

*Desarrollo y optimización de técnicas de
extracción y análisis de compuestos con
actividad biológica en maqui
(*Aristotelia chilensis*)*



Mercedes Vázquez Espinosa
4º Curso Grado en Química

TUTORES:

Gerardo Fernández Barbero

Estrella Espada Bellido



Facultad de Ciencias

**Desarrollo y optimización de técnicas de
extracción y análisis de compuestos con actividad
biológica en maqui
(*Aristotelia chilensis*)**

Mercedes Vázquez Espinosa

Grado en Química

2016 – 2017



MEMORIA PRESENTADA POR
MERCEDDES VÁZQUEZ ESPINOSA
PARA OPTAR AL GRADO EN QUÍMICA

Fdo.: Mercedes Vázquez Espinosa



Dr. D. Gerardo Fernández Barbero y Dra. Dña. Estrella Espada Bellido, Profesores del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “**Desarrollo y optimización de técnicas de extracción de compuestos con actividad biológica en maqui (*Aristotelia chilensis*)**”, ha sido realizado bajo su tutorización por Dña. Mercedes Vázquez Espinosa para optar al Grado en Química por la Universidad de Cádiz.

Y para que conste, expiden y firman la presente certificación

En Puerto Real, a 18 de julio de 2017

Fdo.: Dr. D. Gerardo Fernández Barbero

Fdo.: Dra. Dña. Estrella Espada Bellido



“Debido a esta fuerza nace el árbol de una pequeña semilla. El poder de los elementos hace que la planta viva y se desarrolle. Por esta misma energía los animales se nutren y crecen. Asimismo, esa fuerza reside en el cuerpo humano”

Teofrasto Paracelso



AGRADECIMIENTOS

No ha sido nada fácil y los que me conocen lo saben, pero tras varios meses de duro trabajo, aquí está terminado. Es por esto que quiero agradecer a todos aquellos que me han acompañado durante estos complicados meses.

En primer lugar, agradecer a mis tutores Gerardo Fernández Barbero y Estrella Espada Bellido por estar siempre ahí, ayudando y aportando todos sus conocimientos para que quede “PERFECTO”, en ese despacho tan concurrido que se ha convertido en mi segunda casa. Aunque esto ha supuesto también que saliera de mi “zona de confort” muchas veces (¡Cosa que no ha sido tan agradable!), pero siempre sea por aprender y mejorar.

A mi amiga Ana Velasco, que sin saber cuándo ni cómo, se convirtió en una fiel compañera durante esta etapa, que aseguro tal y como dicen que es una de las más bonitas. Por compartir conmigo tantas aventuras, días tan largos e interminables de trabajo y aquel pequeño laboratorio tan tan ruidoso.

A Marta, que de forma desinteresada, me ha aportado todos sus consejos y sugerencias para que quedara genial.

A mis amigos y familiares, por repetirme tantas veces lo orgullosos que se sentían, y que han estado siempre animándome en los momentos de bajón y alegrándose de mis logros. Después de tantas charlas sobre mi “superfruto” que ¡Ya no sabíamos que inventar!

Y por último, pero no menos importante a mis padres, a los que tengo tanto que agradecer por haber estado ahí no solo a la hora de realizar este trabajo, sino a lo largo de toda mi vida. A los que le dedico este trabajo ya que TODO lo que he conseguido ha sido gracias a ellos.



ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Summary	2
3. Introducción	4
4. Objetivos	12
5. Resultados	13
5.1. Materiales y métodos	13
5.2. Resultados y discusión	23
6. Conclusiones	46
7. Bibliografía	47
8. Apéndices	51



1. RESUMEN

La baya maqui (*Aristotelia chilensis*) es una fruta de color púrpura/negro de unos 6 mm de diámetro, originaria del centro y sur de Chile, así como del suroeste de Argentina. El maqui, también conocida como “superfruta”, es una rica fuente de compuestos de interés biológico, mostrando uno de los niveles más altos de compuestos fenólicos totales y antocianinas de todas las frutas. Debido a su composición, presenta un gran potencial antioxidante y propiedades antiinflamatorias y anticarcinógenas, lo que contribuye a proporcionar muchos beneficios para la salud. En los últimos años, la demanda de esta fruta se ha incrementado gracias a su interés comercial y científico.

Debido a que las bayas de maqui se han comercializado recientemente, es necesario desarrollar técnicas de extracción y análisis de esta fruta. En este trabajo, se han desarrollado dos métodos de extracción diferentes, la extracción asistida por microondas (MAE) y la extracción asistida por ultrasonidos (UAE), comparando las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos para la extracción tanto de los compuestos fenólicos totales como de las antocianinas.

Para ello, se realizó un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken, empleando cuatro variables en el caso de MAE (porcentaje de metanol en el disolvente, pH, temperatura y relación “masa de muestra/volumen de disolvente”) y 6 en el caso de UAE (porcentaje de metanol en el disolvente, pH, temperatura, relación “masa de muestra/volumen de disolvente, amplitud y ciclo) y dos respuestas (concentración de compuestos fenólicos y antocianinas totales).

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales, se ha empleado el procedimiento de Folin-Ciocalteu, el cual permite obtener la concentración total de estas moléculas mediante espectroscopía UV-Vis. Para la identificación de las antocianinas se ha empleado un equipo de cromatografía de ultra-eficacia acoplado a un espectrómetro de masas, y para su separación y cuantificación, se ha utilizado un equipo de cromatografía HPLC con detector UV-Vis, midiendo a 520 nm, siendo ésta la longitud de onda del máximo de absorción de las antocianinas. Se han identificado 8 antocianinas en las muestras de maqui: 3-*O*-glucósidos, 3,5-*O*-diglucósidos, 3-*O*-sambubiósidos y 3-*O*-sambubiósidos-5-*O*-glucósidos tanto de cianidina como de delphinidina.

Se ha obtenido que, independientemente de la técnica de extracción empleada, para conseguir extraer los compuestos fenólicos totales presentes en el maqui, el parámetro más influyente es la temperatura; mientras que para conseguir extraer las antocianinas presentes en el maqui, el principal parámetro es el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción.



Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos de cinética para obtener el tiempo óptimo de extracción de estos compuestos de alto interés biológico. Además, se efectuaron ensayos de repetibilidad y precisión intermedia, obteniendo un resultado positivo en todos los casos, con un coeficiente de variación inferior al 5%. Estos resultados indicaron que ambas técnicas empleadas son robustas y precisas.

Finalmente, los dos nuevos métodos se aplicaron con éxito a muestras reales para investigar la presencia de compuestos fenólicos totales y antocianinas en varios alimentos elaborados con bayas maqui.

2. SUMMARY

Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) is a purple/black color fruit of about 6 mm diameter native from the center and south of Chile and southwestern Argentina. Maqui, also known as a "superfruit", is a rich source of compounds of biological interest, showing one of the highest levels of total phenolic compounds and anthocyanins in fruits. Due to its composition, includes powerful antioxidants and anti-inflammatory and anti-carcinogenic properties, which contributes to many health benefits. In recent years, the demand for this fruit has increased thanks to its commercial and scientific interest.

Due to maqui berries have been recently commercialized, it is necessary to develop extraction and analysis techniques of this fruit. In this work, two different extraction methods have been developed, comparing the advantages and disadvantages of each one, the microwave assisted extraction (MAE) and the ultrasonic assisted extraction (UAE), for the extraction of both total phenolic compounds and anthocyanins.

Therefore, a Box-Behnken experimental design was carried out, using four variables in the case of MAE (percentage of methanol in the solvent, pH, temperature, and relationship between "mass of sample/volume of solvent") and six in the case of UAE (percentage of methanol in the solvent, pH, temperature, relationship between "mass of sample/volume of solvent", amplitude, and cycle) and two responses (concentration of total phenolic compounds and anthocyanins).

For the quantification of total phenolic compounds, the Folin-Ciocalteu's procedure has been used, which allows the determination of the total concentration of these molecules by UV-Vis spectroscopy. For the identification of anthocyanins, an ultra-efficiency chromatography equipment coupled to a mass spectrometer has been used and for its separation and quantification, HPLC chromatography equipment with UV-Vis detector, measuring at 520 nm, have been used. This is the wavelength of the maximum absorption of the anthocyanins. A total of 8 anthocyanins have been identified in the maqui samples which are: 3-*O*-glucosides, 3,5-*O*-diglucosides, 3-*O*-sambubiosides and 3-*O*-sambubiosides-5-*O*-glucosides of cyanidin and delphinidin.



It is obtained that, independently of the extraction technique, the most important variable for the extraction of phenolic compounds was the temperature; While percentage of methanol in the extraction solvent was the most relevant variable for the extraction of anthocyanins.

Then, some kinetics essays were carried out to obtain the optimal time of extraction for these compounds with high biological interest. Repeatability and intermediate precision tests were also carried out, giving a positive result in all cases, with a coefficient of variation less than 5%. These results pointed out that both techniques are robust and precise.

Finally, the two new methods were successfully applied to real samples for the analysis of total phenolic compounds and anthocyanins in foodstuff made with maqui.



3. INTRODUCCIÓN

3.1. Aspectos generales

El maqui (*Aristotelia chilensis*) es un pequeño árbol nativo de América del Sur, concretamente originario del centro y sur de Chile, así como del suroeste de Argentina, cuyo fruto contiene una de las mayores concentraciones de antioxidantes del mundo, superando con creces la de otras especies frutales altamente reconocidas. Es una planta que pertenece a la familia *Elaeocarpaceae* y puede alcanzar unos 3-5 metros de altura, con tallos rojizos y hojas perennes, dentadas, opuestas y dispuestas en forma de cruz. En diciembre y enero produce pequeñas bayas comestibles de color púrpura / negro, de unos 6 mm de diámetro, que contienen de una a ocho semillas angulares (Figura 1). Prefiere suelos ligeramente ácidos, moderadamente fértiles, bien drenados y con una humedad adecuada. Coloniza ambientes variados, como por ejemplo, suelos quemados o sobreexplotados, protegiéndolos de la erosión, por lo que tiene gran capacidad de regeneración de los bosques, formando poblaciones silvestres llamadas ‘macales’¹.



Figura 1: Imagen del maqui (*Aristotelia chilensis*)

La recolección de esta fruta se atribuye a los indígenas mapuches de América del Sur, que la han consumido y empleado como remedio natural durante miles de años. Actualmente, la fruta del maqui es muy apreciada por sus características de sabor y aroma, además de por las innumerables propiedades beneficiosas que se le atribuyen. Hoy día se sabe que estas excelentes propiedades son debidas a que se trata de una fuente extremadamente rica en compuestos de interés biológico, entre los que destacan los compuestos fenólicos en general y las antocianinas en particular, responsables de su intenso color negro y de su potencial antioxidante. Además, tiene mayor contenido polifenólico total y actividad antioxidante que otras frutas ricas en polifenoles² como moras³, açai⁴, zarzamoras, fresa, frambuesa⁵, arándanos⁶ o jaborcaba⁷ como se observa en la Figura 2. Debido a esta composición, no es de extrañar que recientemente se le haya reconocido como una “superfruta”⁸.

No obstante, pese a que la capacidad antioxidante del maqui es muy superior a la de otros frutos, aún no se encuentra de forma masificada en las plantaciones, siendo las formas de consumo que prevalecen a nivel internacional los extractos o suplementos de maqui, y no su fruta fresca.

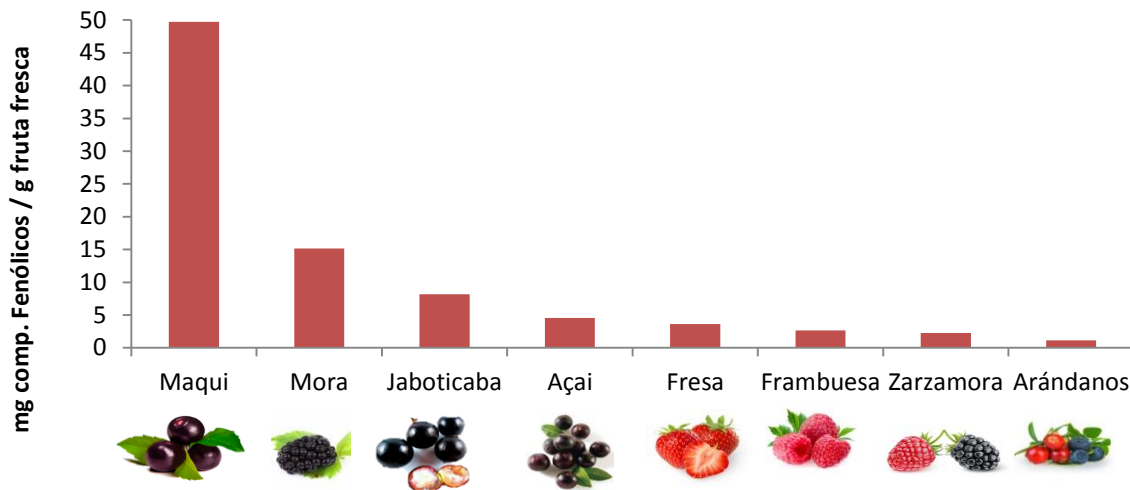


Figura 2: Concentración de compuestos fenólicos totales de diferentes frutos

3.2. Aplicaciones

Las amplias actividades biológicas de estas bayas, como la prevención de la enfermedad de Alzheimer, de enfermedades cardiovasculares y de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, propiedades antiinflamatorias, anticarcinógenas y antidiabéticas, y el control de la obesidad, se deben a su rica fuente de compuestos bioactivos como ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, flavonoides y principalmente antocianinas. Pero no solo el fruto tiene efectos beneficiosos para la salud, también las hojas han sido utilizadas con fines medicinales, como antidiarreicos, antiinflamatorios y antihemorrágicos. En la medicina herbaria tradicional, las infusiones de bayas y hojas de maqui se utilizaron durante mucho tiempo para tratar dolores de garganta, de riñón, dolencias digestivas, úlceras, fiebres y heridas con cicatrices. Por todo ello, el consumo de esta fruta tanto en fresco como en formas procesadas tales como jugos, concentrados de zumos, licores, píldoras, bebidas, mermeladas y jaleas, es altamente recomendable⁹.

3.3. Sustancias antioxidantes

Son sustancias que se caracterizan por su capacidad de retardar o prevenir la oxidación de otras células. La oxidación puede definirse como una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia que cede esos electrones, conocida como agente reductor, a otra, que los asimila, llamada agente oxidante, provocando radicales libres. Estos radicales libres son especies químicas caracterizadas por tener uno o más electrones desapareados, lo que les lleva a unirse a otras moléculas para conseguir ese electrón y provocar así su estabilidad. Esto, a menudo, da lugar a una reacción en cadena dentro de las células, pudiendo llegar a producir alteraciones genéticas en las mismas, contribuyendo a aumentar el riesgo de cáncer debido al llamado estrés celular.



Aquí es donde entran en juego las sustancias antioxidantes, capaces de eliminar esos radicales libres e inhibir las reacciones en cadena, mediante su oxidación, como los compuestos fenólicos y las antocianinas, característicos de muchos frutos de color morado¹⁰. Por este motivo, en los últimos años, el uso de estas sustancias antioxidantes se ha incrementado en la alimentación y farmacología como medida preventiva de este tipo de enfermedades.

3.3.1. Compuestos fenólicos

Son compuestos orgánicos que contienen un anillo aromático y al menos un grupo fenol en su estructura molecular. En el caso de que posean más de uno, se conocen como polifenoles. Estos compuestos antioxidantes donan un electrón al radical libre y lo convierten en una molécula inocua, evitando el estrés oxidativo, responsable de enfermedades como el cáncer, la esclerosis múltiple o la enfermedad de Parkinson. Se trata de metabolitos secundarios de las plantas, biosintetizados durante el desarrollo natural de la misma, aunque también pueden ser sintetizados en respuesta a diferentes situaciones, tales como el estrés y la radiación UV⁵.

Los polifenoles se encuentran en casi todos los alimentos de origen vegetal, por lo que son habituales en nuestra dieta. Estas sustancias influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos, ya que actúan como colorantes, antioxidantes y proporcionan sabor. La concentración en polifenoles de cualquier alimento es muy variable, ya que depende de muchos factores, tales como la variedad o el grado de maduración del vegetal¹¹.

Los principales compuestos fenólicos que se han identificado en el maqui son: ácido gálico, ácido hexahidroxidifénico, granatina B, punicacorteina C, flavonoles (miricetina, quercetina, kaempferol y sus derivados) y antocianinas^{12,13}.

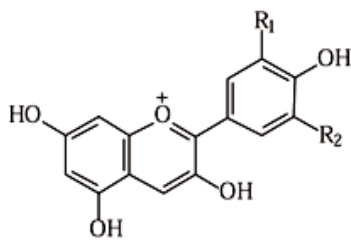
3.3.2. Antocianinas

Son un grupo de compuestos fenólicos, que debido a su importancia, merecen un estudio por separado. Son pigmentos magenta, púrpura o azul solubles en agua que colorean las flores, hojas o frutas de muchas plantas. Pertenecen a la familia de los flavonoides y están constituidas por una molécula de antocianidina, llamada aglicona, unida a un azúcar mediante un enlace glucosídico, como se observa en la Figura 3. Sus máximos de absorción en el rango visible se encuentran entre 515 y 525 nm, aunque también pueden absorber en el UV a un máximo de absorción entre 270 y 280 nm¹⁴. Su tonalidad y estructura dependen del valor de pH y de la presencia de copigmentos, por ejemplo, la pelargonidina tiene tonos naranjas-rojos, la cianidina magentas y la delfinidina morados. Existen cientos de ellas, dependiendo de la metilación de los grupos hidroxilos, la glicosilación y la extensión de la acilación del azúcar¹⁵ (Tabla 1).



El interés por los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas, tales como, efectos antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos, inhibir la oxidación de lipoproteínas o la mejora de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Debido a que permanecen intactas durante su paso desde el tracto digestivo al torrente sanguíneo, su consumo puede tener un impacto directo sobre la salud humana¹⁶.

Las antocianinas que se han identificado en el maqui son: delfinidina 3-*O*-sambubiósido-5-*O*-glucósido, delfinidina 3,5-*O*-diglucósido, cianidina 3-*O*-sambubiósido-5-*O*-glucósido, cianidina 3,5-*O*-diglucósido, delfinidina 3-*O*-sambubiósido, delfinidina 3-*O*-glucósido, cianidina 3-*O*-glucósido y cianidina 3-*O*-sambubiósido^{12,13,17}.



TIPO DE ANTOCIANIDINA	R1	R2
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH

Tabla 1: Radicales para las antocianidinas presentes en el maqui

Figura 3: Estructura general de una antocianidina

3.4. Técnicas de extracción

Debido a que este fruto ha comenzado a comercializarse recientemente, no existen en la bibliografía técnicas de extracción y análisis exhaustivas específicamente desarrolladas para maqui. El desarrollo de estas técnicas se hace imprescindible para el control de calidad tanto en la materia prima como en la elaboración de productos a partir de esta fruta. Además, debido a que el precio de esta baya es bastante superior al de otras, puede derivar en acciones fraudulentas, sustituyendo alimentos que contengan maqui en su composición por otras bayas similares de menor precio. La existencia de técnicas de extracción y análisis para esta fruta podría permitir la detección de estos posibles fraudes.

La extracción es una técnica de separación que se basa en la transferencia selectiva de la especie de interés, separándola del resto de componentes, desde una mezcla sólida o líquida, hacia una fase líquida, aprovechando las diferencias de solubilidad de los componentes de dicha mezcla en un disolvente adecuado. Las técnicas de extracción se suelen clasificar según el estado de agregación de ambas matrices¹⁸. En nuestro caso, se trata de una extracción sólido-líquido, ya que se desean extraer los compuestos de interés biológico de una fruta y llevarlos a una matriz líquida, por lo que en primer lugar se produce un contacto del disolvente con el sólido que cede los componentes de interés, seguido de una separación de dicho disolvente del sólido.



Como paso previo a la extracción, es necesario un proceso de liofilización y trituración de la muestra, con el fin de conseguir una correcta homogeneización y elevar la superficie de contacto con el disolvente, mejorando así el rendimiento y el tiempo de la extracción. El método utilizado, el tipo y volumen de disolvente y su pH o la temperatura, son algunos de los factores que van a influir durante el proceso de extracción.

Existe una gran cantidad de técnicas de extracción, desde extracciones convencionales como la extracción Soxhlet o la maceración, hasta otras más novedosas como la extracción con fluidos supercríticos (SFE)¹⁹, la extracción con fluidos presurizados (PLE), la extracción asistida por microondas (MAE) o la extracción asistida por ultrasonidos (UAE)²⁰. A continuación, se detallarán las técnicas empleadas en este trabajo.

3.4.1. Extracción asistida por microondas (MAE)

Las radiaciones microondas son ondas electromagnéticas (EM) no ionizantes de alta frecuencia, situadas en el rango de radiofrecuencia e infrarrojo (entre 300 MHz y 300 GHz). Cada sistema de microondas consiste en tres partes básicas: la fuente de microondas (es un magnetrón, que consiste en un tubo de vacío con un cátodo central de emisión de electrones de potencial altamente negativo, que está rodeado por un ánodo estructurado que forma cavidades, acoplados por los campos de franjas y tienen la frecuencia de resonancia de microondas), la guía de ondas y el aplicador²¹.

La potencia de microondas proporciona un calentamiento localizado en la muestra actuando como una fuerza motriz para la destrucción de la matriz vegetal, de modo que el analito de interés pueda difundirse y disolverse en el disolvente. La transferencia de energía se produce mediante dos mecanismos, por medio de la inversión de dipolos y por el desplazamiento de iones cargados²². Una de las principales diferencias respecto a otras técnicas es que en lugar de realizar un calentamiento convencional, el microondas es una técnica “fría”, es decir, el calentamiento aparece en el núcleo del objeto y se extiende desde el interior del cuerpo.

En los últimos años, ha adquirido un gran desarrollo gracias a la reducción del tiempo de extracción y de la cantidad de disolventes empleados, al grado de automatización que permite y a su alto rendimiento²³. Además, ha sido empleada para extraer sustancias antioxidantes en una gran cantidad de matrices, tales como moras²⁴, uvas²⁵, tomates²⁶ o mirto²⁷.

3.4.2. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)

Los ultrasonidos son ondas de presión de una frecuencia muy elevada, que se transmiten por el material con el que están en contacto, provocando su contracción y posterior expansión, y en consecuencia, la transmisión de la energía por el material. Las señales de ultrasonido producen



cambios físicos y químicos en el medio a través de la generación y subsiguiente colapso de burbujas mediante el fenómeno de la cavitación, las cuales aparecen, crecen y colapsan dentro del líquido, rompiendo las paredes celulares de la matriz vegetal, favoreciendo así la penetración del disolvente y la liberación de los analitos²⁸. Se requiere de un medio líquido, un generador de energía y un transductor, el cual convierte la energía eléctrica, magnética o cinética en energía acústica. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, y como resultado, el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al disolvente. Una de las ventajas que presenta es la posibilidad de realizar evaluaciones no invasivas ni destructivas²⁹.

Una de las características que hace que este sea uno de los métodos elegidos por excelencia es que consigue altas eficiencias y rendimientos de extracción, con un mínimo consumo de disolvente y en tiempos inferiores a muchas otras técnicas de extracción. Todo esto se consigue gracias a que la superficie de contacto entre la fase sólida y líquida es mucho mayor, lo que a menudo se ve traducido en un menor coste, una disminución del tiempo requerido y una mejor conservación del medio ambiente. Al igual que la extracción asistida por microondas, es una técnica ampliamente extendida, que se ha usado recientemente para la extracción de compuestos de interés en manzanas³⁰, uvas³¹, moras³² o pimientos³³.

3.5. Técnicas de cuantificación de compuestos fenólicos

Una vez extraídos todos los compuestos fenólicos presentes en la matriz vegetal, se procede a su cuantificación mediante la espectroscopia de absorción UV-Vis.

3.5.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis

La espectroscopía UV-Vis es una técnica espectroscópica que utiliza la radiación electromagnética de las regiones visible, ultravioleta cercana e infrarroja cercana del espectro electromagnético, es decir, una longitud de onda entre 380 y 780 nm. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas, y relacionadas con la concentración del compuesto de interés presente en la muestra.

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos normalmente se lleva a cabo el procedimiento de “Folin-Ciocalteu”, que permite relacionar la concentración de compuestos fenólicos presentes en el extracto con la coloración azul del complejo formado al reaccionar éstos con el reactivo de Folin-Ciocalteu³⁴. La concentración de fenólicos totales se obtiene al realizar previamente una recta de calibrado utilizando generalmente ácido gálico como patrón. Este procedimiento se ha utilizado previamente en otras matrices, como arroz³⁵, arándanos³⁶ o açai³⁷.



3.6. Técnicas de separación, cuantificación e identificación de antocianinas

Por su parte, una vez extraídas las antocianinas de los extractos, se debe realizar su separación, cuantificación y posterior identificación. Tras consultar varias fuentes bibliográficas, se ha observado que las técnicas cromatográficas son las más empleadas para separar las distintas antocianinas presentes en una matriz vegetal. Concretamente, en este trabajo se ha utilizado la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)³⁸. A continuación, tras la separación de las distintas antocianinas, se procede a su identificación mediante la cromatografía de ultra-eficacia acoplada a la espectrometría de masas (UHPLC-Q-ToF-MS).

3.6.1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Es un tipo de cromatografía en columna, que permite la separación de los componentes de una muestra entre una fase móvil (el disolvente) y una fase estacionaria (el empaque de la columna), basándose en sus propiedades físicas y/o químicas. El extracto obtenido se encuentra disuelto en la fase móvil y se impulsa a través de la columna, donde se encuentra la fase estacionaria, mediante la aplicación de una presión elevada. Estas transferencias de masa entre ambas fases deben ser rápidas y frecuentes, para que se produzca el equilibrio en el sistema cromatográfico, y por lo tanto, conseguir una alta eficacia de la columna. Además las distancias de difusión en el lecho deben ser pequeñas y la superficie de contacto entre ambas fases, grande³⁹.

Existen diferentes modalidades dependiendo del tipo de fase estacionaria y de la polaridad del disolvente⁴⁰:

- Cromatografía de fase normal: La fase estacionaria es de naturaleza polar (p. ej., sílice o alúmina) y la fase móvil es no polar (p. ej., hexano o acetato de etilo). De esta forma, las muestras polares son retenidas más fuertemente por la columna, permitiendo, en primer lugar, la elución de compuestos no polares.
- Cromatografía de fase reversa: La fase estacionaria es de naturaleza no polar (p. ej., columnas de hidrocarburos) y el disolvente de elución es polar (p. ej., mezclas de agua con acetonitrilo o metanol acidificado). En este caso, los compuestos no polares serán retenidos más tiempo en la columna y saldrán en primer lugar los polares.

A su vez, existen diferentes tipos de columnas cromatográficas. En este caso, se ha utilizado una columna de tipo “Fused-Core”⁴¹, que permite unas separaciones muy rápidas, como consecuencia no solo de su pequeño tamaño de partículas, sino también debido a la presencia de un núcleo sólido recubierto de una envoltura porosa de 0,5 µm. De esta manera, reduce la difusión axial de los solutos y por tanto, minimiza el ensanchamiento de los picos cromatográficos.



Este tipo de columnas permite un ahorro tanto de volumen de muestra como de tiempo, posee una alta sensibilidad y tiene una fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas. Para poder conseguir una buena separación de las señales, es necesario llevar a cabo varios estudios preliminares, variando el gradiente, el porcentaje de cada disolvente, los tiempos..., con el fin de conseguir las condiciones óptimas de trabajo.

La cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa ha sido utilizada en numerosas ocasiones para el análisis de compuestos fenólicos y antocianinas en otras matrices vegetales, tales como: moras⁴², chile habanero⁴¹, arándanos o cerezas⁴³.

3.6.2. Cromatografía líquida de ultra-eficacia (UHPLC)

Esta técnica de separación tiene su base en la cromatografía líquida de alta eficacia pero, como consecuencia de los avances tecnológicos que se han llevado a cabo en este campo, permite la obtención de cromatogramas de mayor resolución y en un tiempo muy inferior. Esto se consigue gracias a la disminución del tamaño de las partículas de la fase estacionaria, con diámetros inferiores a 2 μm . Sin embargo, requiere unas presiones mucho mayores para vencer la resistencia del flujo de disolventes y que la fase móvil fluya a través de la columna⁴⁴.

Al igual que la cromatografía líquida de alta eficacia, esta técnica ha sido muy empleada para separar los compuestos fenólicos y antocianinas en diversas matrices como zumos de frutas⁴⁵, uvas⁴⁶ y moras⁴⁷.

3.6.3. Espectrometría de masas

Es una técnica analítica que permite la determinación de los pesos moleculares de los compuestos analizados, así como su identificación, composición, estructura y naturaleza. Se basa en la separación y detección de los iones formados en una fuente de ionización o en una cámara de colisión a partir de los compuestos a analizar. Estas especies portadoras de carga modifican su velocidad o trayectoria al ser sometidas a un campo electromagnético de distinta manera, según su relación masa/carga. Para llevar a cabo esta técnica, se requiere de una fuente de ionización, elegida en función de la muestra a analizar y la aplicación que se va a realizar, un analizador de masas, encargado de la separación de los iones que salen de la fuente de ionización y un detector⁴⁸.

Esta técnica a menudo se emplea acoplada a métodos de separación tales como la cromatografía en fase líquida y gaseosa. Se considera como un detector universal, de gran utilidad debido a su elevada especificidad y sensibilidad, capaz de proporcionar información sobre la masa molecular de distintos compuestos, así como de sus características estructurales; no obstante, se debe tener en cuenta que es una técnica destructiva⁴⁹. La espectrometría de masas ha sido empleada en la identificación de compuestos fenólicos y antocianinas en diversas matrices, tales como uvas, vino⁵⁰ o arándanos⁵¹.



4. OBJETIVOS

El maqui (*Aristotelia chilensis*) es un pequeño árbol, cuyo fruto contiene una de las mayores concentraciones de antioxidantes del mundo, superando con creces la de otras especies conocidas. Por este motivo, posee muchas propiedades beneficiosas para la salud, como pueden ser sus características antiinflamatorias, anticarcinógenas y antidiabéticas. Debido a esta composición, no es de extrañar que actualmente sea reconocida como una “superfruta”.

Debido a que dicho fruto ha comenzado a comercializarse recientemente, no existen en la bibliografía técnicas de extracción y análisis exhaustivas específicamente desarrolladas para el maqui. Por ello, en este trabajo, se investigan las mejores condiciones para extraer y analizar los compuestos de interés biológicos del maqui, con el objetivo principal de realzar sus propiedades beneficiosas, y el control de calidad de productos elaborados a partir del mismo para evitar posibles acciones fraudulentas. Los objetivos desglosados del presente trabajo son los siguientes:

- Desarrollo y optimización de un método cromatográfico para la separación e identificación de las distintas antocianinas presentes en el maqui mediante la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) usando columnas de tipo “Fused-Core”.
- Desarrollo y optimización de un método de extracción de antocianinas y otro de compuestos fenólicos totales en maqui, empleando la extracción asistida por microondas, y teniendo en cuenta varios parámetros como son: el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, la temperatura, el pH, la relación “masa de muestra / volumen de disolvente” y el tiempo.
- Desarrollo y optimización de un método de extracción de antocianinas y otro de compuestos fenólicos totales en maqui, empleando la extracción asistida por ultrasonidos, y teniendo en cuenta varios parámetros como son: el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, la temperatura, el pH, la relación “masa de muestra / volumen de disolvente”, el ciclo, la amplitud y el tiempo.
- Estudio estadístico de la repetibilidad y precisión intermedia de los métodos desarrollados.
- Comparación de los distintos métodos desarrollados, remarcando las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos a la hora de la extracción tanto de compuestos fenólicos totales como de antocianinas.
- Estudio de la aplicabilidad de los métodos desarrollados en distintas muestras comerciales que contengan maqui.



5. RESULTADOS

5.1. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.1. Material biológico empleado

Para el desarrollo de los métodos de extracción se ha empleado maqui liofilizado, comercializado en polvo, proveniente de la agricultura ecológica (SuperAlimentos, Mundo Arcoíris, Besalú, Gerona, España) (Figura 4). El hecho de que la muestra se encuentre en polvo es de gran importancia, ya que aumenta la superficie de contacto entre el fruto y el disolvente, aumentando así el rendimiento del proceso de extracción. La liofilización de la muestra consiste en congelar el fruto a una temperatura baja, seguido de una etapa de alto vacío en la que se elimina ese hielo por sublimación. Así se consigue eliminar toda el agua presente en el fruto para una mejor conservación y extracción.



Figura 4: Liofilizado de maqui

Una vez desarrollados y optimizados los distintos métodos de extracción, se han empleado distintas muestras reales, recogidas en la Tabla 2, para el análisis y cuantificación de sus compuestos de interés biológico. Estas han sido conservadas en una cámara frigorífica a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su posterior análisis.

MUESTRAS ANALIZADAS	PREPARACIÓN
Cápsulas de baya de maqui “BIOVEA”	Apertura de cada una de las cápsulas para utilizar el polvo que hay en su interior
Cápsulas maqui RX Polifenoles “Ener ZONA”	Apertura de cada una de las cápsulas para utilizar el polvo que hay en su interior
Pastillas maqui “Vitamin Rox”	Trituración de las pastillas con un molinillo eléctrico convencional hasta conseguir un polvo fino
Liofilizado de maqui “Sevenhills”	No necesita ninguna preparación previa
Liofilizado maqui 1 SuperAlimentos Mundo Arcoiris	No necesita ninguna preparación previa
Liofilizado maqui 2 SuperAlimentos Mundo Arcoiris	No necesita ninguna preparación previa
Liofilizado maqui 3 SuperAlimentos Mundo Arcoiris	No necesita ninguna preparación previa

Tabla 2: Muestras comerciales de maqui

5.1.2. Disolventes y reactivos

Los disolventes empleados para las extracciones han sido mezclas de metanol y agua. El metanol empleado (Fischer Scientific, Loughborough, Reino Unido) era de grado HPLC. EL agua que se utilizó era de calidad Milli-Q, obtenida mediante un sistema de purificación de agua Millipore (Bedford, Massachusetts, Estados Unidos). Hay que tener en cuenta que estos disolventes debían tener unos valores de pH específicos, por lo que para ajustarlos se utilizaron disoluciones preparadas de concentración 1 M de ácido clorhídrico (Panreac, Barcelona, España) y de hidróxido sódico (Panreac, Barcelona, España), ambos de grado “para análisis”, con la ayuda de un pH-metro (Crison, GLP 22, Barcelona, España).



Para las separaciones cromatográficas, los disolventes empleados fueron metanol, agua Milli-Q (ambos citados anteriormente) y ácido fórmico (Scharlau, Barcelona, España), de grado HPLC.

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales se empleó agua destilada, reactivo de Folin-Ciocalteu (una mezcla de fosfomolibdato de sodio y fosfotungstato de sodio) (EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Alemania), carbonato de sodio anhidro (Panreac, Barcelona, España) y como patrón ácido gálico (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania). Por último, para la cuantificación de las antocianinas se utilizó como patrón estándar, el cloruro de cianidina (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Missouri, Estados Unidos).

5.1.3. Extracción asistida por microondas (MAE)

5.1.3.1. Equipo de extracción

La extracción asistida por microondas se llevó a cabo con un equipo MARS 6 240/50 (One Touch Technology, CEM Corporation Matthews, Carolina del Norte, Estados Unidos), que se muestra en la Figura 5. El equipo consta de un carrusel, donde se colocan las cámaras para llevar a cabo las extracciones y una pantalla táctil en la parte superior, donde se pueden controlar las condiciones de cada una de las experiencias (potencia, temperatura y tiempo). Además, permite realizar un seguimiento de la extracción gracias a que muestra un gráfico de la potencia o la temperatura frente al tiempo de cada una de las cámaras de extracción. Dispone también de unos imanes recubiertos de teflón que permiten la agitación de las muestras, un sensor que mide la temperatura en cada una de las cámaras de extracción, a medida que el carrusel va girando, y dos magnetones, donde uno de ellos imprime la potencia necesaria y el otro la mantiene.



Figura 5: Equipo utilizado para la extracción asistida por microondas (MAE)

5.1.3.2. Procedimiento de extracción

Las variables a controlar en las distintas experiencias fueron: porcentaje de metanol, pH, temperatura y la relación masa de muestra/volumen de disolvente (ratio). Para ello, se llevó a cabo un programa, que consta de una rampa de 3 minutos para alcanzar la temperatura deseada, luego mantiene esa temperatura durante 5 minutos para que se produzca la extracción de los compuestos y finalmente



unos 25 minutos de enfriamiento para volver a temperatura ambiente. En todos los experimentos, se fijó la potencia a 800 W, ya que era suficiente para alcanzar las temperaturas necesarias en el tiempo mínimo fijado (3 minutos). El procedimiento de extracción realizado fue el siguiente:

→ En primer lugar, se pesan aproximadamente 0,5 gramos de muestra liofilizada (Balanza: Mettler Toledo, AB204-S, Greifensee, Suiza) en una cámara de extracción y se le adiciona el volumen de disolvente adecuado para el experimento en cuestión. Se debe tener en cuenta, que solo se pueden realizar de una misma vez aquellos experimentos que tengan el mismo porcentaje de metanol temperatura y ratio, aunque pueden tener pH diferentes.

→ A continuación, se cierra la cámara con ayuda de una llave de teflón, para evitar posibles fugas de gases como consecuencia de las altas temperaturas empleadas, y se coloca en el carrusel. Es necesario completar un mínimo de 8 cámaras con el mismo volumen y disolvente, con el fin de evitar fluctuaciones de temperatura que pueden conllevar a errores. De esta forma, se mantiene constante la temperatura, y se evita que ésta varíe al pasar por una cámara vacía o con otro disolvente.

→ Una vez preparadas y colocadas las cámaras, bien solo con el disolvente, o con éste y la muestra, se selecciona en la pantalla la temperatura adecuada para el desarrollo del experimento y se inicia el proceso de extracción.

→ Al finalizar la extracción, tras dejar el tiempo necesario para atemperar la muestra, el extracto se centrifuga durante 5 minutos a 7500 rpm y se transvasa el sobrenadante a un matraz aforado de 25 mL. Luego, se le adiciona el disolvente con el que se ha realizado la extracción a los tubos de centrifuga y se vuelve a centrifugar. De nuevo, se transvasa el sobrenadante al matraz y se enrasa con el disolvente con el que se haya hecho la extracción.

→ Finalmente, el extracto se transvasa a un vial y se conservan en una cámara congeladora a -20 °C hasta su posterior análisis.

5.1.4. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)

5.1.4.1. Equipo de extracción

La extracción asistida por ultrasonidos se llevó a cabo con una Sonda UP 200 S (Ultraschallprozessor Dr. Hielscher, GmbH, Berlín, Alemania), que permite el control y modificación del ciclo y la amplitud de cada uno de los experimentos. Esta sonda, está acoplada a un baño termostático (FRIGITERM-10, Selecta, Barcelona, España) donde se fija la temperatura. El sistema se observa en la Figura 6.



Figura 6: Equipo utilizado para la extracción asistida por ultrasonidos

5.1.4.2. Procedimiento de extracción

Las variables a controlar en las distintas experiencias fueron: porcentaje de metanol, pH, temperatura, la relación masa de muestra/volumen de disolvente (ratio), ciclo (tiempo que se aplican las ondas de ultrasonidos por segundo) y amplitud (porcentaje de potencia empleada en relación con la potencia máxima). El procedimiento realizado fue el siguiente:

→ En primer lugar, se pesan 0,5 gramos de muestra liofilizada en un “Falcon” de 50 mL y se le adiciona el volumen de disolvente adecuado en función del experimento.

→ Posteriormente, se coloca el “Falcon” en el interior del vaso de doble pared, que se encuentra a la temperatura deseada y se introduce la sonda de ultrasonidos, evitando el contacto con las paredes y el fondo del mismo. Se programa la amplitud y el ciclo, y se inicia la extracción durante 10 minutos.

→ Una vez realizada la extracción, el contenido del “Falcon” se centrifuga durante 5 minutos a 7500 rpm, y se transvasa el sobrenadante a un matraz aforado de 25 mL. A continuación, se le adiciona el disolvente con el que se ha realizado la extracción a los tubos de centrifuga y se vuelve a centrifugar. De nuevo, se transvasa el sobrenadante al matraz y se enrasa con el disolvente adecuado.

→ Finalmente, el extracto se transvasa a un vial y se conservan en una cámara frigorífica a -20 °C hasta su posterior análisis.

5.1.5. Espectroscopía UV-Vis

5.1.5.1. Equipo UV-Vis

La cuantificación de los compuestos fenólicos totales presentes en el maqui se llevó a cabo con un espectrofotómetro UV-Vis Helios gamma (γ) Unicam (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos) que se muestra en la Figura 7.



Este equipo dispone de una fuente de luz halógena de wolframio y deuterio, con un rango de longitud de onda entre 190 y 1100 nm y una anchura de banda fija de 2 nm. Para las medidas se utilizaron cubetas de cuarzo. A pesar de que se trata de un equipo de un solo haz, posee un carrusel giratorio en el que se pueden introducir hasta 8 cubetas para conseguir una mayor rapidez en la medición.



Figura 7: Espectrofotómetro UV-Vis

5.1.5.2. Procedimiento de Folin-Ciocalteu

Este procedimiento tiene su base en la reactividad que presentan los compuestos fenólicos presentes en la muestra con el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de fosfomolibdato de sodio y fosfotungstato de sodio), formando un complejo de color azul (como puede observarse en la Figura 8), que absorbe a un máximo de longitud de onda de 750 nm. Esta absorbancia es directamente proporcional a la concentración de polifenoles, ambas relacionadas por la ley de Lambert-Beer. El procedimiento a seguir fue el siguiente:

En un matraz aforado de 25 mL se adicionan 250 μ L de muestra, filtradas previamente con un filtro de jeringa de 0,22 μ m (Nylon Syringe Filter, FILTER-LAB, Barcelona, España), 12,5 mL de agua destilada, 1,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 5 mL de carbonato de sodio anhidro al 20%. Todas las adiciones se realizan con la ayuda de micropetas del volumen necesario. Finalmente, se enrasa con agua destilada y se agita para homogeneizar. Los extractos obtenidos se muestran a continuación en la Figura 8:

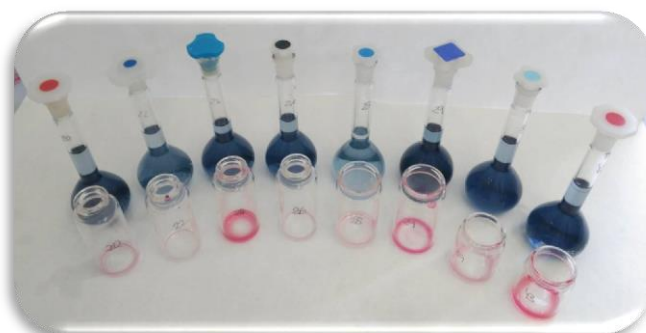


Figura 8: Extractos filtrados y formación del complejo azul al reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu



Debido a la cinética de la reacción (tiempo necesario para que los reactivos reaccionen y se forme el complejo), se hace necesario medir las absorbancias en el espectrofotómetro a 750 nm tras un tiempo de reposo de 30 minutos. Para poder conocer la concentración de compuestos fenólicos totales a partir de sus valores de absorbancias, fue necesario realizar previamente una recta de calibrado en las mismas condiciones y mediante el mismo procedimiento, utilizando ácido gálico como patrón. Para ello, se prepararon patrones de concentración conocida entre 100 y 2000 ppm y se midieron sus valores de absorbancia. La recta de calibrado obtenida se muestra en la Tabla 3:

Recta de calibrado	R ²
$y = 0,0010x + 0,0065$	0,9998

Tabla 3: Recta de calibrado utilizando ácido gálico como patrón

5.1.6. Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a la espectroscopía UV-Vis (HPLC-UV-Vis)

5.1.6.1. Equipo de cromatografía

La separación y cuantificación de las antocianinas presentes en el maqui se llevó a cabo mediante un equipo de cromatografía Elite LaChrom Ultra System (VWR Hitachi, Tokyo, Japón), compuesto por un automuestreador L-2200 U, un horno de columna L-2300 que ha sido ajustado a 50 °C de temperatura, dos bombas L-2160 U y un detector UV-Vis L-2420 U.

El equipo de cromatografía HPLC utilizado, que se muestra en la Figura 9, fue un híbrido entre un HPLC y un UHPLC, que puede alcanzar hasta 9000 psi de presión. El volumen de inyección empleado fue de 15 µL. El detector se ajustó a 520 nm, ya que se corresponde con el máximo de absorción de las antocianinas.



Figura 9: Equipo de cromatografía HPLC

La columna utilizada para el análisis de antocianinas fue una C-18, en fase reversa (Phenomenex Kinetex, CoreShell Technology, Estados Unidos), de tipo “Fused-Core”, con unas dimensiones de 100 x 2,1 mm, un tamaño de partículas de 2,6 µm y un tamaño de poro de 100 Å.



En este tipo de partículas solo hay una vía de difusión de $0,5\ \mu\text{m}$, en comparación con la trayectoria de difusión de aproximadamente $1,5\ \mu\text{m}$ de una partícula totalmente porosa, tal y como se puede observar en la Figura 10. Debido a la trayectoria de difusión más corta, las ventajas de su rendimiento se hacen más evidentes al separar moléculas de soluto mayores y operar a velocidades de flujo de fases móviles más rápidas.

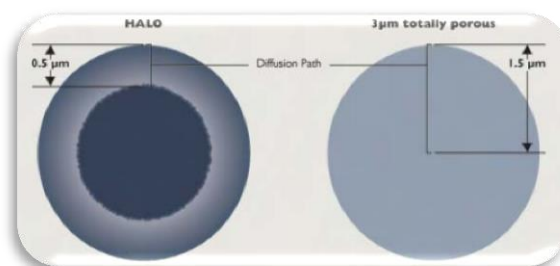


Figura 10: Tipos de partículas de las columnas cromatográficas

5.1.6.2. Procedimiento de separación

En primer lugar, se prepararon los dos disolventes a utilizar: el disolvente A, agua Milli-Q acidificada al 5% con ácido fórmico; y el disolvente B, metanol puro. Ambos disolventes fueron filtrados con ayuda de un filtro de $0,22\ \mu\text{m}$ (Nylon Membrane Filter, FILTER-LAB, Barcelona, España) y desgasificados en un baño de ultrasonidos (Elma S300 Elmasonic, Alemania). También se filtraron cada uno de los extractos con un filtro de jeringa de $0,22\ \mu\text{m}$ (Nylon Syringe Filter, FILTER-LAB, Barcelona, España).

Para la separación de las antocianinas, se llevó a cabo el desarrollo y optimización de un método cromatográfico mediante el equipo HPLC – UV – Vis, con el fin de encontrar las condiciones óptimas. El método en gradiente seleccionado tras la optimización se muestra en la Tabla 4:

Tiempo (minutos)	0,0	2,0	3,5	5,5	6,5	7,0	9,3	10,0	12,0
%B	2,0	2,0	15,0	25,0	40,0	100,0	100,0	2,0	2,0

Tabla 4: Gradiente utilizado para la separación cromatográfica de las antocianinas

La cuantificación de las antocianinas presentes en el maqui se realizó a partir de una recta de calibrado, usando como patrón de referencia el cloruro de cianidina, preparando para ello patrones de concentración conocida entre $0,05$ y $30\ \text{ppm}$. Suponiendo que las distintas antocianinas poseen una absorbancia similar y teniendo en cuenta los pesos moleculares de cada una de ellas, se elaboró una recta de calibrado para cada antocianina presente en el maqui. Los datos obtenidos, por orden de elución, se recogen en la Tabla 5, donde se muestra además el coeficiente de regresión lineal (R^2), el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ).



Para el cálculo del límite de detección y cuantificación, se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot S_{\text{Blanco}}}{m} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \cdot S_{\text{Blanco}}}{m} \rightarrow \text{Donde } m \text{ es la pendiente de la recta y } S$$

la desviación estándar del blanco.

Compuesto	Recta de calibrado	R ²	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Cloruro de cianidina	$y = 252.638,09x - 28.465,10$	0,9999	0,179	0,597
Delfinidina 3- <i>O</i> -sambubiósido-5- <i>O</i> -glucósido	$y = 107.412,80x - 28.465,10$	0,9999	0,421	1,403
Delfinidina 3,5- <i>O</i> -diglucósido	$y = 129.918,27x - 28.465,10$	0,9999	0,348	1,161
Cianidina 3- <i>O</i> -sambubiósido-5- <i>O</i> -glucósido	$y = 120.319,83x - 28.465,10$	0,9999	0,360	1,200
Cianidina 3,5- <i>O</i> -diglucósido	$y = 120.319,83x - 28.465,10$	0,9999	0,360	1,200
Delfinidina 3- <i>O</i> -sambubiósido	$y = 136.427,44x - 28.465,10$	0,9999	0,331	1,106
Delfinidina 3- <i>O</i> -glucósido	$y = 175.182,24x - 28.465,10$	0,9999	0,258	0,861
Cianidina 3- <i>O</i> -glucósido	$y = 140.320,67x - 28.465,10$	0,9999	0,249	0,831
Cianidina 3- <i>O</i> -sambubiósido	$y = 181.419,54x - 28.465,10$	0,9999	0,322	1,075

Tabla 5: Rectas de calibrado, coeficientes de regresión lineal, límites de detección y cuantificación de las antocianinas presentes en el maqui

5.1.7. Cromatografía líquida de ultra-eficacia acoplada a la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (UHPLC-Q-ToF-MS)

5.1.7.1. Equipo de separación e identificación

Para la identificación de las antocianinas presentes en el maqui se usó un equipo de cromatografía líquida de ultra eficacia, acoplado a un espectrómetro de masas con cuadrupolo de tiempo de vuelo (Figura 11) (Acquity Ultra Performance LC Class, Waters, Massachusetts, Estados Unidos), compuesto por un automuestreador, un administrador de disolventes cuaternario, un detector PDA, un administrador de disolventes binario y una columna. La separación cromatográfica se realizó con una columna analítica en fase reversa de tipo C18 (Acquity UHPLC BEH C18, Waters), con unas dimensiones de 2,1 mm x 10 mm y un tamaño de partículas de 1,7 μm.



Figura 11: Equipo UHPLC-Q-ToF-MS



5.1.7.2. Procedimiento de identificación

Para la identificación de las antocianinas se empleó agua Milli-Q acidificada con ácido fórmico al 2% como disolvente A y metanol puro como disolvente B, ambos desgasificados y filtrados. Ambos constituyen la fase móvil, con un flujo de disolvente de 0,4 mL/min. El gradiente de elución empleado fue el siguiente: 0 min, 15% de B; 3,30 min, 20% de B; 3,86 min, 30% de B; 5,05 min, 40% de B; 5,35 min, 55% de B; 5,64 min, 60% de B, 5,94 min, 95% de B; 7,50 min, 95% B. El tiempo total de ejecución fue de 12 min, incluyendo 4 min para el reequilibrio.

La determinación de los analitos se llevó a cabo utilizando una fuente de electrospray operando en modo de ionización positiva en las siguientes condiciones: flujo de gas de desolvatación = 700 L/h, temperatura de desolvatación = 500 °C, flujo de gas del cono = 10 L/h, temperatura de la fuente = 150 °C, voltaje capilar = 700 V, voltaje del cono = 20 V y energía de colisión de la trampa = 4 eV. Los datos fueron recogidos en modo de barrido completo en ($m/z = 100-1200$).

Los iones moleculares $[M]^+$ para las antocianinas identificadas en el maqui presentaron las siguientes relaciones m/z : delphinidina 3-*O*-sambubiósido-5-*O*-glucósido, 759; delphinidina 3,5-*O*-diglucósido, 627; cianidina 3-*O*-sambubiósido-5-*O*-glucósido, 743; cianidina 3,5-*O*-diglucósido, 611; delphinidina 3-*O*-sambubiósido, 597; delphinidina 3-*O*-glucósido, 465; cianidina 3-*O*-glucósido, 449 y cianidina 3-*O*-sambubiósido, 581. En el Apéndice III se muestra el cromatograma de las antocianinas presentes en el maqui y los espectros de masas característicos de cada una de ellas.

5.1.8. Diseño de experimentos Box-Behnken (BBD)

Una vez obtenidos todos los extractos, era necesario ver cuáles son las condiciones óptimas del procedimiento de extracción, así como la relevancia de cada uno de los factores considerados y las relaciones entre los mismos. Para ello, se empleó un diseño de experimentos de tipo Box-Behnken (BBD), usando el programa informático STATGRAPHIC Centurion XVII (Warrenton, Virginia). BBD es un tipo de diseño factorial de superficie de respuesta, que permite la reducción del número de experimentos necesarios en comparación con otros diseños estadísticos, asegurando al mismo tiempo la máxima información posible sobre la respuesta del sistema, además de un ajuste con modelos cuadráticos⁵².

Durante el procedimiento de optimización, se pueden distinguir dos tipos de variables: las variables independientes o factores (en nuestro caso, fueron 4 para MAE y 6 para UAE) y las variables dependientes o respuesta (concentración de compuestos fenólicos y antocianinas totales). Cada variable independiente puede tomar tres posibles valores, codificados como -1, 0 y 1, en función de si se trata del valor mínimo, medio o máximo, respectivamente. Con esta codificación, el diseño indica la realización de 27 experimentos para MAE y 54 para UAE, como se puede observar en las tablas 20 y 21 del Apéndice I.



Los BBD tienen una estructura de diseño esférica, es decir, todos los puntos límites están a la distancia de la raíz cuadrada de 2 desde el centro del diseño, por tanto, evita la realización de experimentos en condiciones extremas⁵³. La representación gráfica de un diseño experimental de Box-Behnken (para tres factores) consiste en un cubo con un punto central y puntos en el centro de las aristas que lo forman, donde los ejes representan cada factor y sus vértices el valor máximo y mínimo de los mismos. Este caso, implica la realización de 13 experimentos, como se observa en la Figura 12.

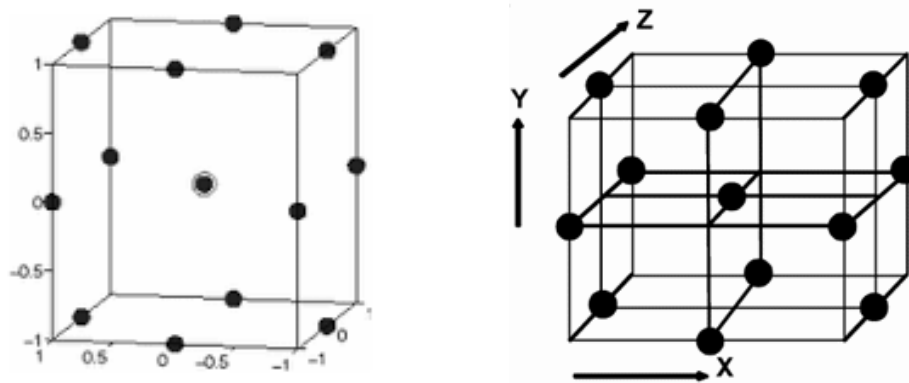


Figura 12: Representación gráfica del diseño de experimentos Box-Behnken para tres factores

Los resultados obtenidos se tratan mediante la metodología de superficie de respuesta, la cual genera un modelo matemático que se ajusta a las respuestas experimentales obtenidas en cada una de las ecuaciones (Ecuación 1), donde se puede observar la respuesta de nuestro sistema en función de los factores implicados y las interacciones existentes entre los mismos.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot x_i + \beta_{ii} \cdot x_i^2 + \sum_i \sum_{i=1}^k \beta_{ij} \cdot x_i x_j + r$$

Ecuación 1: Polinomio general de segundo orden del diseño de Box-Behnken

En la ecuación de ajuste, y es la respuesta, β_i es el coeficiente para cada efecto principal, β_{ij} el coeficiente correspondiente a las interacciones i, j , β_{ii} el coeficiente de los factores cuadráticos que representan la curvatura de la superficie, x representa cada factor y r es el valor residual.



5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1. Desarrollo y optimización del método cromatográfico

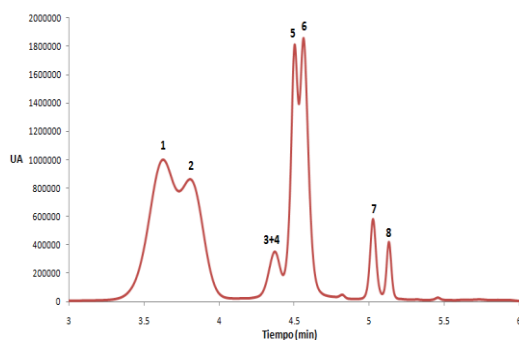
Antes de realizar la cuantificación de las antocianinas totales presentes en el maqui, se hace necesario disponer de un método cromatográfico adecuado, capaz de proporcionar un cromatograma de alta resolución, en el que se puedan separar los picos cromatográficos de cada una de las antocianinas.

Para ello, en primer lugar, se analizó en el equipo de HPLC mencionado anteriormente y utilizando una columna de tipo “Fused-Core” de 5 cm (Phenomenex Kinetex, CoreShell Technology, Estados Unidos), una muestra diluida al 12,5% de metanol, con distintos métodos cromatográficos empleados para la separación de antocianinas presentes en otras bayas. Con ninguno de los métodos estudiados se consiguió una separación completa de cada una de las antocianinas presentes en el maqui. En los mejores cromatogramas obtenidos, solo se pudieron observar 5 picos cromatográficos, por lo que había solapamientos y además las señales obtenidas eran muy anchas, como puede observarse en la Figura 34 del Apéndice II. Por tanto, tras estos estudios previos, se decidió realizar la optimización del método cromatográfico.

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los gradientes, con los que se conseguía la separación de las señales correspondientes a cada una de las antocianinas presentes en el maqui^{12,17}, pero tras aplicarlos a nuestro equipo no se consiguió una completa separación, aunque hay que destacar que se obtuvo una gran mejora, como se puede observar en la Figura 35 del Apéndice II.

Como solución, en lugar de utilizar una columna de 5 cm (empleada para la separación de las antocianinas presentes en todas las matrices anteriores), se utilizó una de 10 cm, de manera que dispondría de un mayor número de platos, consiguiéndose en este caso mejorar la resolución, como se observa en la Figura 36 del Apéndice II.

Finalmente, tras una serie de modificaciones adicionales de los gradientes anteriores, se consiguió obtener un cromatograma, como el que se observa en la Figura 13, en el que se pudieron observar los 7 picos cromatográficos característicos de las antocianinas presentes en el maqui, aunque seguían estando algo solapadas.



1. Delfinidina 3-*O*-sambubiósido-5-*O*-glucósido
2. Delfinidina 3,5-*O*-diglucósido
3. Cianidina 3-*O*-sambubiósido-5-*O*-glucósido
4. Cianidina 3,5-*O*-diglucósido
5. Delfinidina 3-*O*-sambubiósido
6. Delfinidina 3-*O*-glucósido
7. Cianidina 3-*O*-glucósido
8. Cianindina 3-*O*-sambubiósido

Figura 13: Cromatograma de las 8 antocianinas presentes en el maqui



Uno de los principales problemas es que las antocianinas presentes en el maqui son muy polares, es decir, tienen una gran cantidad de grupos glicosilados, lo que hace que sean eluidas todas al principio del cromatograma, provocando por tanto el solapamiento de dichos picos cromatográficos.

Adicionalmente, se realizaron otros estudios variando algunas de las variables del equipo. Estas otras alternativas que se probaron fueron:

→ Disminuir el porcentaje del disolvente B, manteniéndolo bajo (0-5%) durante un mayor tiempo al inicio del método. De esta forma, no se consiguió tampoco ninguna mejora.

→ Modificar el flujo de disolvente, lo que provoca una variación de la presión. Cuanto menos tiempo dentro de la columna, más estrechas serán las señales, y por tanto, mayor resolución (\uparrow presión, \uparrow velocidad lineal, \downarrow difusión, \uparrow resolución). Con un flujo de disolvente de 0,6 mL/min se consiguió una ligera mejora, pero era prácticamente insignificante; con valores mayores, 0,8 mL/min, se obtenían incluso peores resultados. Por tanto, el flujo de disolvente utilizado fue de 0,7 mL/min.

Como posibles estudios futuros, de gran interés para conseguir una completa separación de las distintas antocianinas presentes en el maqui, se puede llevar a cabo:

→ La utilización de una columna C8, de manera que las cadenas carbonadas sean más pequeñas, donde el relleno es algo más polar y permite una mayor interacción y retención de los compuestos, haciendo que éstos salgan algo más separados al principio.

→ La utilización de columnas de mayor longitud ^{9,12}), de manera que tiene un mayor número de platos, las antocianinas permanecen más tiempo en su interior, consiguiéndose así una mayor resolución.

5.2.2. Extracción asistida por microondas (MAE)

5.2.2.1. Optimización mediante diseño de experimentos

En primer lugar, se estudió la extracción asistida por microondas para los compuestos fenólicos y antocianinas presentes en el maqui. Para la obtención de las condiciones óptimas de extracción, se realizó un diseño de tipo Box-Behnken, con cuatro variables (porcentaje de metanol, pH, temperatura y ratio) y dos respuestas (concentración de compuestos fenólicos y antocianinas totales). Los rangos utilizados para cada una de las variables se muestran en la Tabla 6:

FACTOR	VALORES	
	Compuestos fenólicos	Antocianinas
%MeOH	25 – 50 – 75	
pH	2 – 4,5 – 7	
Temperatura (°C)	50 – 75 – 100	
Ratio (mL)	10 – 15 – 20	

Tabla 6: Rango de las variables para las experiencias del diseño en MAE



Como se observa en la Tabla 20 del Apéndice I, para la optimización de las 4 variables se deben realizar 27 experimentos, que se efectuaron por duplicado. En todos ellos, la cantidad de muestra pesada fue de 0,5 gramos y se fijó como tiempo de extracción 5 minutos.

5.2.2.2. Condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos totales

Tras la realización de los 27 experimentos por duplicado, se obtuvieron 54 extractos, los cuales se analizaron mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu para la obtención de la cantidad de compuestos fenólicos totales. Para su estudio se empleó el programa estadístico Statgraphic Centurión (Versión XVII), permitiendo así obtener las condiciones óptimas de extracción, así como los parámetros más influyentes. Los datos obtenidos del diseño se recogen en el Apéndice I.

En primer lugar, se realizó el análisis de la varianza (ANOVA), con el objetivo de evaluar el efecto de las variables, así como las posibles interacciones entre las mismas. Este análisis proporciona información sobre el modelo matemático que se genera a partir de los datos experimentales. De los resultados obtenidos, se determinó que el análisis explica el 80,76% de la variabilidad total.

Por otro lado, sólo aquellas variables que presentan un p -valor inferior a 0,05, resaltados en la Tabla 7, se consideran que influyen de manera estadísticamente significativa sobre la respuesta a un nivel de confianza del 95%. A su vez, se observó también los coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden para cada uno de los factores.

EFEECTO	COEFICIENTE ESTIMADO	p-VALOR
MeOH	3,8686	0,0233
pH	-4,1363	0,0167
Temperatura	4,8523	0,0068
Ratio	0,0851	0,9553
MeOH-MeOH	-3,7658	0,1175
MeOH-pH	1,2958	0,6243
MeOH-Temperatura	-1,2118	0,6468
MeOH-Ratio	2,7786	0,3023
pH-pH	3,9461	0,1026
pH-Temperatura	-3,5345	0,1955
pH-Ratio	-0,6416	0,8077
Temperatura-Temperatura	7,0605	0,0082
Temperatura-Ratio	1,4574	0,5823
Ratio-Ratio	2,9396	0,2126

Tabla 7: Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden y p -valor



Se puede observar que las variables influyentes son el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, la temperatura, el pH y la interacción cuadrática de la temperatura. Una vez conocida la influencia de los distintos factores, se obtuvo la ecuación polinómica de segundo orden reducida, teniendo en cuenta sólo aquellas variables y/o interacciones entre variables que ofrecen un efecto significativo sobre la respuesta (Ecuación 2). En este caso, como puede observarse, la ecuación polinómica de segundo orden queda definida únicamente por las cuatro variables significativas, dando resultados similares a los obtenidos con la ecuación completa.

$$\text{Cantidad de compuestos fenólicos totales} = 43,8757 + 3,8686 \cdot \text{MeOH} - 4,1363 \cdot \text{pH} + 4,8523 \cdot \text{Temperatura} + 7,0605 \cdot \text{Temperatura}^2$$

Ecuación 2: Ecuación polinómica de segundo orden del diseño de Box-Behnken reducida

- Diagrama de Pareto

Estos resultados se pueden representar de manera más intuitiva, gráficamente, a través del diagrama de Pareto (Figura 14), donde se observa qué variables e interacciones entre variables tienen un efecto significativo sobre la variable respuesta a un nivel de significación del 95%. De esta forma, aquellas cuyos efectos estandarizados superen un valor de 2,17 se consideran como significativas.

A su vez, se observa el signo que presentan cada uno de estos efectos, debido a que las barras aparecen en dos colores diferentes. Los signos positivos indican una relación directa entre la variable objeto de estudio y la variable respuesta, mientras que los signos negativos hacen referencia a una relación inversa entre la variable objeto de estudio y la variable respuesta.

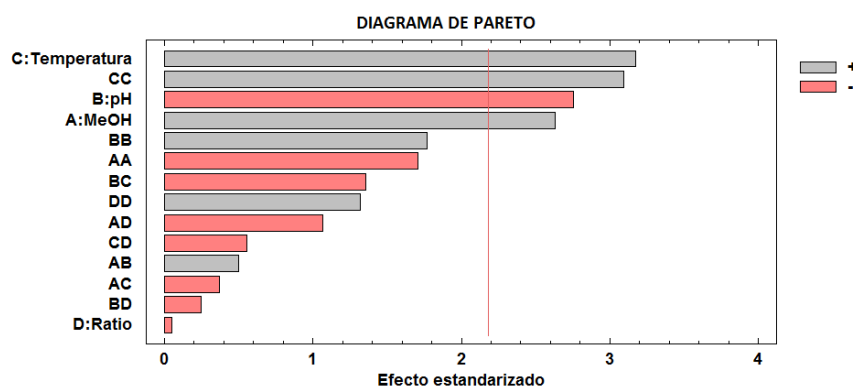


Figura 14: Diagrama de Pareto para compuestos fenólicos totales en MAE

De las cuatro variables analizadas, la que tiene mayor efecto sobre la variable respuesta es la temperatura, aunque muy cerca de ella, se encuentran el pH y el porcentaje de metanol. Mientras que la variable que menor efecto tiene sobre la variable respuesta es el ratio. También se observa que, el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción y la temperatura tuvieron un efecto positivo, mientras que el pH por el contrario, tuvo un efecto negativo.



- Gráfica de efectos principales

Con la gráfica de efectos principales (Figura 15) se puede observar cómo influyen cada uno de los factores estudiados sobre la variable respuesta. Cuanto mayor sea la inclinación de la pendiente al cambiar del valor codificado de -1 a +1, mayor es la influencia de dicho efecto sobre la variable respuesta. Además, en función de si la pendiente es creciente o decreciente, vemos si dicho efecto tiene una influencia positiva o negativa.

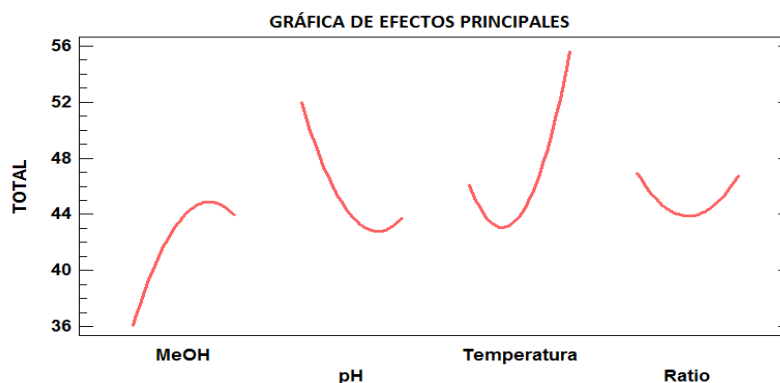


Figura 15: Gráfica de efectos principales para compuestos fenólicos en MAE

Los factores que tienen una mayor influencia sobre la variable respuesta, como ya se ha mencionado, son la temperatura, el pH y el porcentaje de metanol; mientras que el ratio prácticamente no influye.

- En cuanto al porcentaje de metanol, se observa que el óptimo es un valor intermedio del rango de disolventes estudiado, el cual viene determinado por las características de polaridad tanto del disolvente como del conjunto de compuestos fenólicos presentes en el maqui.
- En cuanto a la temperatura, aunque parezca que juegue un papel positivo aumentando la cinética de extracción, se debe tener en cuenta que a elevadas temperaturas, se puede producir la degradación y fragmentación de los compuestos fenólicos. Como consecuencia de dicha fragmentación, se producen otros compuestos fenólicos, que siguen manteniendo grupos hidroxilos en su estructura y por tanto, siguen reaccionando con el reactivo de Folin-Ciocalteu, haciendo que aumente la absorbancia significativamente.
- En función del rango de pH, es decir, del rango de acidez o basicidad, se producen unas reacciones de protonación o desprotonación, lo que provoca un cambio en la carga y en los dobles enlaces conjugados, dando lugar a diferentes estructuras en los compuestos presentes y provocando un cambio de color, incluso en ocasiones formando especies inestables. En un medio ácido, presentan un color rojizo, cuyo máximo de absorbancia se encuentra a una longitud de onda de 520 nm, que es a la que se ha trabajado.



Tras haber realizado el tratamiento estadístico de los datos, se obtuvieron como **condiciones óptimas** para la extracción de los compuestos fenólicos totales en MAE, las que aparecen en la Tabla 8:

Factor	Valores óptimos
%MeOH	65
pH	2
Temperatura (°C)	100
Ratio (mL)	10

Tabla 8: Condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos totales en MAE

Se observa que el óptimo del porcentaje de metanol es un valor intermedio, lo que es lógico debido a la polaridad de los compuestos fenólicos presentes en el maqui. No obstante, también se puede observar que se obtienen valores extremos en tres de los factores analizados. En cuanto a la temperatura, no se consideró aumentar más de 100 °C, ya que, como se ha explicado anteriormente, a temperaturas superiores, los compuestos fenólicos podrían empezar a degradarse y el valor obtenido no correspondería a un valor real de la muestra inicial. En cuanto al pH, tampoco se consideró bajar de 2, ya que se podría producir la hidrólisis ácida de los compuestos fenólicos. Por último, el ratio al no ser una variable influyente en la extracción de este tipo de compuestos, no se optó por disminuir aún más su valor.

5.2.2.2.1. Estudio de la cinética de extracción

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de extracción para compuestos fenólicos totales en MAE, se realizó, empleando dichas condiciones, un ensayo de cinética de extracción con tiempos comprendidos entre 2 y 25 minutos (extracciones por triplicado en cada uno de ellos) para ver cuál era el tiempo óptimo de extracción (Figura 16).

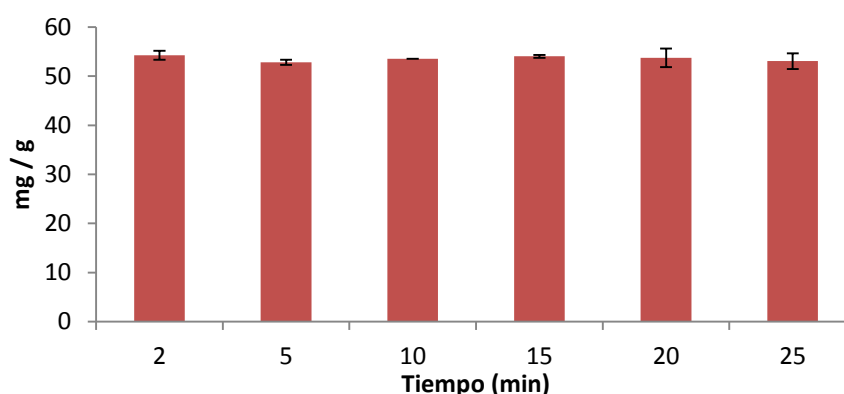


Figura 16: Concentración de compuestos fenólicos frente al tiempo de extracción en MAE

Como se puede observar, se extrae prácticamente la misma cantidad de compuestos fenólicos totales independientemente del tiempo de extracción. Por tanto, se trata de un método bastante rápido, ya que con solo dos minutos de extracción, se pueden extraer la mayor parte de los compuestos fenólicos totales presentes en las muestras de maqui.



5.2.2.2.2. Estudio de la repetibilidad y precisión intermedia

Finalmente, se realizó un ensayo de repetibilidad y precisión intermedia, en las condiciones óptimas obtenidas previamente y a un tiempo de 2 minutos, mostrándose los resultados en la Tabla 9. Para la repetibilidad, se realizaron 12 extracciones en un mismo día y para la precisión intermedia, se llevaron a cabo 12 extracciones por día durante tres días diferentes.

	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Media (mg/g)	54,269	52,983
Desviación estándar (mg/g)	2,122	2,246
Coefficiente de variación (%)	3,91	4,24

Tabla 9: Ensayos de repetibilidad y precisión intermedia para compuestos fenólicos totales en MAE

Como se puede observar, en ambos casos, el coeficiente de variación es menor del 5%. Debido a que el límite máximo para el coeficiente de variación es del 5%, se puede concluir que se trata de un método bastante preciso.

5.2.2.3. Condiciones óptimas para la extracción de antocianinas

Una vez estudiado el comportamiento de los compuestos fenólicos, se analizó el de las antocianinas totales presentes en las muestras de maqui, mediante la cromatografía HPLC, para los mismos 54 extractos obtenidos previamente. El estudio de los resultados obtenidos se realizó haciendo uso del programa estadísticos Statgraphic Centurión (Versión XVII), con el fin de analizar cuáles eran las condiciones óptimas de extracción, así como las variables más influyentes.

A partir de los resultados obtenidos del análisis de la varianza (ANOVA), se observó que el análisis explica el 78,79% de la variabilidad total. A continuación, se recogen en la Tabla 10 los coeficientes estimados, así como el p -valor de cada una de las variables e interacciones entre variables estudiadas.

En el caso de las antocianinas, se obtuvo que los parámetros que influyen de manera estadísticamente significativa a un nivel de confianza del 95% son el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, la temperatura, la interacción cuadrática temperatura-temperatura (al igual que para los compuestos fenólicos) y la interacción cuadrática metanol-metanol, ya que presentan un p -valor por debajo de 0,05.



EFEECTO	COEFICIENTE ESTIMADO	p-VALOR
MeOH	5,2442	0,0021
pH	-0,4752	0,7295
Temperatura	-4,4487	0,0062
Ratio	1,5252	0,2782
MeOH-MeOH	-5,6872	0,0153
MeOH-pH	-0,0697	0,9766
MeOH-Temperatura	0,6203	0,7942
MeOH-Ratio	0,2673	0,9104
pH-pH	1,8722	0,3709
pH-Temperatura	4,6646	0,0680
pH-Ratio	-0,0069	0,9977
Temperatura-Temperatura	-5,2581	0,0228
Temperatura-Ratio	2,4141	0,3197
Ratio-Ratio	-1,4100	0,4972

Tabla 10: Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden y p-valor

Una vez conocida la influencia de los distintos factores, se obtiene la ecuación polinómica de segundo orden reducida, teniendo en cuenta sólo aquellas variables y/o interacciones entre variables que ofrecen un efecto significativo sobre la respuesta (Ecuación 3). En este caso, como puede observarse, la ecuación polinómica de segundo orden queda definida únicamente por las variables porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, temperatura y las interacciones cuadráticas temperatura-temperatura y metanol-metanol, dando resultados similares a los obtenidos con la ecuación completa.

$$\text{Cantidad de antocianinas totales} = 41,2351 + 5,2442 \cdot \text{MeOH} - 4,4487 \cdot \text{Temperatura} - 5,6872 \cdot \text{MeOH}^2 - 5,2581 \cdot \text{Temperatura}^2$$

Ecuación 3: Ecuación polinómica de segundo orden del diseño de Box-Behnken reducida

- Diagrama de Pareto

A continuación, en el diagrama de Pareto, mostrado en la Figura 17, se puede comprobar visualmente las 4 variables que afectan de forma estadísticamente significativa a la variable respuesta. También, se observa claramente que de las cuatro variables analizadas, las que tienen una mayor influencia son la temperatura y el porcentaje de metanol; mientras que el pH y el ratio apenas influyen. En este caso, el porcentaje de metanol tiene un efecto positivo, mientras que a diferencia de los compuestos fenólicos, la temperatura, tiene una influencia negativa.

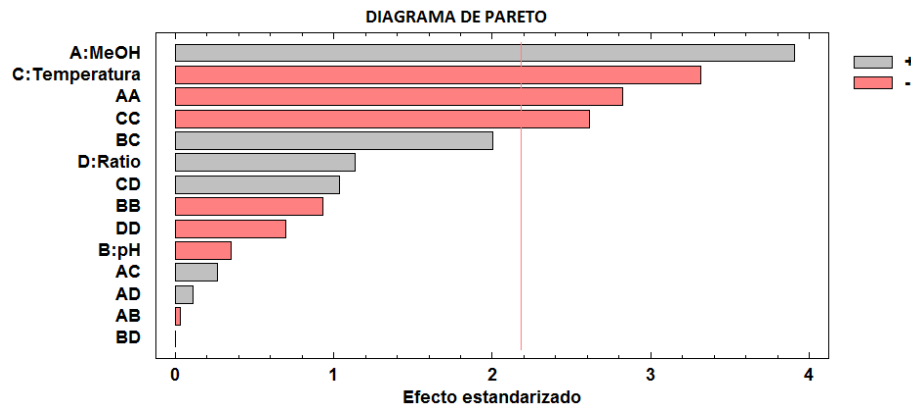


Figura 17: Diagrama de Pareto para antocianinas totales en MAE

- Gráfica de efectos principales

En la Figura 18, se puede ver la gran influencia del porcentaje de metanol y la temperatura sobre la variable respuesta, debido a la inclinación de ambas pendientes.

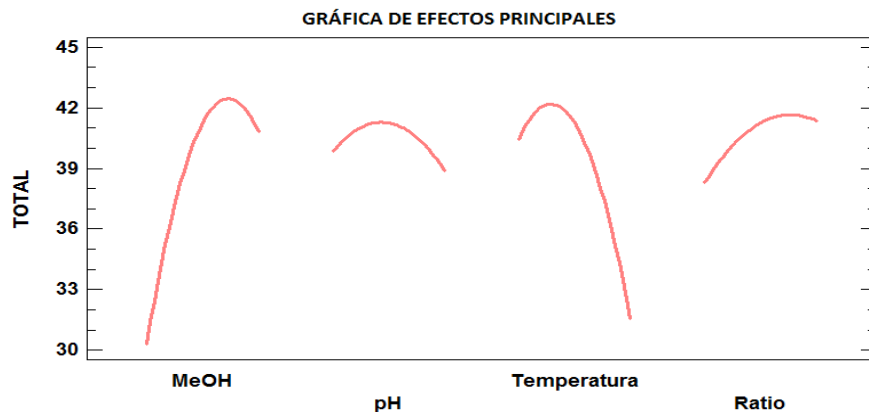


Figura 18: Gráfica de efectos principales para antocianinas totales en MAE

- Se puede comprobar que el comportamiento de las antocianinas con respecto al porcentaje de metanol en el disolvente es muy parecido al que presentaban los compuestos fenólicos y, por tanto, la explicación es la misma que se ha dado anteriormente.
- En cuanto a la temperatura, ocurre lo contrario al comportamiento visto para la extracción de compuestos fenólicos. Esto es debido a que, al aumentar la temperatura, se produce la fragmentación y degradación de las antocianinas, por lo que ya no son detectadas con el equipo de cromatografía HPLC, siendo por tanto la temperatura óptima de extracción la mínima utilizada.



Los valores óptimos obtenidos con el diseño, se presentan en la Tabla 11:

Factor	Valores óptimos
%MeOH	60
pH	2
Temperatura (°C)	50
Ratio (mL)	14

Tabla 11: Condiciones óptimas para la extracción de antocianinas totales en MAE

Al igual que antes, se observa como óptimo de porcentaje de metanol un valor intermedio, aunque de nuevo se puede ver que para el resto de factores dan valores extremos para 2 de las variables. Con respecto a la temperatura no se puede disminuir más de 50 °C, ya que es la mínima temperatura que se puede alcanzar con el equipo utilizado. En cuanto al pH, por debajo de 2 se puede producir la hidrólisis ácida de las antocianinas, de manera que se forma el monómero y se separa el glucósido (azúcar), por lo que tampoco es adecuado trabajar a pH inferiores.

5.2.2.3.1. Estudio de la cinética de extracción

Una vez determinadas las condiciones óptimas de extracción, se evaluó la cinética de extracción, cuyos resultados se observan en la Figura 19. Para ello, se estudiaron nuevamente tiempos entre 2 y 25 minutos de extracción por triplicado:

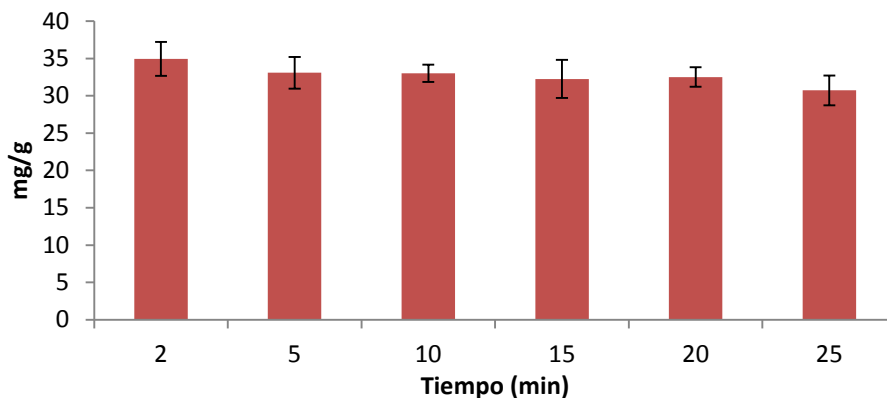


Figura 19: Concentración de antocianinas totales frente al tiempo de extracción en MAE

Al igual que ocurría para los compuestos fenólicos, se observa que el tiempo óptimo de extracción es de solo 2 minutos. Además, a medida que aumenta el tiempo, se puede ver un ligero descenso en la cantidad de antocianinas extraídas. Esto puede ser debido al largo tiempo de exposición a las radiaciones microondas, lo que puede provocar su degradación.

5.2.2.3.2. Estudio de la repetibilidad y precisión intermedia

Para finalizar, seleccionando un tiempo de 2 minutos y empleando las condiciones óptimas mostradas en la Tabla 12, se realizó un ensayo de repetibilidad y precisión intermedia, de igual forma que se ha explicado previamente.



	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Media (mg/g)	34,945	31,798
Desviación estándar (mg/g)	1,265	1,202
Coefficiente de variación (%)	3,62	3,78

Tabla 12: Ensayos de repetibilidad y precisión intermedia para antocianinas totales en MAE

Nuevamente, en ambos ensayos, se han obtenido unos valores de coeficiente de variación por debajo del 5%, que se suele considerar como el límite para afirmar que un método es preciso en este tipo de ensayos.

5.2.3. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)

5.2.3.1. Optimización mediante diseño de experimentos

Una vez estudiada la extracción asistida por microondas, se analizó la extracción asistida por ultrasonidos tanto para los compuestos fenólicos totales como para las antocianinas presentes en las muestras de maqui. Para la obtención de las condiciones óptimas de extracción, se utilizó de nuevo un diseño de tipo Box-Behnken, pero en este caso con seis variables (porcentaje de metanol, temperatura, amplitud, ciclo, pH y ratio) y dos respuestas (concentración de compuestos fenólicos totales y antocianinas totales). Los rangos utilizados de cada una de las variables se muestran en la Tabla 13:

FACTOR	VALORES	
	Compuestos fenólicos	Antocianinas
% MeOH	25 – 50 – 75	
Temperatura (°C)	10 – 40 – 70	
Amplitud (%)	30 – 50 – 70	
Ciclo (s)	0,2 – 0,45 – 0,7	
pH	2 – 4,5 – 7	
Ratio (mL)	10 – 15 – 20	

Tabla 13: Rango de las variables para las experiencias del diseño en UAE

Como se puede ver en la Tabla 21 del Apéndice, para la optimización de los 6 factores se deben realizar 54 experimentos, en los que la cantidad de muestra pesada fue de 0,5 gramos y se fijó inicialmente un tiempo de extracción de 10 minutos. En dicha tabla se recoge además los resultados obtenidos tanto para compuestos fenólicos totales como de antocianinas totales.

5.2.3.2. Condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos totales

Tal y como se ha mencionado anteriormente, para la determinación de la cantidad de compuestos fenólicos totales, se realizó el procedimiento de Folin-Ciocalteu para cada uno de los 54 extractos obtenidos. Para el estudio de los resultados obtenidos se empleó el programa estadístico Statgraphic Centurión (Versión XVII), permitiendo así obtener las condiciones óptimas de extracción, además de los parámetros más influyentes.



A partir de los resultados obtenidos del análisis de la varianza (ANOVA), se observó que el análisis explica el 59,40% de la variabilidad total. A continuación, se recogen en la Tabla 14 los coeficientes estimados, así como el p -valor de cada una de las variables e interacciones entre variables estudiadas.

EFEECTO	COEFICIENTE ESTIMADO	p-VALOR
MeOH	0,7178	0,3954
Temperatura	3,1587	0,0008
Amplitud	0,5940	0,4809
Ciclo	1,3689	0,1114
pH	-1,2553	0,1428
Ratio	0,6910	0,4131
MeOH-MeOH	-1,8393	0,1592
MeOH-Temperatura	0,5636	0,6984
MeOH-Amplitud	-0,9762	0,5035
MeOH-Ciclo	0,4771	0,6431
MeOH-pH	-0,9853	0,4995
MeOH-Ratio	0,4777	0,7425
Temperatura-Temperatura	-0,7897	0,5391
Temperatura-Amplitud	0,2400	0,8688
Temperatura-Ciclo	0,7545	0,6078
Temperatura-pH	-2,2502	0,0360
Temperatura-Ratio	1,3123	0,3701
Amplitud-Amplitud	-0,7049	0,5833
Amplitud-Ciclo	0,4527	0,7555
Amplitud-pH	0,0097	0,9947
Amplitud-Ratio	-0,0380	0,9705
Ciclo-Ciclo	-0,1860	0,8846
Ciclo-pH	0,6338	0,6632
Ciclo-Ratio	0,3502	0,8096
pH-pH	2,0663	0,1155
pH-Ratio	-1,8508	0,2097
Ratio-Ratio	-0,4584	0,7208

Tabla 14: Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden y p -valor

Se puede observar que las variables influyentes, es decir, aquellas con un p -valor inferior a 0,05, para un nivel de significación del 95%, son la temperatura y la interacción cuadrática temperatura-pH.

Una vez conocida la influencia de los distintos factores, se obtiene la ecuación polinómica de segundo orden reducida, teniendo en cuenta sólo aquellas variables y/o interacciones entre variables que ofrecen un efecto significativo sobre la respuesta (Ecuación 4). En este caso, la ecuación polinómica



de segundo orden queda definida únicamente por la variable temperatura y la interacción cuadrática temperatura-pH, dando resultados similares a los obtenidos con la ecuación completa.

Cantidad de compuestos fenólicos totales = $30,1862 + 3,1589 \cdot \text{Temperatura} - 2,2502 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{pH}$

Ecuación 4: Ecuación polinómica de segundo orden del diseño de Box-Behnken reducida

- Diagrama de Pareto

En el diagrama de Pareto mostrado en la Figura 20, se representan las variables más significativas mencionadas anteriormente, a un nivel de confianza del 95%.

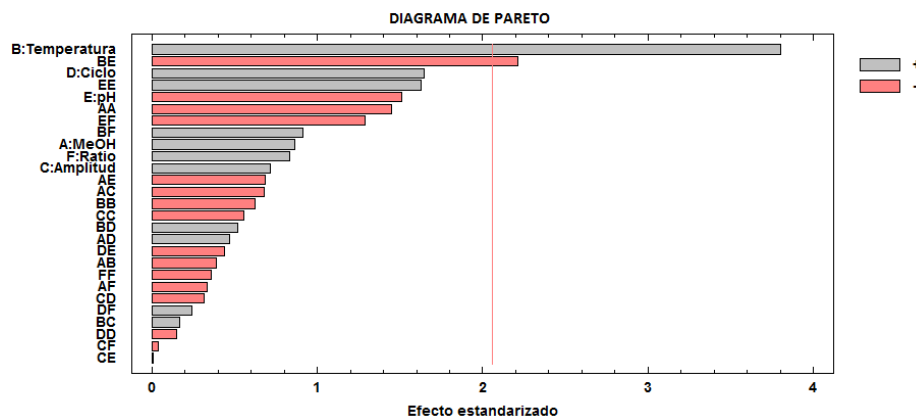


Figura 20: Diagrama de Pareto para compuestos fenólicos totales en UAE

Al igual que en la extracción de compuestos fenólicos totales asistida por microondas, la variable que mayor efecto tiene sobre la variable respuesta es la temperatura, con un efecto positivo, mientras que el resto de variables tienen un efecto similar (en valor absoluto) y menor a este. Por tanto, puede decirse que el resto de variables estudiadas no son muy influyentes para la extracción de compuestos fenólicos mediante ultrasonidos.

- Gráfica de efectos principales

Con esta gráfica, mostrada en la Figura 21, se puede observar cómo influyen cada uno de los factores estudiados sobre la variable respuesta.

Se observa que la temperatura es la que tiene una mayor influencia, como se ha mencionado anteriormente, mientras que el resto de variables no son muy influyentes.

- Al igual que ocurría en la extracción asistida por microondas, la extracción de compuestos fenólicos aumenta significativamente a medida que aumenta la temperatura. Sin embargo, a elevadas temperaturas, se puede producir la degradación y fragmentación de los compuestos fenólicos y como consecuencia, se forman otros compuestos fenólicos de menor tamaño, que siguen manteniendo grupos hidroxilos en su estructura y por tanto, siguen reaccionando con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

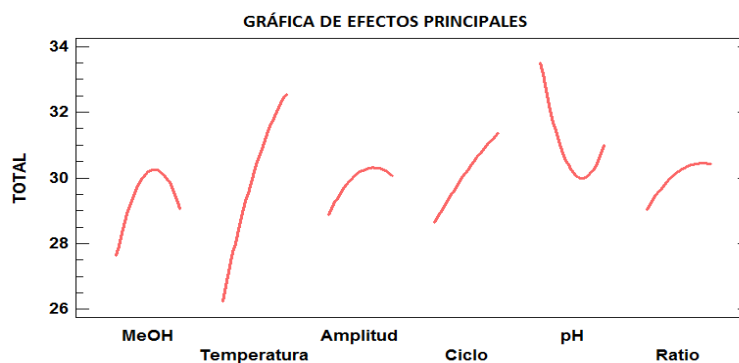


Figura 21: Gráfica de efectos principales para compuestos fenólicos totales en UAE

Tras haber realizado el tratamiento estadístico de los datos, se obtienen las **condiciones óptimas** para la extracción de los compuestos fenólicos totales en UAE, mostradas en la Tabla 15:

Factor	Valores óptimos
%MeOH	58
Temperatura (°C)	70
Amplitud (%)	35
Ciclo (s)	0,7
pH	2
Ratio (mL)	20

Tabla 15: Condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos totales en UAE

Como ocurría en el caso de la extracción asistida por microondas, se obtiene como óptimo de porcentaje de metanol un valor intermedio, lo que resulta lógico debido a que ambos disolventes empleados son polares, al igual que los compuestos fenólicos analizados. Sin embargo, se observa que dan valores extremos (temperatura, ciclo, pH, ratio). No obstante, no se consideró aumentar la temperatura, ya que no es conveniente trabajar a más de 70 °C, debido a que el metanol se evaporaría y tendría lugar un cambio de fase. En cuanto al pH, por debajo de 2 se puede producir la hidrólisis ácida de los compuestos fenólicos.

Por último, destacar que el ratio, el ciclo, el porcentaje de metanol y la amplitud no son variables influyentes a la hora de la extracción de los compuestos fenólicos totales mediante UAE.

5.2.3.2.1. Estudio de la cinética de extracción

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de extracción para compuestos fenólicos totales en UAE, se realizó, empleando dichas condiciones, un ensayo de cinética con tiempos entre 2 y 25 minutos (extracciones por triplicado en todos ellos) para ver cuál sería el tiempo óptimo (Figura 22).

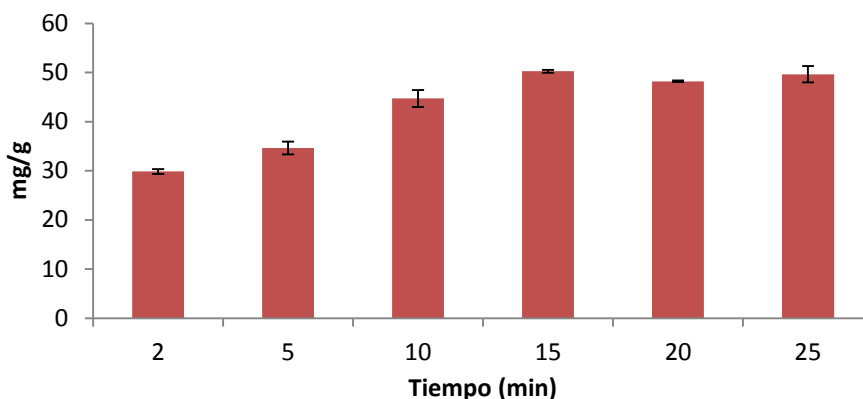


Figura 22: Concentración de compuestos fenólicos frente al tiempo de extracción en UAE

Observando la Figura 22, se obtiene que en el caso de la extracción asistida por ultrasonidos, el tiempo óptimo de extracción de compuestos fenólicos totales es de 15 minutos. Se puede observar que se necesita un mayor tiempo de extracción que para la extracción asistida por microondas.

5.2.3.2.2. Estudio de la repetibilidad y precisión intermedia

Finalmente, se realizó el ensayo de repetibilidad y precisión intermedia, mostrado en la Tabla 16, seleccionando las condiciones óptimas de extracción y un tiempo óptimo de 15 minutos, de la misma forma que se describió para la extracción asistida por microondas.

	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Media (mg/g)	49,135	47,283
Desviación estándar (mg/g)	1,656	1,868
Coefficiente de variación (%)	3,37	3,95

Tabla 16: Ensayos de repetibilidad y precisión intermedia para compuestos fenólicos totales en UAE

Se obtienen unos resultados ciertamente precisos, ya que los valores del coeficiente de variación, no exceden del 5%, que se suele considerar como el límite para afirmar que el método no es preciso en este tipo de ensayos.

5.2.3.3. Condiciones óptimas para la extracción de antocianinas

Visto el comportamiento que han tenido los compuestos fenólicos totales ante la extracción asistida por ultrasonidos, se procedió al estudio de las antocianinas mediante esta técnica. Tomando los mismos 54 extractos obtenidos previamente, se analizaron mediante cromatografía HPLC. El estudio de los resultados obtenidos se realizó haciendo uso del programa estadísticos Statgraphic Centurión (Versión XVII), con el fin de analizar cuáles eran las condiciones óptimas de extracción, así como las variables más influyentes.



A partir de los resultados obtenidos del análisis de la varianza (ANOVA), se observó que el análisis explica el 95,02% de la variabilidad total. A continuación, se recogen en la Tabla 17 los coeficientes estimados, así como el p -valor de cada una de las variables e interacciones entre variables estudiadas.

EFEECTO	COEFICIENTE ESTIMADO	p-VALOR
MeOH	5,6843	0,0000
Temperatura	2,0669	0,0000
Amplitud	0,1623	0,6431
Ciclo	0,6654	0,0657
pH	-1,5222	0,0002
Ratio	1,1638	0,0024
MeOH-MeOH	-4,3520	0,0000
MeOH-Temperatura	1,4602	0,0221
MeOH-Amplitud	-0,4177	0,4923
MeOH-Ciclo	0,0561	0,8958
MeOH-pH	0,0989	0,8703
MeOH-Ratio	0,0183	0,9759
Temperatura-Temperatura	0,2442	0,6482
Temperatura-Amplitud	0,7366	0,2304
Temperatura-Ciclo	-0,8304	0,1780
Temperatura-pH	0,8077	0,0680
Temperatura-Ratio	0,8515	0,1676
Amplitud-Amplitud	0,2084	0,6968
Amplitud-Ciclo	0,7570	0,2181
Amplitud-pH	0,4624	0,4477
Amplitud-Ratio	0,1505	0,7256
Ciclo-Ciclo	-0,6172	0,2539
Ciclo-pH	1,2524	0,0467
Ciclo-Ratio	0,3595	0,5542
pH-pH	1,9996	0,0008
pH-Ratio	-0,8366	0,1749
Ratio-Ratio	-0,2676	0,6172

Tabla 17: Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden y p -valor

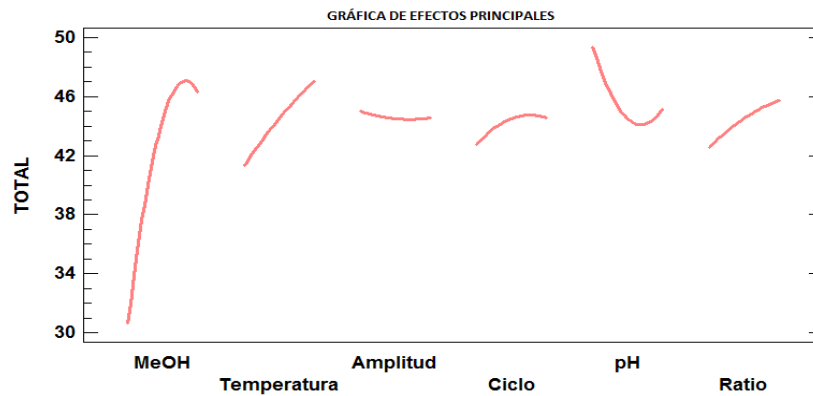


Figura 24: Gráfica de efectos principales para antocianinas en UAE

- En primer lugar, destaca, por encima de todo, la clara tendencia que presenta el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción. A medida que aumenta el porcentaje de metanol, la cantidad de antocianinas que se extraen aumenta enormemente, hasta llegar a un máximo en el cual se alcanza la polaridad óptima para la extracción de las antocianinas del maqui.
- A diferencia de lo visto para la extracción de antocianinas mediante MAE, la extracción aumenta a medida que aumenta la temperatura. En este caso, el rango de temperatura utilizado es más pequeño en comparación con el utilizado en MAE, y en este rango de valores no se observa la degradación de las antocianinas presentes en el maqui.
- En cuanto al ratio, cuanto mayor sea la variación de concentración, es decir, cuanto menor sea la cantidad de muestra en un mayor volumen de disolvente, mayor gradiente y por tanto, mayor extracción, favorecida por la transferencia de masa. Por este motivo, el valor óptimo del ratio es su valor máximo. No se han empleado ratios mayores ya que se tendrían errores a la hora de cuantificar las antocianinas por estar algunas de ellas por debajo del límite de cuantificación.

A continuación, se muestran en la Tabla 18, las **condiciones óptimas** para la extracción de antocianinas en MAE:

Factor	Valores óptimos
%MeOH	61,5
Temperatura (°C)	69,4
Amplitud (%)	46
Ciclo (s)	0,7
pH	2,1
Ratio (mL)	20

Tabla 18: Condiciones óptimas para la extracción de antocianinas en UAE



5.2.3.3.1. Estudio de la cinética de extracción

Una vez conocidas y seleccionadas las condiciones óptimas de extracción para las antocianinas en la extracción asistida por ultrasonidos, se realizó el ensayo de cinética para seleccionar el tiempo óptimo. Se evaluaron tiempos entre 2 y 25 minutos por triplicado, mostrando los resultados en la Figura 25:

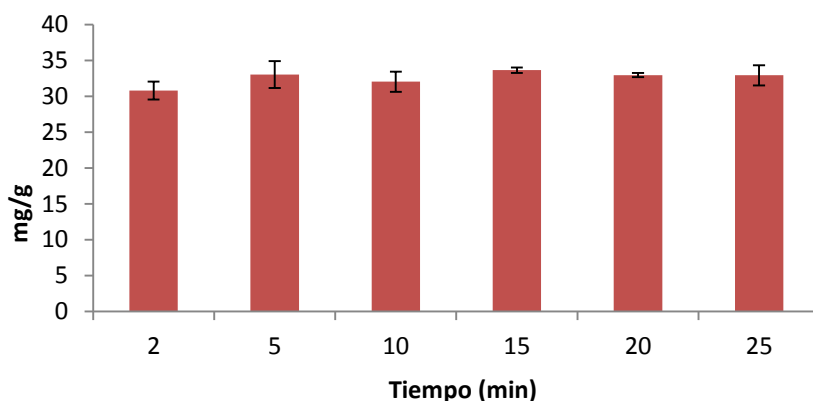


Figura 25: Concentración de antocianinas frente al tiempo de extracción en UAE

Se observa que a partir de los 5 minutos de extracción no hay diferencias estadísticamente significativas, por tanto el tiempo óptimo de extracción fue de 5 minutos, ya que supone un ahorro tanto de tiempo como de dinero, al producirse la misma cantidad extraída, pero en un tiempo menor.

5.2.3.3.2. Estudio de la repetibilidad y precisión intermedia

Finalmente, con las condiciones óptimas obtenidas se realizaron los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia, que se muestran en la Tabla 19:

	REPETIBILIDAD	PRECISIÓN INTERMEDIA
Media (mg/g)	33,024	31,233
Desviación estándar (mg/g)	0,819	0,912
Coefficiente de variación (%)	2,48	2,92

Tabla 19: Ensayos de repetibilidad y precisión intermedia para antocianinas totales en UAE

Se obtienen unos resultados bastante precisos, incluso más que los que se obtuvieron para los compuestos fenólicos totales, siendo en todo momento el coeficiente de variación menor al 5%. Además, en comparación con la extracción asistida por microondas, se puede decir que se trata de una técnica ligeramente más robusta, ya que estos valores de error son menores.



5.2.4. Aplicación a muestras reales

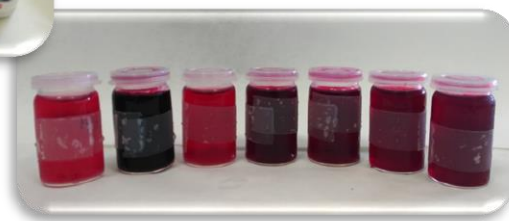
Una vez obtenidas las condiciones óptimas según las técnicas de extracción asistida por microondas y extracción asistida por ultrasonidos para la extracción tanto de compuestos fenólicos como de antocianinas totales, se aplicaron dichos métodos a distintas muestras reales elaboradas a partir de maqui. Las muestras reales vienen recogidas en la Tabla 2 y mostradas en la Figura 26. Los extractos obtenidos de cada una de las muestras reales analizadas se pueden observar en la figura 27.



Figura 26: Muestras reales analizadas



Figura 27: Extractos de muestras reales



5.2.4.1. Compuestos fenólicos totales

Se realizaron un total de 21 extracciones (7 muestras reales por triplicado), donde las muestras reales fueron sometidas a una extracción asistida por microondas en las condiciones óptimas para compuestos fenólicos totales (Tabla 8) y otras 21 extracciones, donde las muestras reales fueron sometidas a una extracción asistida por ultrasonidos en las condiciones óptimas para compuestos fenólicos totales (Tabla 15). Posteriormente, los extractos fueron analizados mediante el procedimiento de Folin-Ciocalteu. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 28:

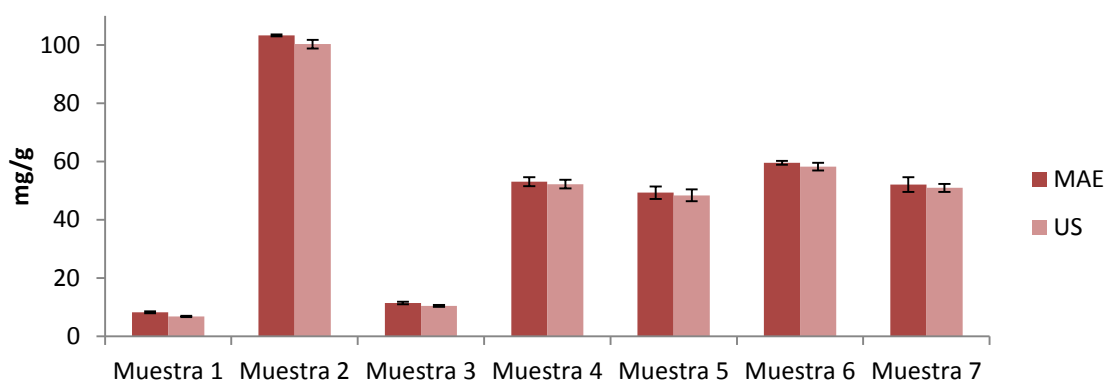


Figura 28: Extracción de compuestos fenólicos totales en muestras reales ($n = 3$)

En primer lugar, al observar los resultados obtenidos por ambas técnicas de extracción, se puede decir que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas, aunque de manera visual se puede observar que MAE es más eficaz que UAE, ya que consigue la extracción de una mayor



cantidad de compuestos fenólicos totales. Es destacable, la diferencia existente entre los dos tipos de cápsulas analizadas (Muestras 1 y 2), obteniéndose una concentración de compuestos fenólicos totales mucho mayor en la segunda.

Por último, se puede ver que la cantidad de compuestos fenólicos totales extraídos en las distintas muestras liofilizadas (Muestras 4-7) es muy parecida, a pesar de provenir de lotes distintos o incluso proceder de marcas diferentes. Además, se obtiene una concentración relativamente alta debido a que, el liofilizado permite la conservación de las propiedades y características beneficiosas durante su transporte.

5.2.4.2. Antocianinas totales

Análogamente a como se ha realizado para compuestos fenólicos totales, se llevó a cabo un estudio comparativo para la extracción de las antocianinas totales en todas las muestras reales, empleando tanto la extracción asistida por microondas como la extracción asistida por ultrasonidos. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 29:

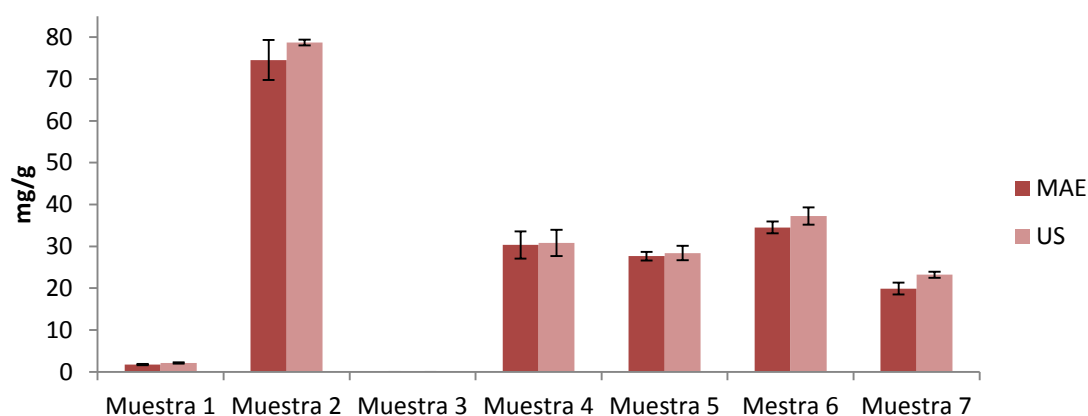


Figura 29: Extracción de antocianinas totales en muestras reales ($n = 3$)

En este caso, a la vista de los resultados, aunque no se obtienen diferencias estadísticamente significativas, se podría decir que en MAE se produce una mínima degradación, aunque sea solamente visual, de las antocianinas presentes en el maqui. Por tanto, de manera visual, se observa que UAE es más eficaz que MAE, ya que consigue la extracción de una mayor cantidad de antocianinas totales.

A su vez, también es destacable la gran diferencia existente en la cantidad de antocianinas totales extraídas en los dos tipos de cápsulas analizadas (Muestras 1 y 2) siendo mucho mayor los valores obtenidos en la Muestra 2. Por su parte, la cantidad de antocianinas extraídas en las distintas muestras liofilizadas (Muestras 4-7) es muy parecida, al igual que sucedía en los compuestos fenólicos totales.

Por último, hay que destacar que en la Muestra 3, no se observa la extracción de antocianinas provenientes de maqui. Esto no es debido a que no se extraiga nada y la concentración de antocianinas totales en la muestra sea 0, sino a que se ha obtenido un cromatograma diferente al característico de



las muestras de maqui, lo que significa que aunque contenga compuestos fenólicos y antocianinas, no se trata del fruto que se ha estado analizando sino de otro completamente diferente.

Debido a los inesperados resultados obtenidos en la Muestra 3, se decidió realizar un pequeño estudio para intentar averiguar el tipo de fruto presente en esta muestra. El cromatograma obtenido, tras el análisis del extracto por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), utilizando el método en gradiente mencionado en la Tabla 4, se muestra a continuación en la Figura 30:

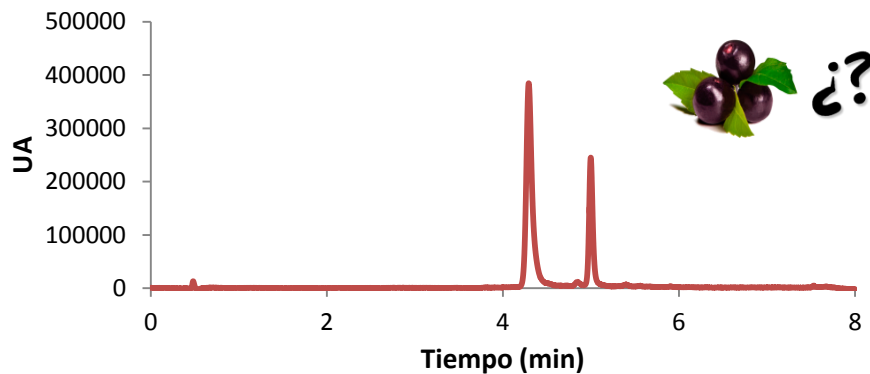


Figura 30: Cromatograma obtenido tras el análisis mediante HPLC de la Muestra 3

Se pueden observar dos señales, a un tiempo de retención en torno a 4,25 y 5 minutos, respectivamente. Este extracto se analizó mediante el equipo de UHPLC-Q-ToF-MS previamente descrito, de manera que se obtuvo que dichas antocianinas presentes en la muestra eran la cianidina 3-*O*-glucósido y la delphinidina 3-*O*-glucósido.

De la experiencia del grupo de investigación y de la consulta bibliográfica⁷, se obtiene que coinciden con las antocianinas presentes en la jaborcaba (*Myrciaria cauliflora*), como se puede observar en el cromatograma mostrado en la Figura 31:

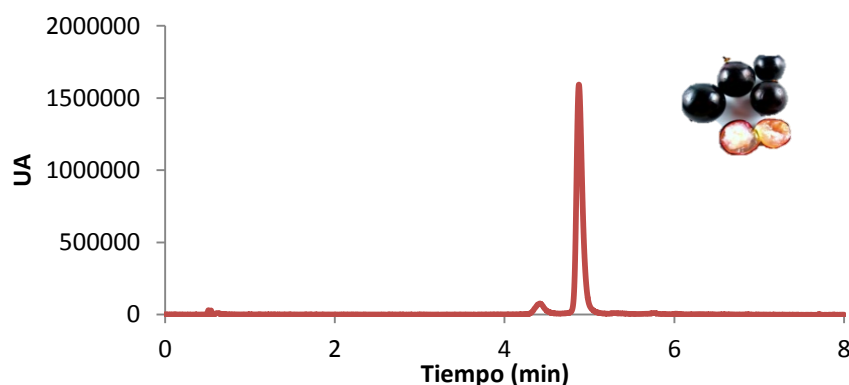


Figura 31: Cromatograma obtenido para un extracto de Jaboticaba

Cabe destacar que la proporción de cada una de las antocianinas presentes es la contraria, es decir, en el caso de la Muestra 3 la mayoritaria es la cianidina 3-*O*-glucósido, mientras que en el caso de la



jaboticaba es la delfinidina 3-*O*-glucósido. Se piensa por lo tanto que la Muestra 3 podría tratarse de una variedad de este tipo de especie, máxime cuando la jaboticaba y otras especies de la misma familia se producen tanto en ciertas zonas de Chile como de Argentina, al igual que el maqui.

De estos resultados queda confirmada la gran importancia de disponer de las técnicas de extracción suficientes y equipos adecuados para garantizar la calidad de los productos consumidos y evitar así posibles fraudes alimentarios, como el que se ha descubierto.

5.2.5. Comparación de ambos métodos

Una vez obtenidos todos los resultados para la extracción asistida por microondas y para la extracción asistida por ultrasonidos, se puede observar que se necesita un mayor tiempo de extracción tanto para compuestos fenólicos totales como para antocianinas empleando UAE. No obstante, en el caso de MAE, además del tiempo de extracción, se ha de tener en cuenta el tiempo necesario para alcanzar la temperatura (3 minutos) y el enfriamiento hasta temperatura ambiente (25 minutos). Por tanto, considerando el tiempo total requerido para ambos métodos de extracción, se puede decir que la extracción asistida por ultrasonidos es más rápida. Pero por otro lado, también hay que tener en cuenta que, en el caso de MAE, se pueden introducir de 8 a 40 muestras en el carrusel y realizar la extracción de todas ellas a la vez, mientras que en el caso de UAE, se extraen individualmente.

Teniendo en cuenta la influencia de cada una de las variables analizadas, independientemente de la técnica de extracción que se esté empleando, para conseguir extraer los compuestos fenólicos totales presentes en el maqui, el parámetro a tener más en cuenta y por tanto, el más influyente es la temperatura; mientras que para conseguir extraer las antocianinas presentes en el maqui, el parámetro más influyente es el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción.

En cuanto a las muestras reales analizadas, a la vista de los gráficos obtenidos, se puede decir que a pesar de que no se observan diferencias estadísticamente significativas, visualmente se observa que la extracción asistida por microondas (MAE) es más eficaz para la extracción de compuestos fenólicos totales, mientras que la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) es más eficaz para la extracción de antocianinas totales.

Esto puede ser debido a que, en la extracción asistida por microondas se puede producir cierta degradación de los compuestos fenólicos, provocando la ruptura y fragmentación de las moléculas de gran tamaño en otros compuestos fenólicos más pequeños que darían también reacción positiva con el reactivo de Folin-Ciocalteu, aumentando el valor de absorbancia. De esta forma, se tendría un mayor número de compuestos libres, cuyos grupos hidroxilos van a reaccionar, haciendo que el valor de absorbancia se intensifique.

Por el contrario, en el caso de la extracción de antocianinas, la degradación provoca que éstas no sean detectadas con el equipo de cromatografía líquida (HPLC), haciendo que su valor disminuya y provocando así que el valor de la extracción asistida por ultrasonidos se intensifique respecto a éste.



6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- El método de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) desarrollado ha resultado ser eficaz para la separación y cuantificación de las antocianinas presentes en el maqui.
- La extracción asistida por microondas ha resultado ser un método adecuado tanto para la extracción de compuestos fenólicos totales como de antocianinas presentes en maqui.
- La extracción asistida por ultrasonidos ha resultado ser un método adecuado tanto para la extracción de compuestos fenólicos totales como de antocianinas presentes en maqui.
- Los dos métodos de extracción que han sido desarrollados presentan una alta repetibilidad y precisión intermedia, tanto para compuestos fenólicos totales como para antocianinas, con coeficiente de variación inferior al 5%.
- Se ha demostrado la aplicabilidad de los métodos desarrollados tanto para la cuantificación de compuestos fenólicos totales como de antocianinas en muestras reales (matrices de alimentos que presentan maqui en su formulación).
- Los métodos desarrollados han demostrado ser útiles para la detección de fraudes de alimentos elaborados a partir de maqui.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Fredes C, Robert P. The powerful colour of the maqui (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) fruit. *J Berry Res.* 2014;4(4):175-182.
2. Fredes C, Yousef GG, Robert P, et al. Anthocyanin profiling of wild maqui berries (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) from different geographical regions in Chile. *J Sci Food Agric.* 2014;94(13):2639-2648.
3. Espada-bellido E, Ferreiro-gonzález M, Carrera C, Palma M, Barroso CG, Barbero GF. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. *Food Chem.* 2017;219:23-32.
4. Garzón GA, Narváez-cuenca C, Vincken J, Gruppen H. Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. 2017;217:364-372.
5. Haminiuk CWI, Maciel GM, Plata-Oviedo MS V, Peralta RM. Phenolic compounds in fruits - an overview. *Int J Food Sci Technol.* 2012;47(10):2023-2044.
6. Manquián-cerda K, Escudey M, Zúñiga G, Arancibia-miranda N. Ecotoxicology and Environmental Safety Effect of cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets grown in vitro. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2016;133:316-326.
7. Barcellos T, Beatriz A, Martins N, et al. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. *J Funct Foods.* 2015;17:422-433.
8. Cespedes CL, Pavon N, Dominguez M, et al. The Chilean superfruit black-berry *Aristotelia chilensis* (*Elaeocarpaceae*), Maqui as mediator in inflammation-associated disorders. 2016:1-13.
9. Genskowsky E, Puente LA, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López J, Muñoz LA, Viuda-Martos M. Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry. *J Sci Food Agric.* 2016;96(February):4235-4242.
10. Céspedes CL, Valdez-Morales M, Avila JG, El-Hafidi M, Alarcón J, Paredes-López O. Phytochemical profile and the antioxidant activity of Chilean wild black-berry fruits, *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz (*Elaeocarpaceae*). *Food Chem.* 2010;119(3):886-895.
11. Fernández-ponce MT, Razi B, Nasri H, et al. Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from mango leaves using different green techniques: Kinetic and scale up study. 2016;299:420-430.
12. Brauch JE, Buchweitz M, Schweiggert RM, Carle R. Detailed analyses of fresh and dried maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) berries and juice. *Food Chem.* 2016;190:308-316.
13. Lucas-Gonzalez R, Navarro-Coves S, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López J, Muñoz LA, Viuda-Martos M. Assessment of polyphenolic profile stability and changes in the antioxidant potential of maqui berry (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) during in vitro gastrointestinal digestion. *Ind Crops Prod.* 2016;94:774-782.



14. Glover BJ, Martin C. Anthocyanins. *Curr Biol*. 2012;22(5):R147-R150.
15. Clifford MN, Scalbert A. Review Ellagitannins – nature , occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*. 2000;80:1118-1125.
16. Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K. Direct Intestinal Absorption of Red Fruit Anthocyanins , Cyanidin-3-glucoside and Cyanidin-3 , 5-diglucoside , into Rats and. 1999.
17. Escribano-Bailón MT, Alcalde-Eon C, Muñoz O, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. Anthocyanins in berries of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). *Phytochem Anal*. 2006;17(1):8-14.
18. Bucic-Kojic A, Planinic M, Tomas S, Bilic M, Velic D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J Food Eng*. 2007;81(1):236-242.
19. Khattab RY, Zeitoun MA. Quality evaluation of flaxseed oil obtained by different extraction techniques. *LWT - Food Sci Technol*. 2013;53(1):338-345.
20. Drosou C, Kyriakopoulou K, Bimpilas A, Tsimogiannis D, Krokida M. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Ind Crops Prod*. 2015;75:141-149.
21. Routray W, Orsat V. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food Bioprocess Technol*. 2012;5(2):409-424.
22. Chan CH, Yusoff R, Ngoh GC, Kung FWL. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J Chromatogr A*. 2011;1218(37):6213-6225.
23. Spigno G, De Faveri DM. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *J Food Eng*. 2009;93(2):210-217.
24. Thirugnanasambandham K, Sivakumar V, Maran JP. Microwave-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Int J Biol Macromol*. 2015;72:1-5.
25. Liazid A, Guerrero RF, Cantos E, Palma M, Barroso CG. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chem*. 2011;124(3):1238-1243.
26. Li H, Deng Z, Wu T, Liu R, Loewen S, Tsao R. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chem*. 2012;130(4):928-936.
27. Dahmoune F, Nayak B, Moussi K, Remini H, Madani K. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem*. 2015;166:585-595.
28. Esclapez MD, García-Pérez J V., Mulet A, Cárcel JA. Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Eng Rev*. 2011;3(2):108-120.
29. Azuola R, Vargas Aguilar P. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnol en Marcha*. 2007;20(4):1.
30. Jakobek L, Boc M, Barron AR. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Apples. *Food Anal Methods*. 2015;8(10):2612-2625.
31. Duan L, Jiang R, Shi Y, Duan C, Wu G. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of higher fatty



- acids in grape berries (seed-free fruit sections). *Anal Methods*. 2016;6208-6215.
32. Nguyen TNT, Phan LHN, Le VVM. Enzyme-assisted and ultrasound-assisted extraction of phenolics from mulberry (*Morus alba*) fruit: Comparison of kinetic parameters and antioxidant level. *Int Food Res J*. 2014;21(5):1937-1940.
 33. Scarelli C, Sergio A, Santos P, et al. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L.): Effects on the vegetable matrix and mathematical modeling. 2017;198:36-44.
 34. Rover MR, Brown RC. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *J Anal Appl Pyrolysis*. 2013;104:366-371.
 35. Ti H, Li Q, Zhang R, et al. Free and bound phenolic profiles and antioxidant activity of milled fractions of different indica rice varieties cultivated in southern China. *Food Chem*. 2014;159:166-174.
 36. Paes J, Dotta R, Barbero GF, Martínez J. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids. *J Supercrit Fluids*. 2014;95:8-16.
 37. Hogan S, Chung H, Zhang L, et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chem*. 2010;118(2):208-214.
 38. Yang C, Ren C, Piao X, Kannan N, Li D. An on-line sample pretreatment technique for the HPLC analysis of plant samples. *J Sep Sci*. 2013;36(21-22):3599-3607.
 39. Guiochon G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2007;1168(1-2):101-168.
 40. Belanger JMR, Pare JRJ, Sigouin M. High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles and Applications. *Tech Instrum Anal Chem*. 1997;18:37-59.
 41. Stipcovich T, Barbero GF, Ferreiro-González M, Palma M, Barroso CG. Fast analysis of capsaicinoids in Naga Jolokia extracts (*Capsicum chinense*) by high-performance liquid chromatography using fused core columns. *Food Chem*. 2018;239.
 42. Hager TJ, Howard LR, Liyanage R, Lay JO, Prior RL. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *J Agric Food Chem*. 2008;56(3):661-669.
 43. Karaaslan NM, Yaman M. Determination of anthocyanins in cherry and cranberry by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Eur Food Res Technol*. 2016;242(1):127-135.
 44. Cavazzini A, Marchetti N, Guzzinati R, et al. Enantioseparation by ultra-high-performance liquid chromatography. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2014;63:95-103.
 45. Shi Z, Li Q, Xu D, Huai Q, Zhang H. Graphene-based pipette tip solid-phase extraction with ultra-high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the analysis of carbamate pesticide residues in fruit juice. *J Sep Sci*. 2016;39(22):4391-4397.



46. Panighel A, De Rosso M, Dalla Vedova A, Flamini R. Putative identification of new p-coumaroyl glycoside flavonoids in grape by ultra-high performance liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2015;29(4):357-366.
47. Zhang LL, Bai YL, Shu SL, et al. Simultaneous quantitation of nucleosides, nucleobases, amino acids, and alkaloids in mulberry leaf by ultra high performance liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2014;37(11):1265-1275.
48. Menet MC. Principes de la spectrométrie de masse. *Rev Francoph des Lab.* 2011;2011(437):41-53.
49. Xu F, Zou L, Liu Y, Zhang Z, Ong CN. Enhancement of the capabilities of liquid chromatography-mass spectrometry with derivatization: General principles and applications. 2011;(3):1143-1172.
50. Flamini R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. *Mass Spectrom Rev.* 2003;22(4):218-250.
51. Prior RL, Lazarus SA, Cao G, Muccitelli H, Hammerstone JF. Identification of Procyanidins and Anthocyanins in Blueberries and Cranberries (*Vaccinium Spp.*) Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2001;49(3):1270-1276.
52. Watson M, Long H, Lu B. Investigation of wrinkling failure mechanics in metal spinning by Box-Behnken design of experiments using finite element method. *Int J Adv Manuf Technol.* 2015;78(5-8):981-995.
53. Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal Chim Acta.* 2007;597(2):179-186.



8. APÉNDICE

APÉNDICE I

BLOQUE	%MeOH	pH	Temperatura	Ratio	C. Fenólicos (mg/g)	Antocianinas (mg/g)
1	-1	-1	0	0	46,3185	27,9203
1	1	-1	0	0	49,9478	37,6998
1	-1	1	0	0	38,0650	28,7249
1	1	1	0	0	46,8774	38,2256
1	0	0	-1	-1	46,7254	42,7471
1	0	0	1	-1	62,0327	20,1989
1	0	0	-1	1	51,1263	43,0413
1	0	0	1	1	60,6038	30,1496
1	0	0	0	0	45,9313	43,6857
1	-1	0	0	-1	39,5996	26,6264
1	1	0	0	-1	57,1798	37,5728
1	-1	0	0	1	39,2056	29,0107
1	1	0	0	1	45,6714	41,0264
1	0	-1	-1	0	56,8500	39,0702
1	0	1	-1	0	49,4314	25,6352
1	0	-1	1	0	72,1317	32,0880
1	0	1	1	0	50,5749	37,3113
1	0	0	0	0	43,3044	40,1365
1	0	-1	0	-1	46,8658	38,2616
1	0	1	0	-1	43,4807	38,8650
1	0	-1	0	1	52,1035	39,3850
1	0	1	0	1	46,1519	39,9608
1	-1	0	-1	0	35,6093	32,5628
1	1	0	-1	0	43,0008	41,6664
1	-1	0	1	0	45,5471	20,0026
1	1	0	1	0	49,0859	31,5876
1	0	0	0	0	42,3913	39,9370

Tabla 20: Diseño de experimentos Box-Behnken para 4 variables (MAE)



BLOQUE	%MeOH	Temperatura	Amplitud	Ciclo	pH	Ratio	C. Fenólicos (mg/g)	Antocianinas (mg/g)
1	0	0	-1	0	-1	-1	37,1055	34,2076
1	0	0	1	0	-1	-1	38,4909	34,4857
1	0	0	-1	0	1	-1	44,4503	31,2860
1	0	0	1	0	1	-1	47,6808	31,0025
1	0	0	-1	0	-1	1	50,3614	38,1692
1	0	0	1	0	-1	1	55,1471	40,0021
1	0	0	-1	0	1	1	48,3883	33,1889
1	0	0	1	0	1	1	51,4452	31,8844
1	0	-1	0	-1	-1	0	38,0698	29,9577
1	0	1	0	-1	-1	0	60,4659	36,4681
1	0	-1	0	1	-1	0	35,1772	33,8652
1	0	1	0	1	-1	0	71,0664	38,7693
1	0	-1	0	-1	1	0	38,8941	30,7359
1	0	1	0	-1	1	0	46,3253	35,5435
1	0	-1	0	1	1	0	41,2067	31,3492
1	0	1	0	1	1	0	44,1155	31,1199
1	-1	0	-1	-1	0	0	39,5151	21,1107
1	1	0	-1	-1	0	0	37,3952	31,9516
1	-1	0	1	-1	0	0	40,5759	21,1965
1	1	0	1	-1	0	0	38,2630	31,2242
1	-1	0	-1	1	0	0	41,9620	21,2014
1	1	0	-1	1	0	0	46,6516	33,6582
1	-1	0	1	1	0	0	45,9709	25,1732
1	1	0	1	1	0	0	39,1385	35,1013
1	0	-1	-1	0	0	-1	47,2549	30,5260
1	0	1	-1	0	0	-1	37,9226	34,1874
1	0	-1	1	0	0	-1	46,6988	26,9179
1	0	1	1	0	0	-1	45,7995	32,2625
1	0	-1	-1	0	0	1	36,7177	31,1084
1	0	1	-1	0	0	1	42,2519	36,9123



1	0	-1	1	0	0	1	41,0852	27,1738
1	0	1	1	0	0	1	41,0668	37,1876
1	-1	-1	0	0	-1	0	35,9359	21,5581
1	1	-1	0	0	-1	0	44,4216	35,8851
1	-1	1	0	0	-1	0	51,7459	28,7836
1	1	1	0	0	-1	0	56,5429	36,0974
1	-1	-1	0	0	1	0	35,1072	21,7888
1	1	-1	0	0	1	0	37,3743	35,3392
1	-1	1	0	0	1	0	47,5807	24,7984
1	1	1	0	0	1	0	46,7728	33,6800
1	-1	0	0	-1	0	-1	37,5446	20,2599
1	1	0	0	-1	0	-1	39,7851	31,8861
1	-1	0	0	1	0	-1	38,7562	19,9098
1	1	0	0	1	0	-1	48,2206	32,7584
1	-1	0	0	-1	0	1	37,5599	20,0850
1	1	0	0	-1	0	1	39,5775	34,2134
1	-1	0	0	1	0	1	43,5168	23,6018
1	1	0	0	1	0	1	47,4698	34,0944
1	0	0	0	0	0	0	43,9668	33,6577
1	0	0	0	0	0	0	46,4446	31,2999
1	0	0	0	0	0	0	44,7822	34,3690
1	0	0	0	0	0	0	45,6343	33,6385
1	0	0	0	0	0	0	44,0849	29,1631
1	0	0	0	0	0	0	46,7627	31,8989

Tabla 21: Diseño de experimentos Box-Behnken para 6 variables (UAE)



APÉNDICE II

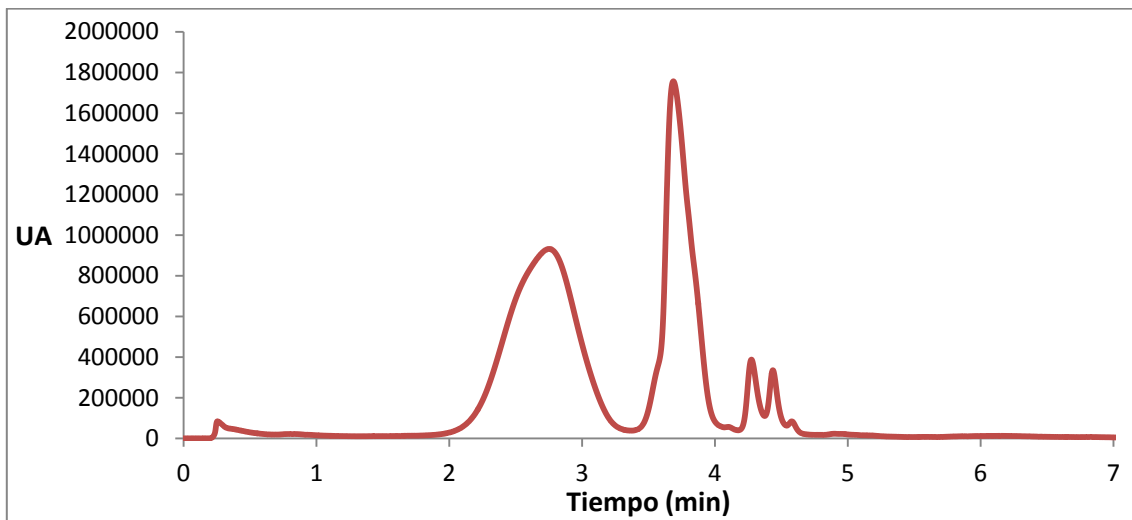


Figura 34: Cromatograma 1 obtenido a partir de los métodos ya elaborados

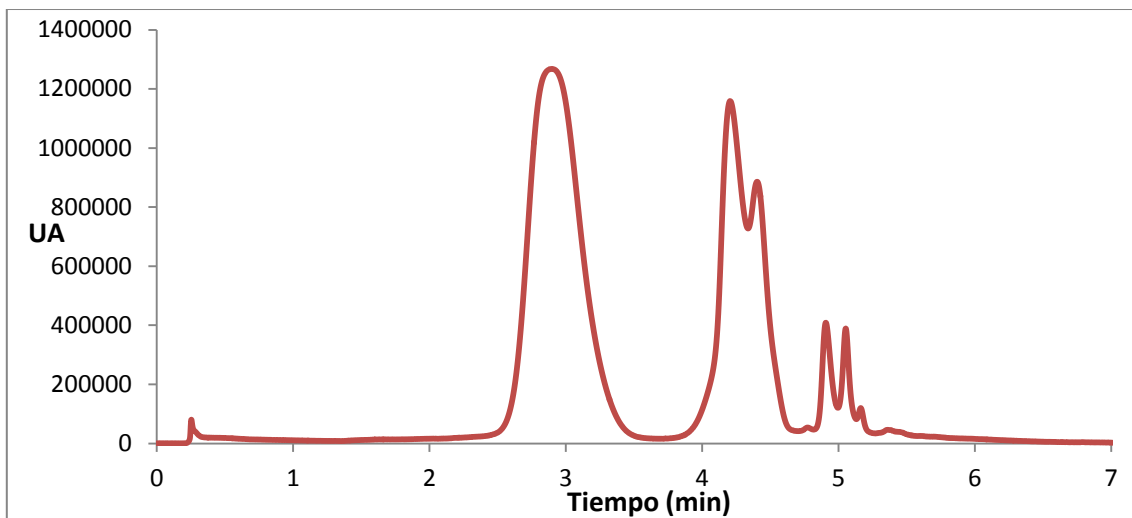


Figura 35: Cromatograma 2 obtenido tras la modificación del gradiente

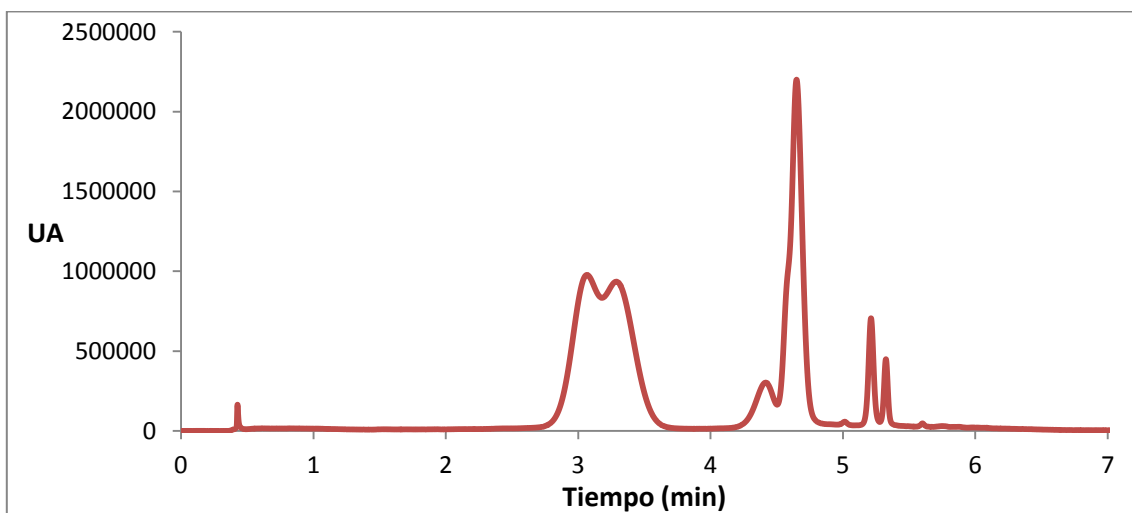


Figura 36: Cromatograma 3 obtenido al cambiar de columna cromatográfica

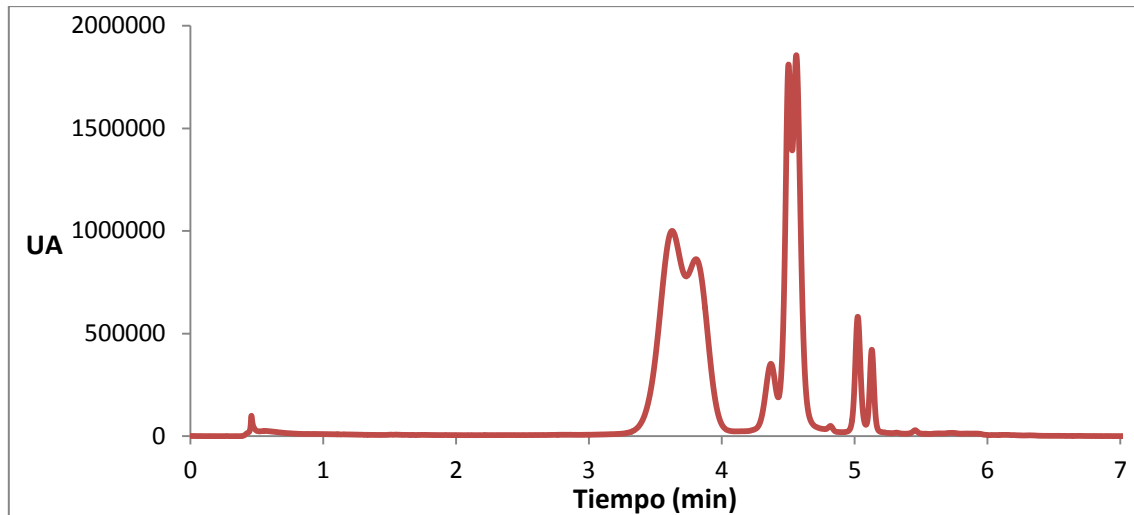


Figura 13: Cromatograma definitivo en el que se muestran las 8 antocianinas presentes en el maqui

APÉNDICE III

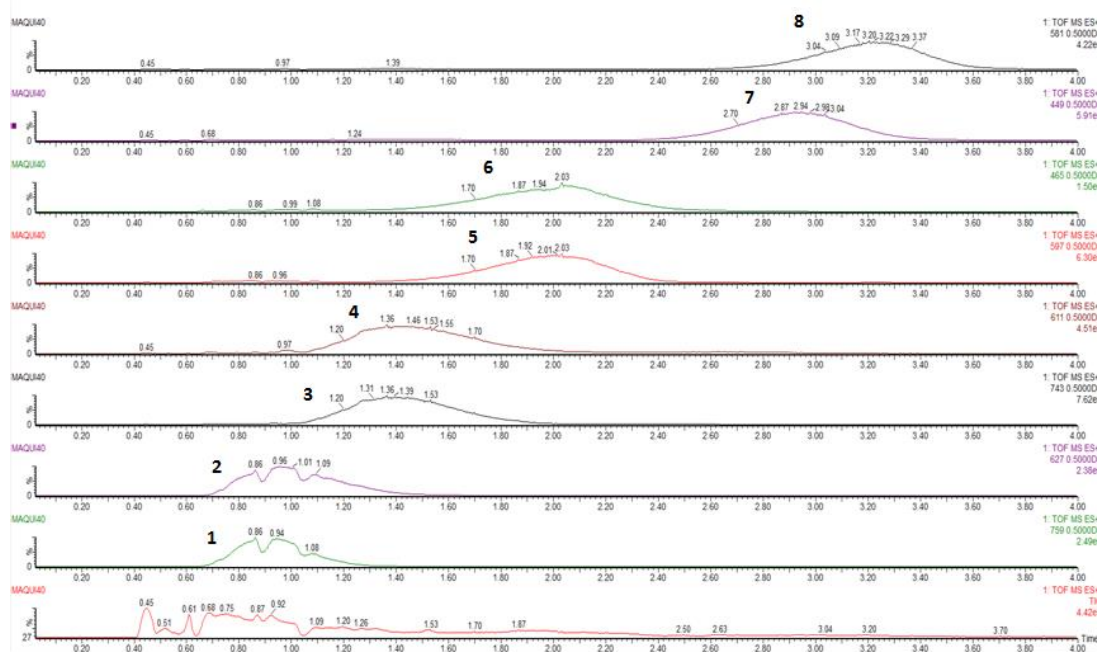
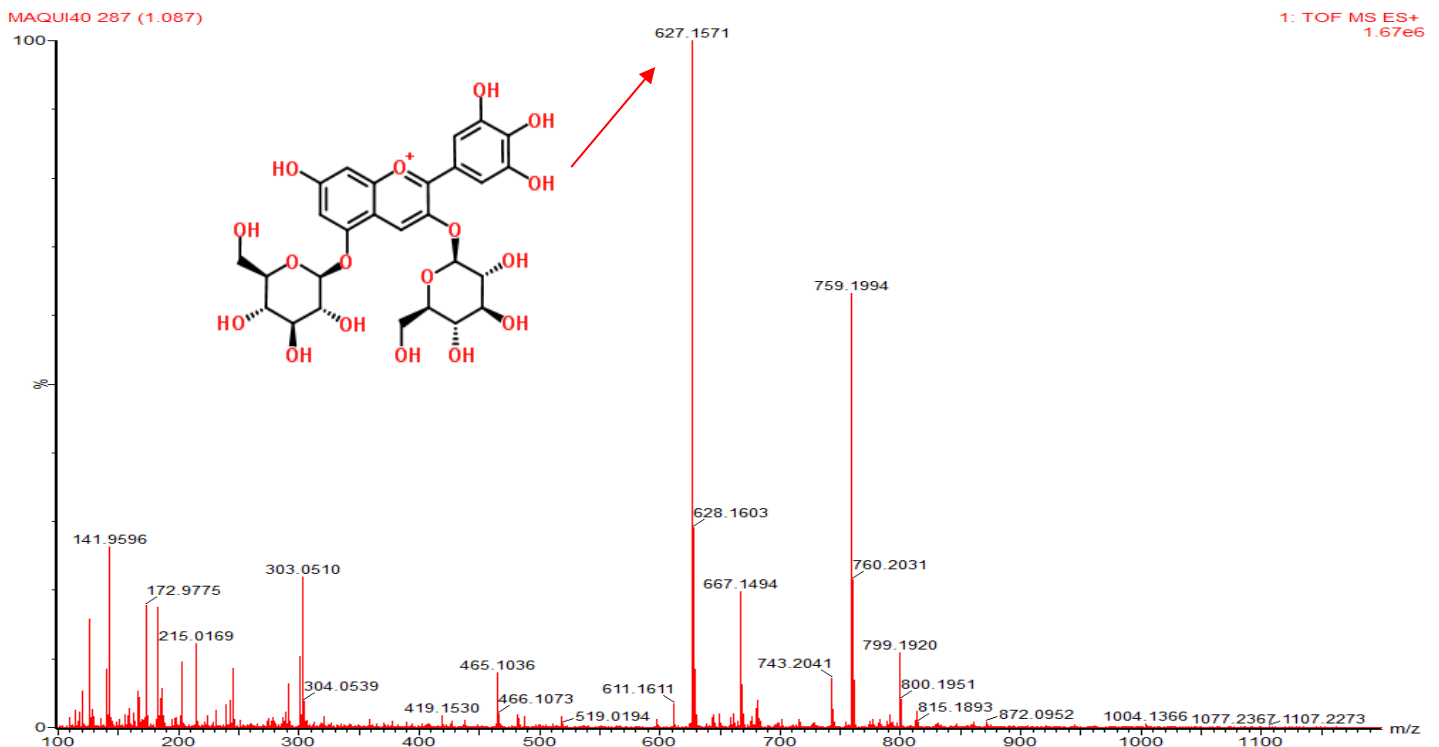
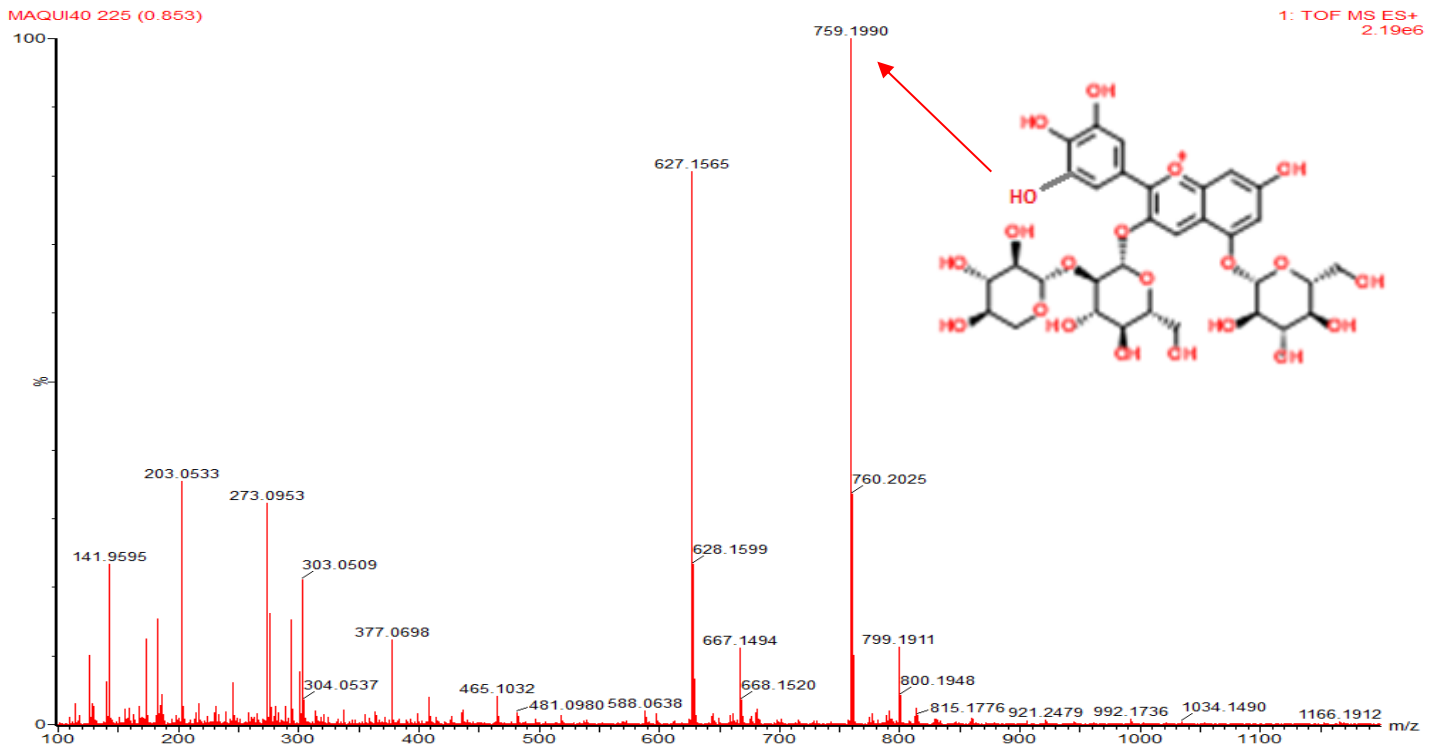
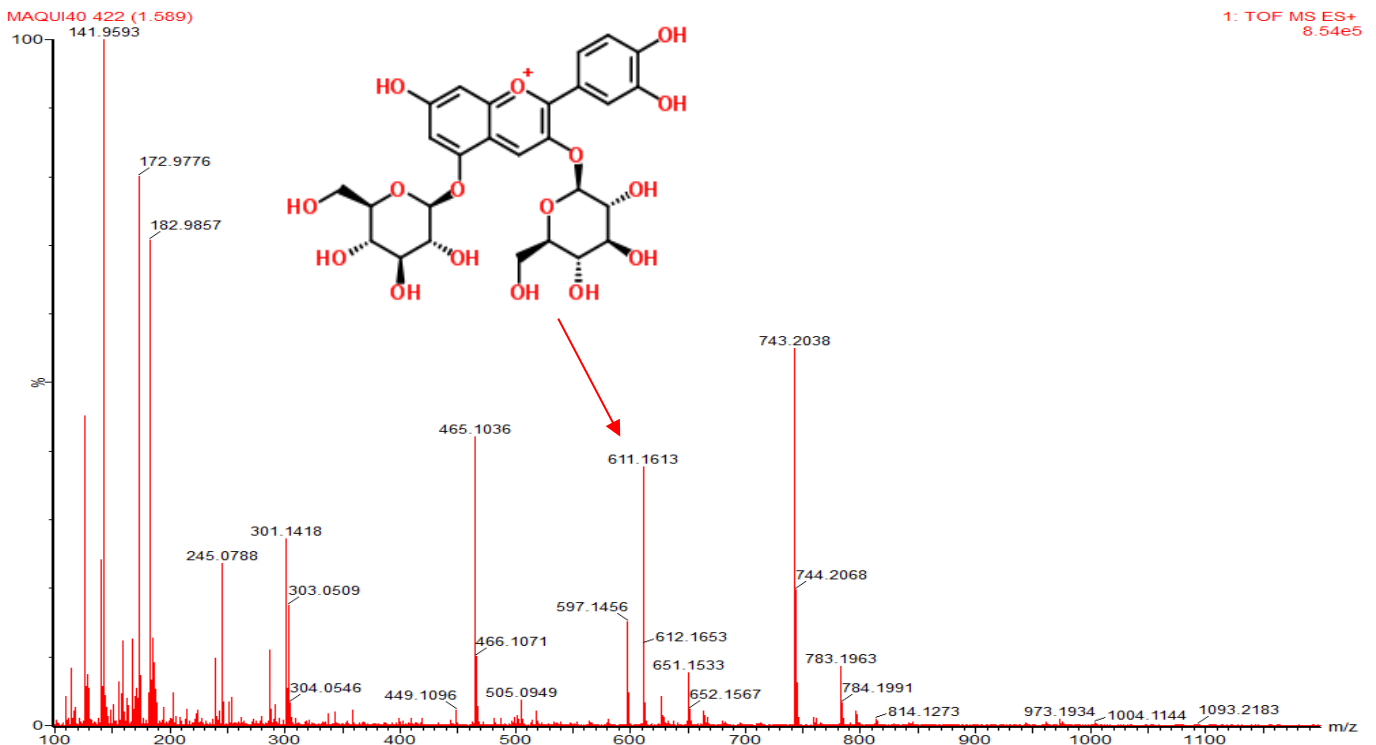
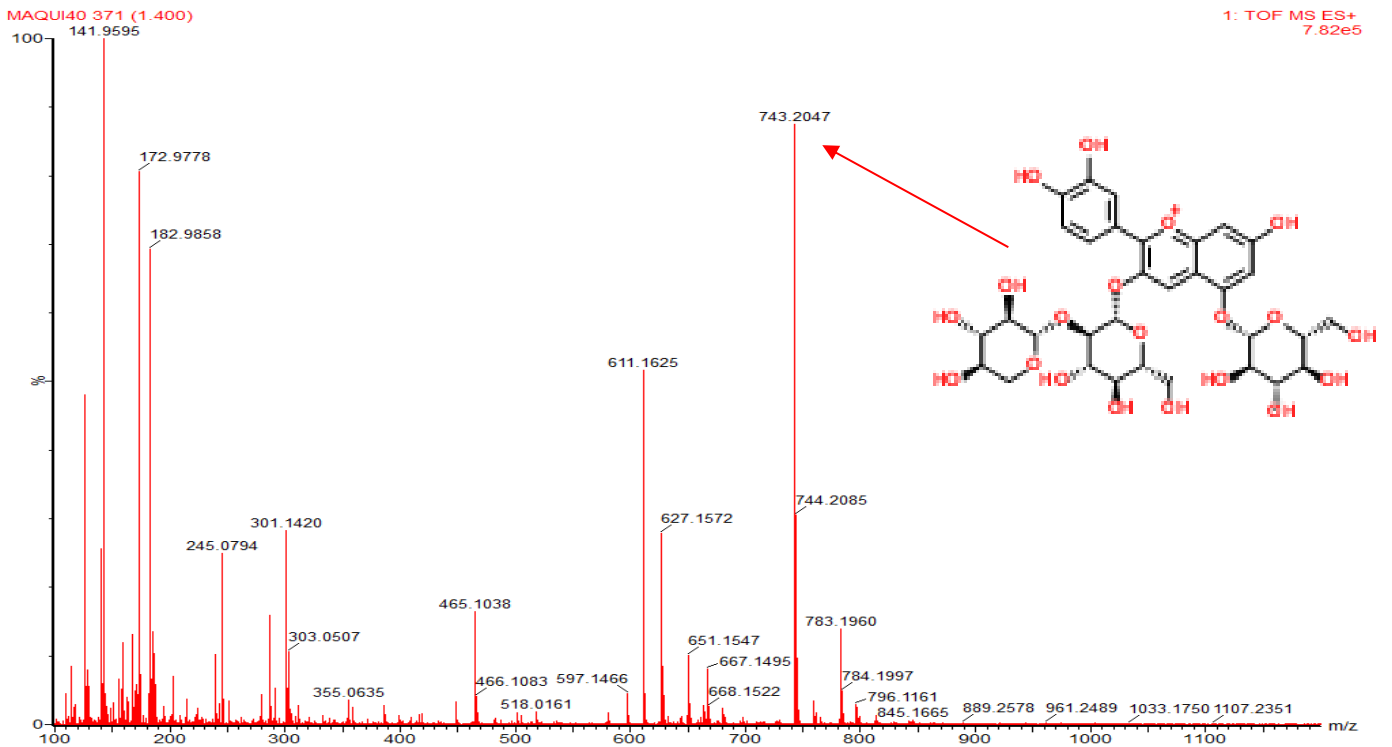
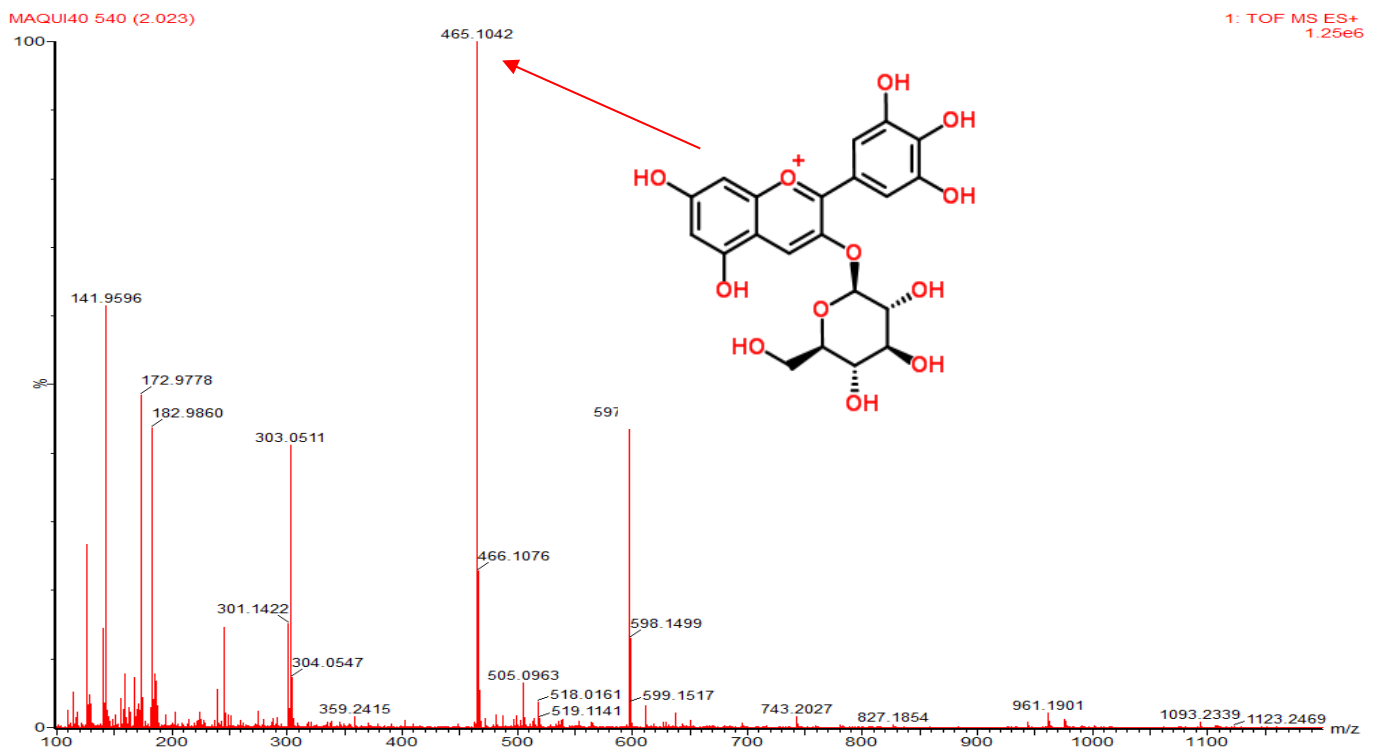
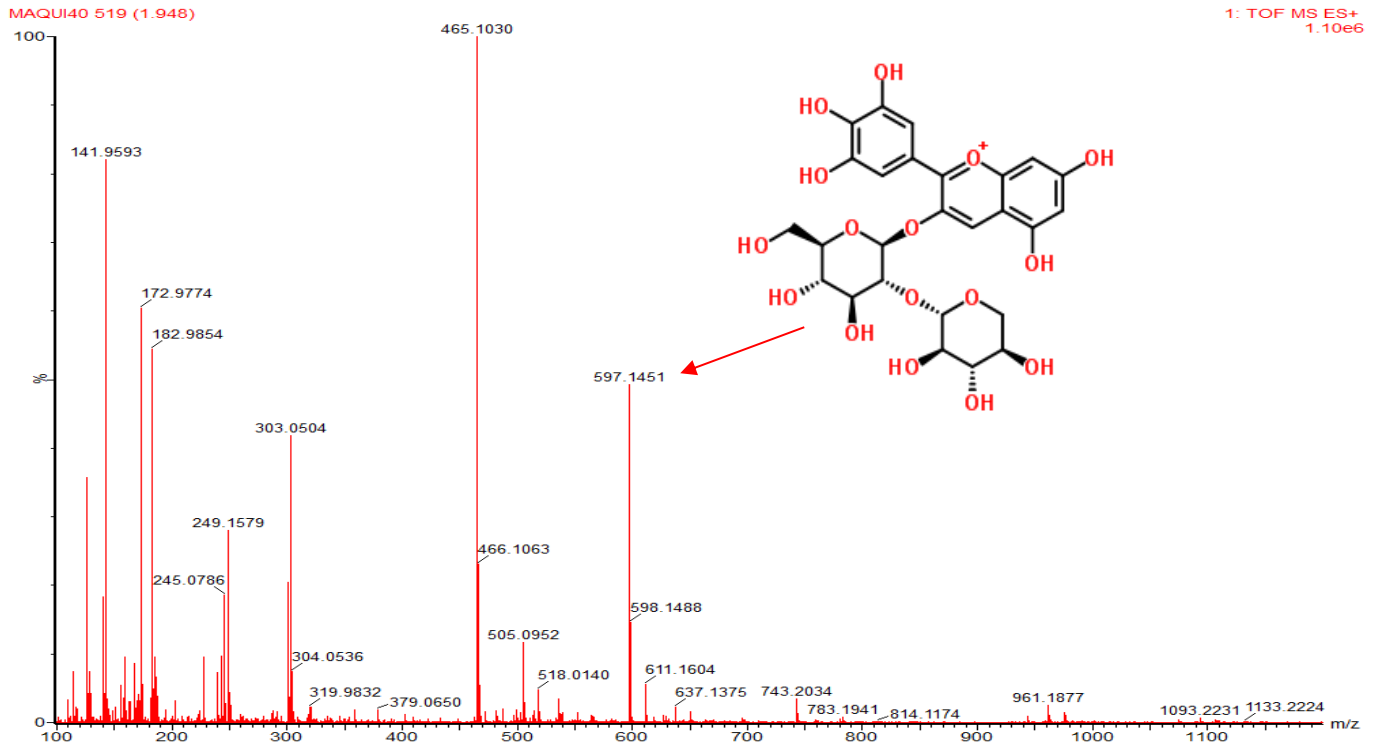


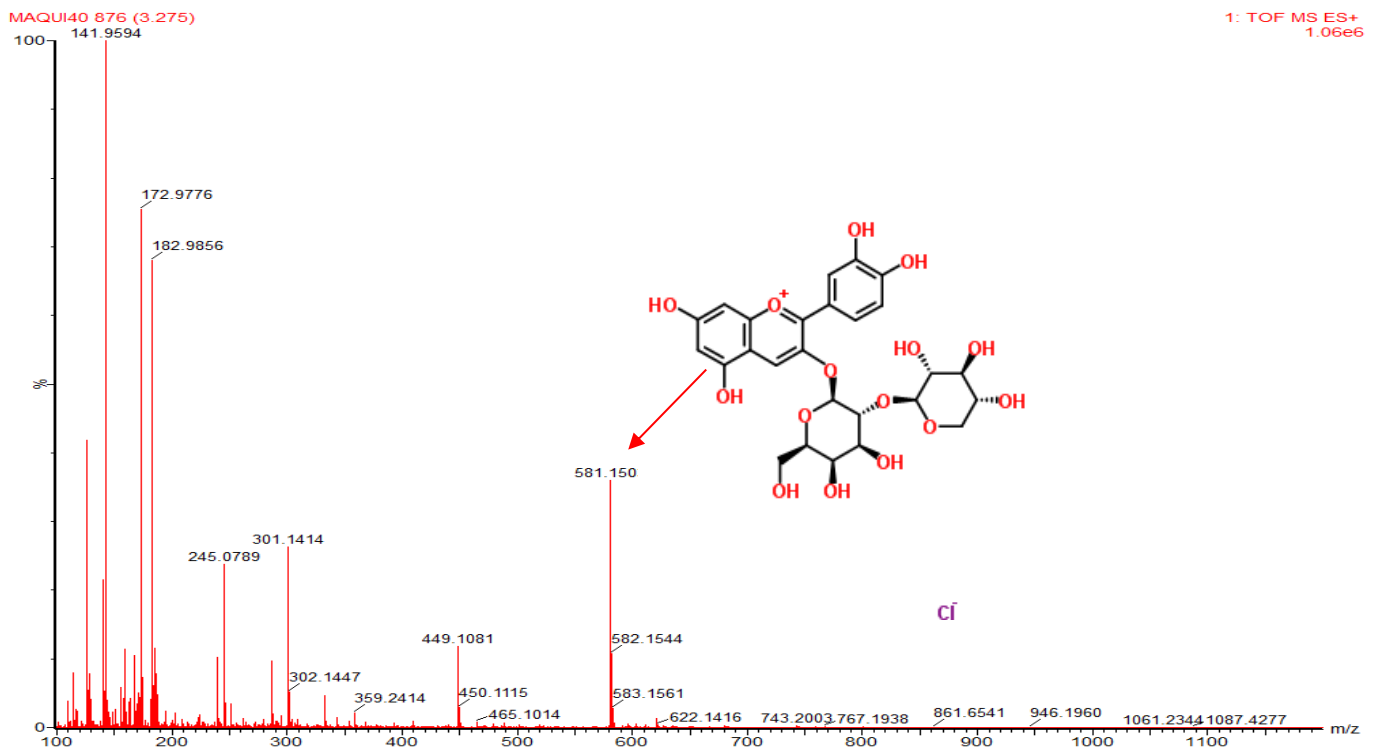
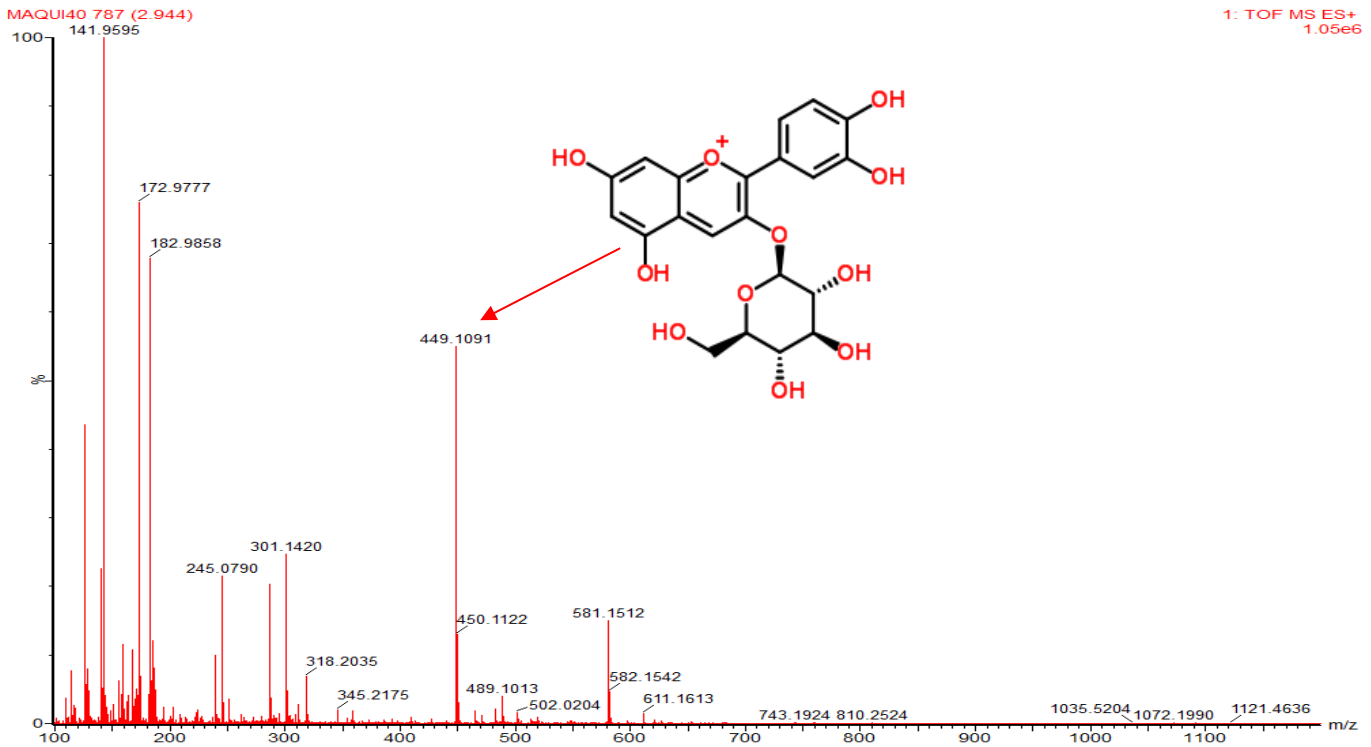
Figura 37: Cromatograma de las antocianinas presentes en las muestras de maqui por orden de elución

Las antocianinas presentes en el maqui son: 1. delfinidina 3-*O*-sambubiósido-5-*O*-glucósido; 2. delfinidina 3,5-*O*-diglucósido; 3. cianidina 3-*O*-sambubiósido-5-*O*-glucósido; 4. cianidina 3,5-*O*-diglucósido; 5. delfinidina 3-*O*-sambubiósido; 6. delfinidina 3-*O*-glucósido; 7. cianidina 3-*O*-glucósido y 8. cianidina 3-*O*-sambubiósido











APÉNDICE IV

Lista de siglas y acrónimos

- **ANOVA:** Análisis de la varianza (Analysis of variance)
- **Espectroscopia UV-Vis:** Espectroscopia ultravioleta-visible
- **HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia (High performance liquid chromatography)
- **MAE:** Extracción asistida por microondas (Microwave assisted extraction)
- **ToF-MS:** Espectroscopia de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo (Quadruple time of flight mass spectrometry)
- **UAE:** Extracción asistida por ultrasonidos (Ultrasound assisted extraction)
- **UHPLC:** Cromatografía líquida de ultra-eficacia (Ultra-high performance liquid chromatography)