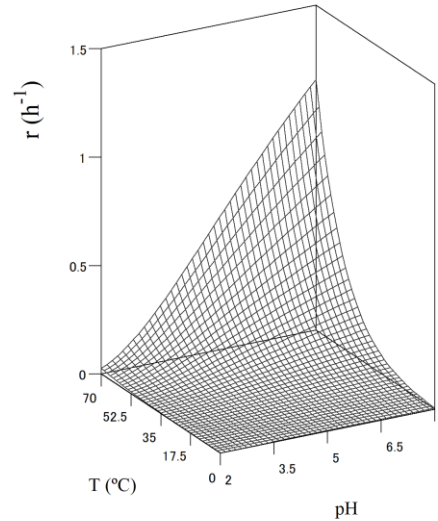


A: ANALISIS INDIVIDUAL

B: ANALISIS MULTIVARIABLE



B1: Tendencias globales



B2: Datos estadísticos

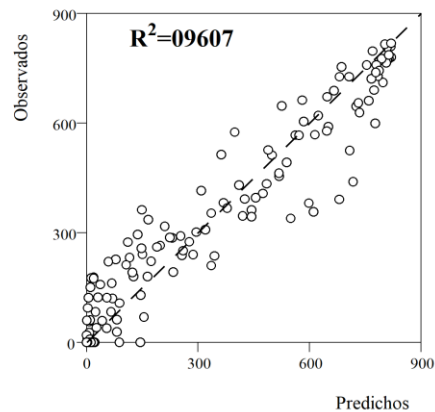


Figura 14. Estabilidad de CT como una función de t , T y pH en un sistema acuoso que simula matrices alimentarias. La Sección A muestra el análisis gráfico individual dependiente del tiempo, de los resultados de estabilidad basados en el contenido de antocianinas como una función de T y pH . Cada gráfico muestra los efectos degradatorios de t (0-190 h) para cada T testada (5, 25, 40, 55 and 70 °C). Los puntos representan los datos experimentales de los diferentes pH s testados (● 2, ○ 3,5, ◆ 5, ◇ 6,5 and ★ 8) y las líneas (—), los resultados predichos por la Ec. [1]. Los resultados paramétricos y los coeficientes de determinación se presentan en la **Tabla 11**. La Sección B muestra los resultados del ajuste global multivariable resultante de aplicar la Ec. [5] para describir todos los datos multivariables: B1 muestra el patrón de la superficie neta paramétrica de la cinética r en función de sus respectivas variables de afectación (pH y T); y B2 muestra la correlación entre los valores experimentales y los pronosticados obtenidos con el modelo multivariable presentado en Eq. [5].

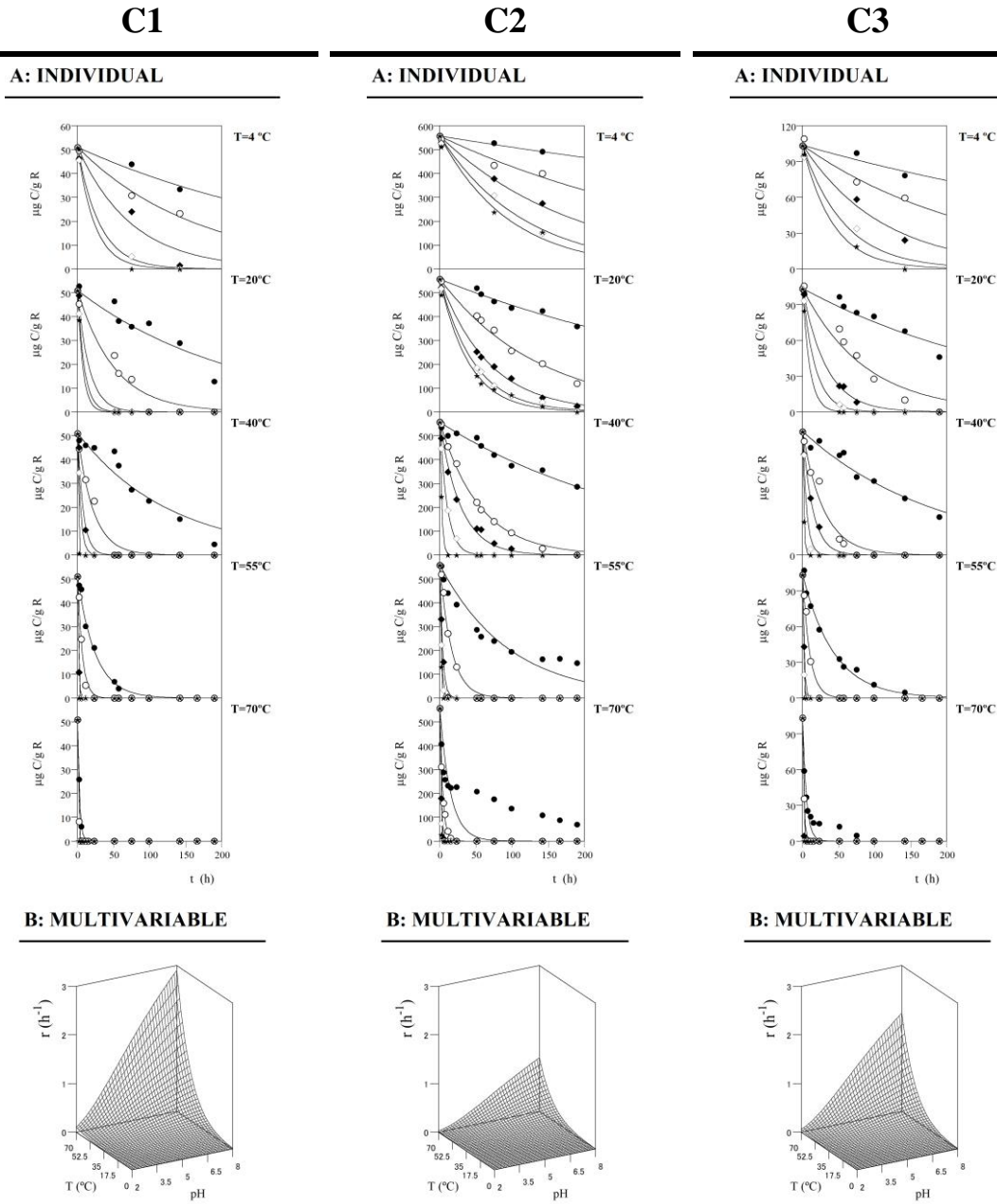


Figura 15. Estabilidad individual de C1, C2 y C3 como una función de t , T y pH en solución acuosa que simula matrices alimentarias. En esta figura se representan dos subsecciones para cada compuesto. En la Sección A se muestra el análisis gráfico individual dependiente del tiempo, de los resultados de estabilidad basados en el contenido de antocianinas como una función de T y pH . Cada gráfico muestra los efectos de degradación del tiempo (0-190 h) para cada T testada ($4, 25, 40, 55$ y 70°C). Los puntos representan los datos experimentales de los diferentes pH s testados (\bullet 2, \circ 3.5, \blacklozenge 5, \diamond 6.5 y \star 8) y las líneas (—), los resultados predichos por la Ec. [1]. Los resultados paramétricos y los coeficientes de determinación se presentan en la **Tabla 11**. La Sección B muestra los resultados del ajuste global multivariable resultante de aplicar la Ec. [5] para describir todos los datos multivariables del patrón de la superficie neta paramétrica de la cinética r en función de sus respectivas variables de afectación (pH y T).



Los resultados paramétricos para el análisis de las diferentes multivariantes fueron:

- Para CT: $k=819,00\pm 56,1$ $\mu\text{g/g R}$, $p=59,32\pm 11,2$, $Ea=4,35\times 10^9\pm 0,98\times 10^9$ kJ y $b=10,05\pm 3,5$, obteniendo valores de R^2 de 0,9577.
- Para C1: $k=50,16\pm 4,3$ $\mu\text{g/g R}$, $p=57,10\pm 9,7$, $Ea=4,35\times 10^9\pm 1,21\times 10^9$ kJ y $b=8,91\pm 2,3$, obteniendo valores de R^2 de 0,9396.
- Para C2. $k=527,35\pm 116,4$ $\mu\text{g/g R}$, $p=59,38\pm 7,8$, $Ea=4,35\times 10^9\pm 0,46\times 10^9$ kJ y $b=10,23\pm 3,2$, obteniendo valores de R^2 de 0,9590.
- Para C3: $k=101,20\pm 31,4$ $\mu\text{g/g R}$, $p=57,95\pm 7,6$, $Ea=4,35\times 10^9\pm 0,44\times 10^9$ kJ y $b=9,42\pm 3,5$, obteniendo valores de R^2 de 0,9534.

En todos los casos, la descripción estadística fue significativa y la predicción de la estabilidad del contenido de antocianinas en la solución mediante la Ec. [26] mostraron valores de R^2 altamente consistentes. El análisis multivariable expresado por la cinética r en función de sus respectivas variables de afectación (pH y T) y presentado en cada una de las figuras en las subsecciones B muestra el patrón paramétrico de la superficie neta.

Las conclusiones están en concordancia con los resultados reportados previamente (Komatsu et al. 2014; Li et al. 2012, 2011), encontrando que a $T<20^\circ\text{C}$ y $pH<3.5$ el extracto es más estable, disminuyendo todo lo posible la tasa de degradación de compuestos de antocianina.

En solución acuosa, el sistema demostró ser altamente dependiente de las tres variables estudiadas. Los compuestos se descomponen completamente con el tiempo a diferentes pH y T . Este fenómeno también fue detectado por otros autores que estudiaron la estabilidad de la catequina y derivados de otras matrices como el té verde y el cacao (Komatsu et al., 2014; Li et al., 2012; Zhu et al., 2002, 1997). En términos similares con otros autores (Li et al. 2012), los resultados indicaron que los extractos de antocianinas en solución acuosa se mantuvieron estables en valores de pH inferiores a 3,5 y temperaturas inferiores a 30 °C durante un período de 72 h. Incluso en condiciones térmicas elevadas (70 °C), a pH inferiores a 3, el contenido de antocianinas se detecta durante 1h sin grandes pérdidas. Estos resultados pueden limitar la aplicación directa



del extracto de antocianina, favoreciendo su aplicación en alimentos ácidos como algunos quesos, jugos de fruta, productos de frutas o verduras, mayonesas y yogures (Food Ingredients Brasil 2008).

La cuestión clave radica en el hecho de que las antocianinas experimentan degradación cinética durante el procesamiento térmico y que el aumento del *pH* causa cambios moleculares en detrimento de sus propiedades de color (Komatsu et al. 2014; Ruiz-Rodríguez et al. 2011). La solución analítica de dicho sistema a través de modelos matemáticos es importante y necesaria, pero no exenta de complejidad debido a las respuestas heterogéneas de las variables involucradas. Lograr una solución exitosa del modelo matemático permitiría controlar la mayoría de los factores que afectan el sistema, ayudando a estandarizar las variables clave para producir extractos estables a partir de vegetales y, por lo tanto, optimizar el proceso de extracción completo.

El análisis de la estabilidad de los compuestos de antocianina extraídos a partir de los frutos de madroño es crucial para predecir el comportamiento de vida útil de los mismos en diversas situaciones de procesamiento. De hecho, el procesamiento de alimentos, entre otros, es un factor que afecta directamente a la integridad de las moléculas. Controlar las condiciones de *t*, *pH* y *T*, entre otras variables, son aspectos esenciales para mantener la eficiencia del proceso y obtener productos de alta calidad. Se desarrollaron modelos matemáticos y se realizaron múltiples gráficos para establecer e ilustrar los valores óptimos de las variables independientes estudiadas. Por lo tanto, los modelos cinéticos podrían usarse para calcular la vida útil y predecir la estabilidad de los compuestos en condiciones de *pH* y *T* dadas para los sistemas, en polvo y en disolución acuosa. Las condiciones óptimas de estabilidad para el contenido de antocianinas en solución acuosa fueron $pHs < 3,5$ y $Ts < 30$ °C, según las cuales permanecieron intactas durante un período de al menos 72 h. Además, utilizando las condiciones de procesamiento óptimas, es posible producir extractos funcionales con alto potencial como nutraceuticos o como ingredientes activos en el diseño de alimentos funcionales, que también se pueden extender a otros campos industriales, como las industrias farmacéutica y cosmocéutica.



Tabla 11. Resultados de los parámetros e intervalos de confianza del contenido de CT, C1, C2 y C3 ajustados al modelo dependiente de t recogido en la Ec. [1] a diferentes condiciones de pH y T al evaluar la estabilidad durante el proceso de obtención del extracto enriquecido.

pH	T	CT			C1			C2			C3		
		$k(t)$ ($\mu g/g R$)	$r(t)$ (h^{-1})	R^2	$k(t)$ ($\mu g/g R$)	$r(t)$ (h^{-1})	R^2	$k(t)$ ($\mu g/g R$)	$r(t)$ (h^{-1})	R^2	$k(t)$ ($\mu g/g R$)	$r(t)$ (h^{-1})	R^2
4.0	2.0	818,9±66,28	0,001±0,001	0,909	51,4±4,47	0,003±0,001	0,870	557,0±38,43	0,001±0,001	0,890	103,7±9,23	0,002±0,000	0,890
4.0	3.5	818,9±79,46	0,003±0,001	0,970	51,4±5,10	0,006±0,001	0,992	557,0±53,59	0,003±0,001	0,962	103,7±10,11	0,004±0,000	0,975
4.0	5.0	818,9±81,41	0,005±0,002	0,994	51,4±4,89	0,013±0,001	0,952	557,0±55,41	0,005±0,001	0,995	103,7±10,13	0,009±0,000	0,976
4.0	6.5	818,9±81,48	0,008±0,003	0,995	51,4±5,13	0,033±0,001	0,998	557,0±55,31	0,009±0,002	0,993	103,7±10,19	0,017±0,001	0,983
4.0	8.0	818,9±81,15	0,010±0,003	0,991	51,4±5,12	0,044±0,001	0,997	557,0±55,12	0,010±0,002	0,990	103,7±10,35	0,024±0,001	0,998
20.0	2.0	818,9±79,25	0,002±0,001	0,968	51,4±4,62	0,005±0,001	0,899	557,0±53,90	0,002±0,001	0,968	103,7±9,53	0,003±0,000	0,919
20.0	3.5	818,9±81,34	0,007±0,002	0,993	51,4±4,96	0,020±0,001	0,965	557,0±55,21	0,007±0,002	0,991	103,7±10,06	0,012±0,000	0,970
20.0	5.0	818,9±81,77	0,014±0,005	0,998	51,4±5,12	0,064±0,001	0,997	557,0±55,56	0,015±0,003	0,997	103,7±10,34	0,031±0,001	0,997
20.0	6.5	818,9±81,73	0,020±0,006	0,998	51,4±5,14	0,111±0,002	1,000	557,0±55,63	0,021±0,005	0,999	103,7±10,37	0,057±0,002	1,000
20.0	8.0	818,9±81,36	0,023±0,007	0,993	51,4±5,14	0,143±0,003	1,000	557,0±55,42	0,025±0,006	0,995	103,7±10,37	0,102±0,004	1,000
40.0	2.0	818,9±79,24	0,003±0,001	0,967	51,4±4,78	0,008±0,001	0,930	557,0±53,64	0,003±0,001	0,963	103,7±9,79	0,005±0,000	0,944
40.0	3.5	818,9±81,75	0,017±0,006	0,998	51,4±5,05	0,047±0,001	0,984	557,0±55,62	0,018±0,004	0,999	103,7±10,17	0,034±0,001	0,980
40.0	5.0	818,9±81,34	0,032±0,010	0,993	51,4±5,09	0,129±0,003	0,991	557,0±55,39	0,035±0,008	0,994	103,7±10,34	0,071±0,003	0,997
40.0	6.5	818,9±81,83	0,092±0,030	0,999	51,4±5,11	0,237±0,005	0,994	557,0±55,67	0,098±0,022	0,999	103,7±10,23	0,177±0,007	0,986
40.0	8.0	818,9±81,88	0,385±0,126	1,000	51,4±5,14	2,250±0,046	1,000	557,0±55,69	0,412±0,092	1,000	103,7±10,37	0,659±0,027	1,000
55.0	2.0	818,9±77,79	0,010±0,003	0,950	51,4±5,11	0,041±0,001	0,994	557,0±53,18	0,010±0,002	0,955	103,7±10,29	0,023±0,001	0,992
55.0	3.5	818,9±81,71	0,059±0,019	0,998	51,4±5,09	0,155±0,003	0,991	557,0±55,52	0,062±0,014	0,997	103,7±10,26	0,102±0,004	0,989
55.0	5.0	818,9±81,84	0,254±0,083	0,999	51,4±5,14	0,791±0,016	1,000	557,0±55,60	0,268±0,060	0,998	103,7±10,28	0,498±0,020	0,991
55.0	6.5	818,9±81,84	0,449±0,147	0,999	51,4±5,14	6,688±0,137	1,000	557,0±55,63	0,481±0,107	0,999	103,7±10,37	0,843±0,035	1,000
55.0	8.0	818,9±81,82	0,699±0,229	0,999	51,4±5,14	12,894±0,265	1,000	557,0±55,66	0,740±0,165	0,999	103,7±10,37	4,784±0,198	1,000
70.0	2.0	818,9±67,27	0,062±0,017	0,821	51,4±5,11	0,393±0,008	0,994	557,0±46,19	0,068±0,013	0,829	103,7±9,97	0,194±0,008	0,961
70.0	3.5	818,9±81,55	0,237±0,077	0,996	51,4±5,14	0,922±0,019	1,000	557,0±55,56	0,253±0,056	0,997	103,7±10,34	0,572±0,024	0,997
70.0	5.0	818,9±81,85	0,561±0,184	0,999	51,4±5,14	6,271±0,129	1,000	557,0±55,62	0,592±0,132	0,999	103,7±10,37	1,591±0,066	1,000
70.0	6.5	818,9±81,89	0,927±0,304	1,000	51,4±5,14	5,635±0,116	1,000	557,0±55,52	0,836±0,186	0,997	103,7±10,37	4,967±0,206	1,000
70.0	8.0	818,9±81,90	1,288±0,422	1,000	51,4±5,14	4,943±0,102	1,000	557,0±55,70	1,517±0,338	1,000	103,7±10,37	4,285±0,178	1,000



4.3. Incorporación del extracto optimizado de cianidina-3-*O*-glucósido proveniente de *Arbutus unedo* L. en gofres, como posible sustituto de los actuales colorantes sintéticos

Cuando se trata de evaluar el efecto de la incorporación de ingredientes naturales en los alimentos, principalmente con la función de colorante, se vuelve indispensable evaluar los cambios causados en el color de los alimentos. Teniendo en cuenta que la apariencia externa de los alimentos es uno de los primeros aspectos que el consumidor considera y que puede conducir a una aceptación o rechazo por parte del consumidor, es importante evaluar los parámetros del color en comparación con los gofres control, y evaluarlos a lo largo del tiempo de almacenamiento. La parte A y B de la **Tabla 12** muestra los valores obtenidos para cada uno de los parámetros de color evaluados (L^* , a^* y b^*) en cada una de las muestras y para los diferentes tiempos de almacenamiento así como los valores de pH (**Tabla 12**). Aunque visualmente es posible verificar un ligero cambio de color cuando se incorpora el extracto de *A. unedo*, que da un color más dorado (**Figura 16**, sub-figura 3.a) a los gofres, en comparación con el control **Figura 16**, sub-figura 3.b), los resultados muestran que estos cambios no son estadísticamente significativos.

Cuando evaluamos los distintos parámetros de color en pastelería y productos de panadería, es necesario tener en cuenta que el color de la corteza está directamente relacionado con la temperatura y el tiempo de cocción (Debonne et al. 2017) para esto, en este trabajo experimental se intentó ser muy estricto en relación con estos dos parámetros. Los resultados presentados en la **Tabla 12** (parte A y B) demuestran que la incorporación de un extracto de *A. unedo* rico en cianidina-3-*O*-glucósido no causó cambios significativos en el color e pH en los gofres, en comparación con el control, en los diferentes tiempos de almacenamiento. Por lo tanto, el colorante natural incorporado fue capaz de dar un color más oscuro visualmente, siendo más atractivo, pero no afectando totalmente el color original.

La **Tabla 12** (parte C, D y E) muestra el contenido de macronutrientes, energía, azúcares libres y ácido grasos de los gofres incorporados con extracto de *A. unedo* rico en cianidina-3-*O*-glucósido, durante el almacenamiento. Es posible verificar que los carbohidratos son los macronutrientes más abundantes en los gofres.

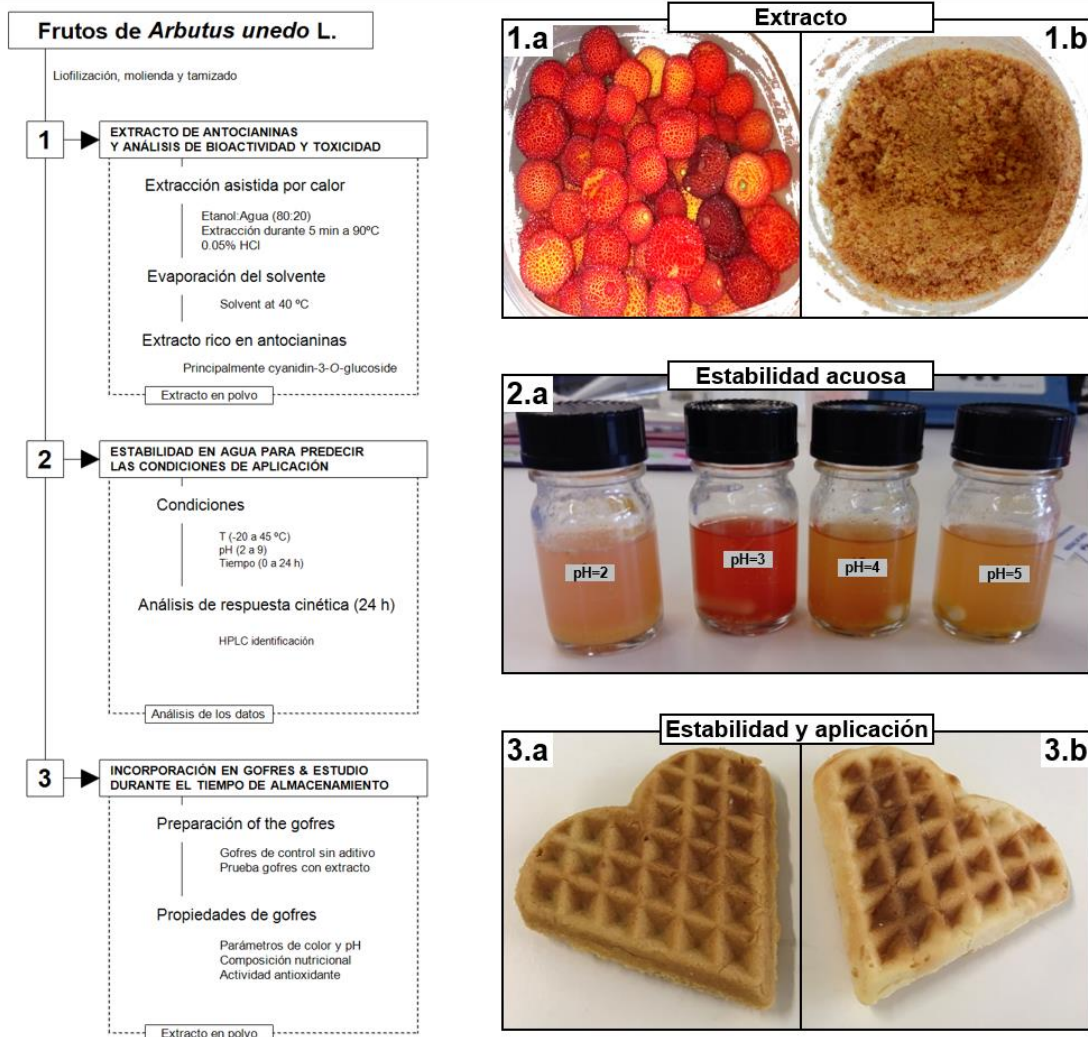


Figura 16. Diagrama que resume el trabajo realizado: la Sección 1 muestra el proceso de extracción de compuestos de antocianinas, en las *fig. 1.a* y *1.b* pueden verse los frutos de *A. unedo* enteros y pulverizados tras su liofilización, respectivamente; la Sección 2 describe la estabilidad en sistemas de solución acuosa, prediciendo su aplicación potencial en matrices alimentarias (la *fig. 2.a* muestra las diferencias causadas por la variable *pH*); y la Sección 3 representa los resultados visuales de la adición del extracto rico en cianidina-3-O-glucósido de *A. unedo* a los gofres (la *fig. 3.a* muestra los gofres adicionados con extracto de *A. unedo*, y la *3.b*, los gofres control sin extracto).

Los resultados muestran que la incorporación del extracto obtenido de *A. unedo* no produjo cambios significativos en relación con los gofres control durante todos los tiempos estudiados. Se detectaron tres azúcares libres en las muestras estudiadas: fructosa, glucosa y sacarosa, con una alta prevalencia del disacárido, que fue uno de los ingredientes alimentarios utilizados en la preparación de los mismos. Se detectaron diferencias significativas solo para la fructosa y la glucosa al final de 3 y 6 días,



mientras que los gofres incorporados con el extracto rico en antocianinas mostraron siempre mayores cantidades de estos azúcares en comparación con el control.

La **Tabla 12** muestra los seis ácidos grasos más abundantes detectados en las muestras de gofres. Aunque se identificaron catorce ácidos grasos en las muestras estudiadas, ocho se detectaron solo en cantidades traza (datos no mostrados). Los ácidos grasos más abundantes fueron ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) y ácido linoleico (C18:2n6). En este trabajo, verificamos que los ácidos grasos saturados aparecen en mayor cantidad que los insaturados y, como puede verse en la **Tabla 12**, la incorporación del extracto obtenido de *A. unedo* no produjo cambios significativos en el perfil de ácidos grasos al compararlos con los gofres control. Esto sucede durante a todos los *t* de almacenamiento probados.

Varios estudios han sido desarrollados por nuestro equipo, que utiliza diferentes extractos obtenidos de plantas o frutas para su incorporación en productos de pastelería y repostería con el objetivo de reemplazar los aditivos sintéticos. Ejemplos de este tipo de trabajo son: un estudio en el que se incorporaron flores de castaño en pasteles tradicionales del noreste de Portugal (Carocho et al., 2015) y un estudio en el que se pretendió incorporar extractos de hinojo y manzanilla en galletas (Caleja et al. 2017), tanto con el propósito de hacer que estos alimentos sean funcionales como para estudiar el posible uso de estos ingredientes naturales como un sustituto de los aditivos sintéticos. Ambos estudios presentan al ácido linoleico como uno de los principales ácidos grasos, sin embargo, contrariamente a lo presentado en este estudio, los ácidos grasos poliinsaturados aparecen como los más abundantes. Ambos estudios apuntan a la posibilidad de que este tipo de extractos naturales puedan ser utilizados como ingredientes naturales en nuevos productos de pastelería, ya que incorporan, como se presenta en este trabajo, propiedades beneficiosas para el consumidor sin alterar las características organolépticas del producto original.

Los resultados de la actividad captadora de radicales DPPH y el PR de las muestras de gofres durante el tiempo de almacenamiento se presentan en **Tabla 12**. Los resultados presentados en ambos ensayos demostraron claramente que la incorporación del extracto de *A. unedo* rico en cianidina-3-*O*-glucósido asignó propiedades beneficiosas a la matriz de alimentos ensayada, en comparación con los gofres control. Esto está en consonancia con los resultados obtenidos en estudios previos en los que se incorporaron



flores de castaño en tortas "económicas" (Carocho et al., 2015), extractos acuosos de hinojo y manzanilla en galletas (Caleja et al. 2017) e incluso en un estudio dónde se adicionó un extracto rico en catequina obtenido de *A. unedo* en pan (Takwa et al. 2018). Se concluyó que la incorporación de estos ingredientes naturales presenta propiedades beneficiosas para los productos alimenticios probados.

Tabla 12. Resultados de los parámetros del color, pH, valores nutricionales, contenidos de azúcar y ácidos grasos, y actividad antioxidante de las muestras de gofres.

PARÁMETROS	0 días			3 días			6 días		
	Control	AU	t-test	Control	AU	t-test	Control	AU	t-test
A) PARÁMETROS DEL COLOR									
<i>L</i> *	52,6±0,6	52±1	0,91	50,0±0,4	54±2	0,191	50,5±0,4	54±2	0,341
<i>a</i> *	18,1±0,5	16±1	0,168	19,5±0,1	15,3±0,5	0,005	18,2±0,5	15,6±0,4	0,02
<i>b</i> *	36,8±0,7	35±1	0,149	36,1±0,6	38±1	0,114	35,1±0,5	36±1	0,533
B) VALORES DE pH									
pH	5,64±0,09	5,3±0,1	0,009	5,58±0,04	5,7±0,3	0,329	5,48±0,06	5,9±0,5	0,185
C) VALORES NUTRICIONALES									
Humedad (g/100 g gofre)	11,42±0,08	11,25±0,09	0,058	11,5±0,2	11,9±0,1	0,054	11,4±0,2	10,9±0,1	0,018
Cenizas (g/100 g gofre)	0,018±0,01	0,018±0,01	0,682	0,020±0,01	0,017±0,01	0,205	0,017±0,01	0,018±0,01	0,396
Grasas (g/100 g gofre)	21,7±0,5	22,5±0,1	0,044	22,6±0,7	21,5±0,9	0,17	22,4±0,2	21,7±0,2	0,026
Proteínas (g/100 g gofre)	9,6±0,3	9,48±0,09	0,388	8,47±0,07	9,0±0,2	0,005	9,45±0,5	9,0±0,1	0,096
Azúcares (g/100 g gofre)	57,3±0,4	56,8±0,1	0,123	57,4±0,6	57,6±0,8	0,764	56,8±0,4	58,3±0,2	0,002
Energía (kcal/100 g gofre)	463±2	467±1	0,027	467±3	460±4	0,099	466±1	465±1	0,203
D) COMPOSICIÓN DE AZÚCARES LIBRES									
Fructosa (g/100 g gofre)	0,32±0,01	0,64±0,09	0,001	0,35±0,01	0,76±0,003	<0,001	0,33±0,01	0,69±0,001	<0,001
Glucosa (g/100 g gofre)	0,38±0,01	0,51±0,06	0,005	0,39±0,02	0,58±0,004	<0,001	0,31±0,02	0,53±0,003	<0,001
Sucrosa (g/100 g gofre)	28,1±0,2	28,3±0,9	0,702	28,4±0,4	29,2±0,7	0,06	28,17±0,07	30,0±0,7	0,004
Total (g/100 g gofre)	28,8±0,2	29±1	0,216	29,1±0,4	30,6±0,7	0,011	28,82±0,05	31,2±0,7	0,001
E) PERFIL EN ÁCIDOS GRASOS									
C12:0 (%)	3,3±0,1	3,22±0,09	0,332	3,1±0,2	3,21±0,07	0,234	3,28±0,08	3,3±0,1	0,728
C14:0 (%)	1,65±0,03	1,65±0,02	0,898	1,59±0,06	1,63±0,03	0,322	1,68±0,03	1,67±0,03	0,851
C16:0 (%)	30,8±0,4	30,8±0,4	0,942	29,8±0,3	30,5±0,5	0,073	31,4±0,4	31,4±0,5	0,839
C18:0 (%)	30,9±0,3	31,6±0,1	0,042	30,8±0,5	31±1	0,736	29,9±0,5	31,0±0,5	0,055
C18:2n6 (%)	30,4±0,2	29,7±0,3	0,036	31,9±0,5	31,3±0,4	0,121	30,9±0,2	29,8±0,4	0,021
C18:3n3 (%)	1,28±0,04	1,37±0,02	0,053	1,30±0,03	1,25±0,09	0,459	1,376±0,01	1,30±0,09	0,236
AGS (%)	67,9±0,2	68,5±0,3	0,046	66,4±0,5	67,1±0,4	0,138	67,4±0,2	68,5±0,5	0,03
AGMI (%)	0,34±0,03	0,38±0,01	0,162	0,35±0,01	0,39±0,01	0,024	0,34±0,04	0,38±0,01	0,19
AGPI (%)	31,7±0,2	31,1±0,3	0,041	33,2±0,5	32,5±0,4	0,125	32,2±0,2	31,1±0,5	0,027
F) ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE									
DPPH (mg/mL)	>200	43,3±0,6	<0,001	>200	43,5±0,5	<0,001	>200	57±1	<0,001
PR (mg/mL)	15,0±0,4	14±0,1	<0,001	21,7±0,8	14,42±0,20	<0,001	23,9±0,3	15,9±0,4	<0,001

Control- gofres sin extracto y AU- gofres con extracto de *A. unedo*. En cada línea y para cada tiempo de almacenamiento, se utilizó la *t* de Student para determinar las diferencias significativas entre 2 muestras diferentes, con $\alpha=0.05$. *L**, *a** y *b** representan los parámetros del color. AGS: Ácidos grasos saturados; AGMI- Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI- Ácidos grasos poliinsaturados. La actividad antioxidante fue evaluada en términos de valores de *EC*₅₀.



5. CONCLUSIÓN Y FUTUROS TRABAJOS

Dado el interés generalizado por las antocianinas, se ha intentado modernizar los protocolos de extracción, reducir la cantidad de solventes orgánicos usados (punto de vista ecológico) y mejorar el rendimiento de extracción (punto de vista económico). La falta de enfoques de optimización, específicamente en lo que concierne a la extracción de antocianinas, ha restado valor a la industria alimentaria para incorporar estos compuestos naturales en sus formulaciones.

Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo optimizar la extracción de antocianinas de frutos de *A. unedo* de un modo reproducible por el sector industrial, es decir, obtener un agente colorante alternativo para las industrias alimentarias, farmacéuticas y cosméticas. Se estudiaron y compararon dos métodos de extracción, EAC y EAU. El efecto conjunto de las variables relevantes para cada técnica, para maximizar la extracción de antocianinas, se describió a través de modelos RSM, que contribuyeron a la comprensión del potencial real que tendría la obtención de antocianinas de *A. unedo* para aplicaciones industriales. La técnica más efectiva fue la EAC, aplicada en condiciones de 5 min, 90°C y 80% de etanol acidificado dentro de un rango *S/L* de 5 a 40 g/L, obteniendo un extracto residual de ~60 % del total del fruto seco, con un contenido total de antocianinas de ~500 µg/g de fruto seco o de ~800 µg/g de residuo de extracto R.

La industria panadera/pastelería representa un sector económico importante y actualmente se encuentra en gran crecimiento y en constante innovación. Los gofres son pasteles mundialmente conocidos y consumidos. Por lo tanto, la producción de estos pasteles enriquecidos con colorantes naturales nos parece una sugerencia atractiva, que puede ser muy bien aceptada por los consumidores, cada vez más interesados en la elección de alimentos saludables y en los que no se incorporen aditivos artificiales, normalmente asociados con problemas de salud. Este estudio reveló que la adición de un extracto de *A. unedo* rico en cianidina-3-*O*-glucósido en gofres mejora su coloración y la actividad antioxidante, tornando el producto más atractivo y agregando beneficios a la salud del consumidor sin causar cambios significativos en el perfil nutricional de los gofres. Así, se demuestra que el extracto de *A. unedo* rico en cianidina-3-*O*-glucósido puede utilizarse en la producción de productos de pastelería innovadores y más saludables para el consumidor.



Una vez lograda la optimización del proceso extractivo para obtener antocianinas a partir de frutos de *A. unedo*, este estudio abre las puertas a futuras investigaciones más profundizadas sobre la estabilidad del mismo, analizando diferentes metodologías que consigan una mejor estabilización de las moléculas de antocianinas, como pueden ser la adición de compuestos (ácidos ascórbico, isoascórbico o cítrico) que logren efectos sinérgicos, o el uso de técnicas de encapsulación (microencapsulación, liposomas o nanoemulsiones). De este modo, podrán realizarse también futuros estudios sobre la aplicación del extracto en otras matrices alimentarias que sean adecuadas a las condiciones requeridas para un buen mantenimiento de la estabilidad de los compuestos, es decir, aquellas que presenten pHs bajos (inferiores a 3.5) y que no precisen altas temperaturas (preferiblemente no más de 35 °C) de preparación, pero sí bajas temperaturas de conservación.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aal, El-Sayed M., J.Christopher Young, and Iwona Rabalski. 2006. "Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple, and Red Cereal Grains." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(13):4696–4704.
- Alarcón-Alonso, Javier et al. 2012. "Pharmacological Characterization of the Diuretic Effect of *Hibiscus Sabdariffa* Linn (Malvaceae) Extract." *Journal of Ethnopharmacology* 139(3):751–56.
- Albuquerque, Bianca R. et al. 2016. "Catechin-Based Extract Optimization Obtained from *Arbutus Unedo* L. Fruits Using Maceration/microwave/ultrasound Extraction Techniques." *Industrial Crops and Products* 95:404–15.
- Albuquerque, Bianca R. et al. 2017. "Catechin-Based Extract Optimization Obtained from *Arbutus Unedo* L. Fruits Using Maceration/microwave/ultrasound Extraction Techniques." *Industrial Crops and Products* 95:404–15.
- Alonso-Salces, R. M. et al. 2001. "Pressurized Liquid Extraction for the Determination of Polyphenols in Apple." *Journal of Chromatography A* 933(1–2):37–43.
- Antolovich, Michael, Paul Prenzler, Kevin Robards, and Danielle Ryan. 2000. "Sample Preparation in the Determination of Phenolic Compounds in Fruits." *The Analyst* 125(5):989–1009.
- Barros, Lillian et al. 2013. "Phenolic Profiles of Cultivated, in Vitro Cultured and Commercial Samples of *Melissa Officinalis* L. Infusions." *Food Chemistry* 136(1):1–8.
- Barros, Lillian, Ana Maria Carvalho, Jorge Morais, and Isabel C. F. R. Ferreira. 2010. "Strawberry-Tree, Blackthorn and Rose Fruits: Detailed Characterisation in Nutrients and Phytochemicals with Antioxidant Properties." *Food Chemistry* 120(1):247–54.
- Bezerra, Marcos Almeida et al. 2008. "Response Surface Methodology (RSM) as a Tool for Optimization in Analytical Chemistry." *Talanta* 76(5):965–77.
- Bosiljkov, Tomislav et al. 2017. "Natural Deep Eutectic Solvents and Ultrasound-Assisted Extraction: Green Approaches for Extraction of Wine Lees Anthocyanins." *Food and Bioproducts Processing* 102:195–203.
- Brock, W. H. 1998. *Historia de La Química*.
- Brouillard, Raymond. 1982. "Chapter 1 - Chemical Structure of Anthocyanins A2 - Markakis, Pericles BT - Anthocyanins As Food Colors." Pp. 1–40 in *Anthocyanins As Food Colors*. Academic Press.
- Caleja, Cristina, Lillian Barros, Amilcar L. Antonio, M.Beatriz P.P. Oliveira, and Isabel C. F. R. Ferreira. 2017. "A Comparative Study between Natural and Synthetic Antioxidants: Evaluation of Their Performance after Incorporation into Biscuits." *Food Chemistry* 216:342–46.
- Caparrós, A. R. and F. M. M. Verdú. 2010. "Presente Y Futuro de Los Colorantes Naturales." Pp. 384–87 in *IX Congreso Nacional del Color*.



- Carmona, Iris. 2013. "De Colorantes Sintéticos a Naturales En La Industria Alimentaria." *Agrimundo, ODEPA, Ministerio de Agricultura Chile* 5:1–6.
- Carocho, Márcio et al. 2015. "Traditional Pastry with Chestnut Flowers as Natural Ingredients: An Approach of the Effects on Nutritional Value and Chemical Composition." *Journal of Food Composition and Analysis* 44:93–101.
- Carocho, Márcio and Isabel C. F. R. Ferreira. 2013. "The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer--a Review." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 13(8):1236–58.
- Carocho, Marcio Márcio, Maria Filomena María Filomena Barreiro, Patricia Morales, and Isabel C. F. R. Ferreira. 2014. "Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(4):377–99.
- Carvalho, A. M. 2010. *Plantas Y Sabiduría Popular Del Parque Natural de Montesinho. Un Estudio Etnobotánico En Portugal*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Castañeda-Ovando, Araceli, Ma de Lourdes Pacheco-Hernández, Ma Elena Páez-Hernández, José A. Rodríguez, and Carlos Andrés Galán-Vidal. 2009. "Chemical Studies of Anthocyanins: A Review." *Food Chemistry* 113(4):859–71.
- Castañeda-Sánchez, A. and JA Guerrero-Beltrán. 2015. "Pigmentos En Frutas Y Hortalizas Rojas: Antocianinas." *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos* 9:25–33.
- Cavalcanti, Rodrigo N., Diego T. Santos, and Maria Angela A. Meireles. 2011. "Non-Thermal Stabilization Mechanisms of Anthocyanins in Model and Food Systems--An Overview." *Food Research International* 44(2):499–509.
- Cevallos-Casals, Bolívar A. and Luis Cisneros-Zevallos. 2004. "Stability of Anthocyanin-Based Aqueous Extracts of Andean Purple Corn and Red-Fleshed Sweet Potato Compared to Synthetic and Natural Colorants." *Food Chemistry* 86(1):69–77.
- Chen, Fang et al. 2007. "Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanins in Red Raspberries and Identification of Anthocyanins in Extract Using High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry." *Ultrasonics Sonochemistry* 14(6):767–78.
- Chen, Pei-Ni et al. 2005. "Cyanidin 3-Glucoside and Peonidin 3-Glucoside Inhibit Tumor Cell Growth and Induce Apoptosis in Vitro and Suppress Tumor Growth in Vivo." *Nutrition and Cancer* 53(2):232–43.
- Cheok, C. Y., N. L. Chin, Y. A. Yusof, R. A. Talib, and C. L. Law. 2013. "Optimization of Total Monomeric Anthocyanin (TMA) and Total Phenolic Content (TPC) Extractions from Mangosteen (*Garcinia Mangostana* Linn.) Hull Using Ultrasonic Treatments." *Industrial Crops and Products* 50(Supplement C):1–7.
- Clifford, Michael N. 2000. "Anthocyanins – Nature, Occurrence and Dietary Burden." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7):1063–72.
- Corona, Giulia, Fiona Tang, David Vauzour, Ana Rodriguez-Mateos, and Jeremy P. E. Spencer. 2011. "Assessment of the Anthocyanidin Content of Common Fruits and Development of a Test Diet Rich in a Range of Anthocyanins." *Journal of Berry*



- Research* 1(4):209–16.
- Corrales, M., S. Toepfl, P. Butz, D. Knorr, and B. Tauscher. 2008. “Extraction of Anthocyanins from Grape by-Products Assisted by Ultrasonics, High Hydrostatic Pressure or Pulsed Electric Fields: A Comparison.” *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9(1):85–91.
- Cubero, N., A. Monferrer, and J. Villalta. 2002. *Aditivos Alimentarios*. edited by S. A. M.-P. LIBROS.
- Dai, Jin and Russell J. Mumper. 2010. “Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties.” *Molecules* 15(10):7313–52.
- Debonne, Els, Filip Van Bockstaele, Euge Philips, Ingrid De Leyn, and Mia Eeckhout. 2017. “Impact of Par-Baking and Storage Conditions on the Quality of Par-Baked and Fully Baked Bread.” *LWT - Food Science and Technology* 78:16–22.
- Delgado-Vargas, Francisco and Octavio Paredes-Lopez. 2003. “Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses.” *Trends in Food Science & Technology* 14(November 2014):438.
- Demeule, Michel et al. 2002. “Green Tea Catechins as Novel Antitumor and Antiangiogenic Compounds.” *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents* 2:441–63.
- Devcich, Daniel A., Irene K. Pedersen, and Keith J. Petrie. 2007. “You Eat What You Are: Modern Health Worries and the Acceptance of Natural and Synthetic Additives in Functional Foods.” *Appetite* 48(3):333–37.
- Ding, Min et al. 2006. “Cyanidin-3-Glucoside, a Natural Product Derived from Blackberry, Exhibits Chemopreventive and Chemotherapeutic Activity.” *Journal of Biological Chemistry* 281(25):17359–68.
- Durán, Luis. 2001. “Aditivos Naturales.” *Arbor* 168(661):87–107.
- Elisia, Ingrid, Chun Hu, David G. Popovich, and David D. Kitts. 2006. “Antioxidant Assessment of an Anthocyanin-Enriched Blackberry Extract.” *Food Chemistry* 101(3):1052–58.
- Escribano-Bailon, M.Teresa, Celestino Santos-Buelga, and Julian C. Rivas-Gonzalo. 2004. “Anthocyanins in Cereals.” *Journal of Chromatography. A* 1054(1–2):129–41.
- Fernandes, Angela et al. 2012. *Effects of Gamma Irradiation on Physical Parameters of Lactarius Deliciosus Wild Edible Mushrooms*.
- Ferreira, S. L. C. et al. 2007. “Box-Behnken Design: An Alternative for the Optimization of Analytical Methods.” *Analytica Chimica Acta* 597(2):179–86.
- Food Ingredients Brasil. 2008. “Segurança Alimentar.” *Food Ingredients Brasil* 32–43.
- Fortalezas, Sofia et al. 2010. “Antioxidant Properties and Neuroprotective Capacity of Strawberry Tree Fruit (*Arbutus Unedo*).” *Nutrients* 2(2):214–29.
- Garzón, Gloria Astrid. 2008. “Las Antocianinas Como Colorantes Naturales Y Compuestos Bioactivos: Revisión.” *Acta Biol. Colomb.* 13(3):27–36.
- Ge, Qin and Xiaojun Ma. 2013. “Composition and Antioxidant Activity of Anthocyanins Isolated from Yunnan Edible Rose (An Ning).” *Food Science and*



- Human Wellness* 2(2):68–74.
- Gettens, R. J. and G. L. Stout. 1996. *Painting Materials: A Short Encyclopedia*.
- Ghafoor, Kashif, Yong Hee Choi, Ju Yeong Jeon, and In Hee Jo. 2009. “Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis Vinifera*) Seeds.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(11):4988–94.
- Ghasemzadeh, Ali, Hawa Z. E. Jaafar, Ehsan Karimi, and Asmah Rahmat. 2014. “Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Flavonoid Compounds and Their Pharmaceutical Activity from Curry Leaf (*Murraya Koenigii* L.) Using Response Surface Methodology.” *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14(318):1–10.
- Ghassempour, Alireza et al. 2008. “Study of New Extraction Methods for Separation of Anthocyanins from Red Grape Skins: Analysis by HPLC and LC-MS/MS.” *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 31(17):2686–2703.
- Gironés-Vilaplana, Amadeo et al. 2014. “Evaluation of Latin-American Fruits Rich in Phytochemicals with Biological Effects.” *Journal of Functional Foods* 7(1):599–608.
- Guimarães, Rafaela et al. 2013. “Characterisation of Phenolic Compounds in Wild Fruits from Northeastern Portugal.” *Food Chemistry* 141:3721–30.
- Guimarães, Rafaela et al. 2014. “Bioactivity of Different Enriched Phenolic Extracts of Wild Fruits from Northeastern Portugal: A Comparative Study.” *Plant Foods for Human Nutrition* 69(1):37–42.
- Guimaraes, Rafaela, Lillian Barros, Ana Maria Carvalho, and Isabel C. F. R. Ferreira. 2010. “Studies on Chemical Constituents and Bioactivity of *Rosa Micrantha*: An Alternative Antioxidants Source for Food, Pharmaceutical, or Cosmetic Applications.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(10):6277–84.
- Heleno, Sandrina A. et al. 2016. “Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Ergosterol from *Agaricus Bisporus* L. by-Products Using Response Surface Methodology.” *Food and Bioprocess Technology* 100, Part:25–35.
- Herrera, M. C. and M. D. Luque De Castro. 2004. “Ultrasound-Assisted Extraction for the Analysis of Phenolic Compounds in Strawberries.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379(7–8):1106–12.
- Holmyard, E. J. 1990. *Alchemy*.
- Hutchings, J. B. 1999. *Food Colour and Appearance*. Springer, Boston, MA.
- Ibañez, F.C; Torre, P y Irigoyen, A. 2003. “Aditivos Alimentarios.” *Universitas Navarrensis* 1–10.
- Ince, Alev Emine, Serpil Şahin, and Servet Gülüm Şümnü. 2013. “Extraction of Phenolic Compounds from Melissa Using Microwave and Ultrasound.” *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 37(1):69–75.
- Komatsu, Yoshihiro et al. 2014. “Effects of pH and Temperature on Reaction Kinetics of Catechins in Green Tea Infusion.” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 57(6):907–10.



- Labbé, David, Bernard Têtu, Dominique Trudel, and Laurent Bazinet. 2008. "Catechin Stability of EGC- and EGCG-Enriched Tea Drinks Produced by a Two-Step Extraction Procedure." *Food Chemistry* 111:139–43.
- Lapornik, Brigita, Mirko Prošek, and Alenka Golc Wondra. 2005. "Comparison of Extracts Prepared from Plant by-Products Using Different Solvents and Extraction Time." *Journal of Food Engineering* 71(2):214–22.
- Li, Na, Lynne S. Taylor, Mario G. Ferruzzi, and Lisa J. Mauer. 2012. "Kinetic Study of Catechin Stability: Effects of pH, Concentration, and Temperature." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:12531–12539.
- Li, Na, Lynne S. Taylor, and Lisa J. Mauer. 2011. "Degradation Kinetics of Catechins in Green Tea Powder: Effects of Temperature and Relative Humidity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(11):6082–90.
- López, G. G. 2001. *Los Árboles Y Arbustos de La Península Ibérica E Islas Baleares. Tomo II*. Mundi-Prensa.
- Mak, Yin Wei, Li Oon Chuah, Rosma Ahmad, and Rajeev Bhat. 2013a. "Antioxidant and Antibacterial Activities of Hibiscus (*Hibiscus Rosa-Sinensis* L.) and Cassia (*Senna Bicapsularis* L.) Flower Extracts." *Journal of King Saud University - Science* 25(4):275–82.
- Mak, Yin Wei, Li Oon Chuah, Rosma Ahmad, and Rajeev Bhat. 2013b. "Antioxidant and Antibacterial Activities of Hibiscus (*Hibiscus Rosa-Sinensis* L.) and Cassia (*Senna Bicapsularis* L.) Flower Extracts." *Journal of King Saud University - Science* 25(4):275–82.
- Maran, J. Prakash and B. Priya. 2014. "Ultrasound-Assisted Extraction of Polysaccharide from *Nephelium Lappaceum* L. Fruit Peel." *International Journal of Biological Macromolecules* 70:530–36.
- Martins, Natália, Custódio Lobo Roriz, Patricia Morales, Lillian Barros, and Isabel C. F. R. Ferreira. 2016. "Food Colorants: Challenges, Opportunities and Current Desires of Agro-Industries to Ensure Consumer Expectations and Regulatory Practices." *Trends in Food Science and Technology* 52:1–15.
- Melo, Maria J., Fernando Pina, and Claude Andary. 2009. "Anthocyanins: Nature's Glamorous Palette." in *Handbook of Natural Colorants*, edited by T. Bechtold and R. Mussak.
- Miguel, Maria G., Maria L. Faleiro, Adriana C. Guerreiro, and Maria D. Antunes. 2014. "Arbutus Unedo L.: Chemical and Biological Properties." *Molecules* 19(10):15799–823.
- Moro, R. S. 1988. *Guia de Arboles de España*. edited by E. O. S.A.
- Multon, J. L. 2000. *Aditivos Y Auxiliares de Fabricación En Las Industrias Agroalimentarias*.
- Murado, M. A. and M. A. Prieto. 2013. "NOEC and LOEC as Merely Concessive Expedients: Two Unambiguous Alternatives and Some Criteria to Maximize the Efficiency of Dose–response Experimental Designs." *Science of The Total Environment* 461–462(9):576–86.
- Olea, M. F., M. C. López, and C. C. Hug. 2012. *Aspectos Bromatológicos de*



- Colorantes Y Conservantes: Toxicología Alimentaria*. edited by D. DE SANTOS.
- Ortíz, Miguel Aguilera, M^a del Carmen Reza Vargas, Rodolfo Gerardo, Chew Madinaveitia, and Jorge Armando Meza Velázquez. 2011. "Propiedades Funcionales de Las Antocianinas." *Biotecnia* 13:16–22.
- Parra Ortega, Veronica Paz. 2004. "Estudio Comparativo En El Uso de Colorantes Artificiales Y Sinteticos En Alimentos Desde El Punto de Vista Funcional Y Toxicológico." *Universidad Austral de Chile* 86.
- Pinela, José, M. A. Prieto, et al. 2016. "Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Acids and Flavonoids and Production of Antioxidant Ingredients from Tomato: A Nutraceutical-Oriented Optimization Study." *Separation and Purification Technology* 164:114–24.
- Pinela, José, Lillian Barros, et al. 2016. "Quality Control of Gamma Irradiated Dwarf Mallow (*Malva Neglecta* Wallr.) Based on Color, Organic Acids, Total Phenolics and Antioxidant Parameters." *Molecules* 21(4):467.
- Pinela, José et al. 2017. "Valorisation of Tomato Wastes for Development of Nutrient-Rich Antioxidant Ingredients: A Sustainable Approach towards the Needs of the Today's Society." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 41:160–71.
- Pingret, Daniella, Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Carine Le Bourvellec, Catherine M. G. C. Renard, and Farid Chemat. 2012. "Lab and Pilot-Scale Ultrasound-Assisted Water Extraction of Polyphenols from Apple Pomace." *Journal of Food Engineering* 111(1):73–81.
- Piñeiro, Zulema, Miguel Palma, and Carmelo G. Barroso. 2004. "Determination of Catechins by Means of Extraction with Pressurized Liquids." *Journal of Chromatography A* 1026(1–2):19–23.
- Polunin, O. 1989. *Arboles Y Arbustos de Europa*. Ediciones.
- Prieto, M. A., Thomas P. Curran, A. Gowen, and J. A. A. Vázquez. 2015. "An Efficient Methodology for Quantification of Synergy and Antagonism in Single Electron Transfer Antioxidant Assays." *Food Research International* 67:284–98.
- Prieto, M. A. and J. A. Vázquez. 2014. "In Vitro Determination of the Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacity of Unroasted Coffee Bean Extracts and Their Synergistic and Antagonistic Effects." *Food Research International* 62(10):1183–96.
- Prieto, M. A., J. A. Vázquez, and M. A. Murado. 2012a. "A Simple Pseudo-Mechanistic Model for the Response Characterization and Quantification of the Copper-Induced Oxidative LDL Method." *Free Radical Biology and Medicine* 53:S245.
- Prieto, M. A., J. A. Vázquez, and M. A. Murado. 2012b. "Comparison of Several Mathematical Models for Describing the Joint Effect of Temperature and Ph on Glucanex Activity." *Biotechnology Progress* 28(2):372–81.
- Prieto, M. A., J. A. Vázquez, and M. A. Murado. 2015a. "A New and General Model to Describe, Characterize, Quantify and Classify the Interactive Effects of Temperature and pH on the Activity of Enzymes." *The Analyst* 140(10):3587–3602.



- Prieto, M. A., J. A. Vázquez, and M. A. Murado. 2015b. "Crocic Bleaching Antioxidant Assay Revisited: Application to Microplate to Analyse Antioxidant and pro-Oxidant Activities." *Food Chemistry* 1(167):299–310.
- Prieto, M. A. and JA Vázquez. 2014. "Time-Dose Model to Quantify the Antioxidant Responses of the Oxidative Hemolysis Inhibition Assay (OxHLIA) and Its Extension to Evaluate Other Hemolytic Effectors." *BioMed Research International* 2014(Article ID 632971):15 pages.
- Prior, Ronald L. and Xianli Wu. 2006. "Anthocyanins: Structural Characteristics That Result in Unique Metabolic Patterns and Biological Activities." *Free Radical Research* 40(10):1014–28.
- Quert Font, P. 1988. *Plantas Medicinales. El Dioscórides Renovado*. 11th ed. edited by E. L. S.A.
- Rastogi, Navin K. 2011. "Opportunities and Challenges in Application of Ultrasound in Food Processing." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51(8):705–22.
- Renna, Massimiliano and Maria Gonnella. 2012. "The Use of the Sea Fennel as a New Spice-Colorant in Culinary Preparations." *International Journal of Gastronomy and Food Science* 1(2):111–15.
- Riederer, J. 1997. *Artists' Pigments. A Handbook of Their History and Characteristics*.
- Rivas, Julián C., Celestino Santos, Olga Lock, and Isabel Cabello. 2003. *Antocianos Y Betaláinas: Colorantes Naturales de Aplicación Industrial*.
- Rosso, L., J. R. Lobry, S. Bajard, and J. P. Flandrois. 1995. "Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth." *Applied and Environmental Microbiology* 61(2):610–16.
- Rosúa, J. L., L. López de Hierro, J. C. Martin, F. A. Serrano, and A. L. Sánchez. 2001. *Procedencias de Las Especies Vegetales Autóctonas de Andalucía Utilizadas En Restauración de La Cubierta Vegetal. Tomo I. Andalucía*.
- Ruiz-Rodríguez, Brígida-María et al. 2011. "Valorization of Wild Strawberry-Tree Fruits (*Arbutus Unedo* L.) through Nutritional Assessment and Natural Production Data." *Food Research International* 44(5):1244–53.
- Salazar-González, Claudia, Fidel T. Vergara-Balderas, Ana E. Ortega-Regules, and José Á. -Beltrán. 2012. "Antioxidant Properties and Color of *Hibiscus Sabdariffa* Extracts." *Ciencia E Investigación Agraria* 39(1):79–90.
- San Andrés, Margarita, Natalia Sancho, and Manuel De la Roja. 2010. "Alquimia: Pigmentos Y Colorantes Históricos." *Anales de La Real Sociedad Española de Química* 106(1):58–65.
- Sang, Jun, Jie Sang, Qun Ma, Xiao fang Hou, and Cui qin Li. 2017. "Extraction Optimization and Identification of Anthocyanins from Nitraria Tangutorun Bobr. Seed Meal and Establishment of a Green Analytical Method of Anthocyanins." *Food Chemistry* 218:386–95.
- Sari, Puspita, Christofora Hanny Wijaya, Dondin Sajuthi, and Unang Supratman. 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(4):1908–14.
- Sasaki, Rie et al. 2007. “Cyanidin 3-Glucoside Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Sensitivity due to Downregulation of Retinol Binding Protein 4 Expression in Diabetic Mice.” *Biochemical Pharmacology* 74(11):1619–27.
- Shim, Soon-Mi et al. 2011. “Consumers’ Knowledge and Safety Perceptions of Food Additives: Evaluation on the Effectiveness of Transmitting Information on Preservatives.” *Food Control* 22(7):1054–60.
- Shipp, Jaclyn and El-Sayed M. Abdel-Aal. 2010. “Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients.” *The Open Food Science Journal* 4:7–22.
- Silva, S., E. M. Costa, C. Calhau, R. M. Morais, and M. E. Pintado. 2017. “Anthocyanin Extraction from Plant Tissues: A Review.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(14):3072–83.
- Sivakumar, Venkatasubramanian, J.Lakshmi Anna, J. Vijayeeswarri, and G. Swaminathan. 2009. “Ultrasound Assisted Enhancement in Natural Dye Extraction from Beetroot for Industrial Applications and Natural Dyeing of Leather.” *Ultrasonics Sonochemistry* 16(6):782–89.
- Soković, Marina, Jasmina Glamočlija, Petar D. Marin, Dejan Brkić, and Leo J. L. D. van Griensven. 2010. “Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model.” *Molecules* 15(11):7532–46.
- Soković, Marina and Leo J. L. D. van Griensven. 2006. “Antimicrobial Activity of Essential Oils and Their Components against the Three Major Pathogens of the Cultivated Button Mushroom, *Agaricus Bisporus*.” *European Journal of Plant Pathology* 116(3):211–24.
- Su, Ya Lun, Lai Kwok Leung, Yu Huang, and Zhen Yu Chen. 2003. “Stability of Tea Theaflavins and Catechins.” *Food Chemistry* 83:189–95.
- Sun, Yujing, Donghong Liu, Jianchu Chen, Xingqian Ye, and Dong Yu. 2011. “Effects of Different Factors of Ultrasound Treatment on the Extraction Yield of the All-Trans- β -Carotene from Citrus Peels.” *Ultrasonics Sonochemistry* 18(1):243–49.
- Takwa, Sallawi et al. 2018. “*Arbutus Unedo* L. and *Ocimum Basilicum* L. as Sources of Natural Preservatives for Food Industry: A Case Study Using Loaf Bread.” *LWT - Food Science and Technology* 88(Supplement C):47–55.
- Tijskens, L. M. M., K. W. Waldron, A. Ng, L. Ingham, and C. van Dijk. 1997. “The Kinetics of Pectin Methyl Esterase in Potatoes and Carrots during Blanching.” *Journal of Food Engineering* 34(4):371–85.
- Timberlake, C. F. 1980. “Anthocyanins - Occurrence, Extraction and Chemistry.” *Food Chemistry* 5(1):69–80.
- Timberlake C.F., Henry B. S. 1988. “Anthocyanins as Natural Food Colorants.” *Prog. Clin. Biol. Res.* 280:107–21.
- Tsuda, Takanori, Fumihiko Horio, Koji Uchida, Hiromitsu Aoki, and Toshihiko Osawa. 2003. “Dietary Cyanidin 3-O-Beta-D-Glucoside-Rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice.” *The Journal of Nutrition* 133(May):2125–30.



- Vicent García, J. .. 1991. “El Neolítico. Transformaciones Sociales Y Economicas.” *Boletín de Antropología Americana* 24:31–61.
- Vieira, Gláucia S., Rodrigo N. Cavalcanti, M. Angela A. Meireles, and Miriam D. Hubinger. 2013. “Chemical and Economic Evaluation of Natural Antioxidant Extracts Obtained by Ultrasound-Assisted and Agitated Bed Extraction from Jussara Pulp (*Euterpe Edulis*).” *Journal of Food Engineering* 119(2):196–204.
- Vieira, Vanessa et al. 2017. “Optimization and Comparison of Maceration and Microwave Extraction Systems for the Production of Phenolic Compounds from *Juglans Regia* L. for the Valorization of Walnut Leaves.” *Industrial Crops and Products* 107:341–52.
- Vilkhu, Kamaljit, Raymond Mawson, Lloyd Simons, and Darren Bates. 2008. *Applications and Opportunities for Ultrasound Assisted Extraction in the Food Industry--A Review*.
- Vuong, Quan V., John B. Golding, Minh Nguyen, and Paul D. Roach. 2010. “Extraction and Isolation of Catechins from Tea.” *Journal of Separation Science* 33(21):3415–28.
- Wrolstad, Ronald E., M. Monica Giusti, and Wilhelmina Kalt. 2000. *Anthocyanins*.
- Xu, Jin W., Katsumi Ikeda, and Yukio Yamori. 2004. “Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Cyanidin-3-Glucoside, a Typical Anthocyanin Pigment.” *Hypertension* 44(2):217–22.
- Zhu, Qin Yan et al. 2002. “Stability of the Flavan-3-Ols Epicatechin and Catechin and Related Dimeric Procyanidins Derived from Cocoa.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(6):1700–1705.
- Zhu, Qin Yan, Anqi Zhang, David Tsang, Yu Huang, and Zhen-yu Chen. 1997. “Stability of Green Tea Catechins.” 4624–28.
- Zhu, Zhenzhou et al. 2017. “HPLC-DAD-ESI-MS2 Analytical Profile of Extracts Obtained from Purple Sweet Potato after Green Ultrasound-Assisted Extraction.” *Food Chemistry* 215:391–400.
- Ziani, Borhane E. C. et al. 2015. “Bioactive Properties of Medicinal Plants from the Algerian Flora: Selecting the Species with the Highest Potential in View of Application Purposes.” *Industrial Crops and Products* 77:582–89.