



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTOCIANINAS
DE LA FRESA MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS
ASISTIDA POR CAMPOS ELÉCTRICOS PULSADOS”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

I.Q. MARCO ANTONIO AVILA HERNÁNDEZ

DIRIGIDA POR:

DR. JULIÁN CRUZ OLIVARES

DR. CESAR PEREZ ALONSO

DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2019

ÍNDICE

CAPITULO 1. PROTOCOLO DE TESIS

RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
1. ANTECEDENTES.....	7
1.1. FRESA.....	7
1.2. ANTOCIANINAS	8
1.2.1. EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS	9
1.2.1.1. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES (ED).....	10
1.2.1.2. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (EFSC).....	10
1.2.1.2.1. COEFICIENTE DE REPARTO Y PROPIEDADES TERMODINÁMICAS.....	14
1.2.1.2.2. SOLUBILIDAD	15
1.3. CAMPOS ELÉCTRICOS PULSADOS (PEF)	16
1.3.1. ENERGÍA EN EL PROCESO DE PEF.....	18
1.4. CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS.....	19
1.4.1. CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS	19
1.4.2. COLORIMETRÍA	20
1.4.3. RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES	22
1.4.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	24
3. HIPÓTESIS.....	25
4. OBJETIVOS.....	25
GENERAL.....	25
ESPECÍFICOS.....	25
5. METODOLOGÍA	26
5.1. MATERIA PRIMA Y REACTIVOS	26
5.2. PREPARACIÓN DE MATERIA PRIMA	26
5.3. CAMPOS ELÉCTRICOS PULSADOS (PEF)	27
5.3.1. ENERGÍA EN EL PROCESO DE PEF.....	28
5.4. EXTRACCIONES.....	28
5.4.1. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES (ED)	29

5.4.2. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (EFSC).....	29
5.4.2.1. COEFICIENTE DE REPARTO Y PROPIEDADES TERMODINÁMICAS	30
5.4.2.2. SOLUBILIDAD	31
5.5. CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS.....	32
5.5.1. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS TOTALES.....	32
5.5.2. COLORIMETRÍA	33
5.5.3. RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN	33
5.5.4. ESPECTROSCOPIA IR	34
CAPITULO 2. ARTICULO DE INVESTIGACIÓN.....	35
CAPITULO 3. CONCLUSIONES.....	65
CAPITULO 4. REFERENCIAS	67
CAPITULO 5. ANEXOS	
ANEXO I. ECUACIÓN DE PENG-ROBINSON	76
CAPITULO 6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	78

RESUMEN

La búsqueda constante de procesos alternativos aplicables a la extracción de productos naturales, que no utilicen disolventes orgánicos o requieran de altas temperaturas, ha llevado a la tecnología supercrítica a ocupar un lugar importante en el sector alimentario.

La extracción con fluidos supercríticos ha destacado como una alternativa a los métodos convencionales, ya que tienen características de extracción ajustables debido a su densidad, la cual puede ser controlada mediante cambios de presión y temperatura. Generalmente el dióxido de carbono es el fluido supercrítico más utilizado por ser una opción viable debido a su naturaleza medioambientalmente benigna y a sus propiedades termodinámicas flexibles.

Adicionalmente han surgido tecnologías novedosas las cuales han ayudado a mejorar los procesos productivos, una de ellas es la de campos eléctricos pulsados. Esta tecnología consiste en un tratamiento no térmico para la conservación de alimentos en el cual se coloca un alimento fluido, semifluido o sólido en una solución electrolítica entre dos electrodos por periodos cortos de tiempo (menos de un segundo) y se aplica un determinado número de pulsos de alto voltaje.

Las frutas y hortalizas de color rojo, como la fresa, presentan un alto contenido de pigmentos, destacando las antocianinas. Estos compuestos pertenecen al grupo de los flavonoides y son glucósidos de las antocianidinas, las cuales presentan actividad antioxidante, disminuyen el daño oxidativo causado por radicales libres y se relacionan con la actividad anticancerígena, antiinflamatoria y antitumoral.

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo general la extracción de las antocianinas contenidas en la fresa por medio de fluidos supercríticos asistido por campos eléctricos pulsados y posteriormente caracterizarlas, esto con la finalidad de desarrollar un método que pueda tener muchas ventajas en diferentes aspectos como los son ambientales, económicos y productivos, y que pueda considerarse como una alternativa viable en la extracción de compuestos naturales.

ABSTRACT

The constant search for alternative processes applicable to the extraction of natural products, which do not use organic solvents or require high temperatures, has led supercritical technology to occupy an important place in the food sector.

Extraction with supercritical fluids has stood out as an alternative to conventional methods, since they have adjustable extraction characteristics due to their density, which can be controlled by changes in pressure and temperature. Carbon dioxide is generally the most widely used supercritical fluid because it is a viable option due to its environmentally benign nature and its flexible thermodynamic properties.

Additionally, new technologies have emerged which have helped to improve production processes, one of which is pulsed electric fields. This technology consists of a non-thermal treatment for food preservation in which a fluid, semi-fluid or solid food is placed in an electrolyte solution between two electrodes for short periods of time (less than one second) and a certain number of high voltage pulses.

Red fruits and vegetables, such as strawberry, have a high content of pigments, highlighting anthocyanins. These compounds belong to the group of flavonoids and are glycosides of anthocyanidins, which have antioxidant activity, decrease the oxidative damage caused by free radicals and are related to the anti-cancer, anti-inflammatory and anti-tumor activity.

The present research project has as a general objective the extraction of anthocyanins contained in the strawberry by means of supercritical fluids assisted by pulsed electric fields and subsequently characterize them, this in order to develop a method that can have many advantages in different aspects such as they are environmental, economic and productive, and that can be considered as a viable alternative in the extraction of natural compounds.

INTRODUCCIÓN

La demanda de productos naturales de consumo con una alta calidad ha despertado un gran interés en la industria alimentaria para el mejoramiento de sus procesos. Ante este panorama se han abierto líneas de investigación que permiten desarrollar nuevas tecnologías enfocadas al diseño y optimización de procesos para satisfacer las necesidades que se requieren para obtener productos de alto valor agregado que cumplan con las expectativas del consumidor.

Diversos estudios se han centrado en la fresa (*Fragaria ananassa*) como una fuente rica en antocianinas, las cuales llaman la atención debido a sus propiedades principalmente antioxidantes en beneficio de la salud y como colorantes naturales en la industria alimentaria y farmacéutica para la elaboración de diversos productos. La obtención de estos compuestos cobra importancia debido a que con los métodos de extracción tradicionalmente utilizados no es posible obtenerlos en la cantidad y con la calidad que se desea.

La extracción con fluidos supercríticos es una alternativa a las metodologías convencionales que ha demostrado ser factible para la obtención de compuestos naturales debido a la selectividad y afinidad que estos disolventes pueden llegar a tener. El dióxido de carbono es el fluido supercrítico más utilizado por ser una opción viable debido a su naturaleza amigable con el medio ambiente y a sus propiedades fisicoquímicas flexibles para la extracción.

Los campos eléctricos pulsados son una tecnología en la cual se da un tratamiento no térmico a un material, el cual consiste en aplicar pulsos eléctricos de alta intensidad que generalmente son de corta duración (menos de 1 segundo). El fenómeno que generan los pulsos eléctricos se llama electroporación, el cual es la ampliación o ruptura de los poros del material al que se le aplica este tratamiento.

Este trabajo de investigación tiene como objetivo general extraer antocianinas de la fresa con fluidos supercríticos dando un pre tratamiento a la materia prima con campos eléctricos pulsados, con la finalidad precisar si es posible tener una mejor eficiencia en el proceso de extracción y a su vez obtener un producto de mejor calidad que el obtenido mediante las metodologías de extracción con disolventes.

1. ANTECEDENTES

1.1. FRESA

La fresa (*Fragaria ananassa*) es un fruto de color rojo brillante y fragante que se obtiene de la planta que lleva su mismo nombre, la cual pertenece a la familia de las *Rosaceae*, nativas de Sudamérica y el este de Norteamérica. Su cultivo se lleva a cabo en diferentes tipos de suelo que van desde arenas del desierto que requieren riego extensivo hasta suelos arcillosos pesados que requieren un drenaje insuficiente y la adición de materia orgánica (Bauer *et al.*, 2019). Actualmente la producción mundial ha alcanzado los 9.1 millones de toneladas anuales, siendo China (3.7 millones de toneladas) el principal productor (FAO, 2017). Dentro de esta clasificación, México ocupa el tercer lugar (0.65 millones de toneladas), consolidándose como los principales productores los estados de Michoacán, Baja California, Guanajuato y el Estado de México (SAGARPA, 2017).

La fresa está compuesta por aproximadamente 90% de agua y 10% de sólidos solubles totales. Es una fuente de alto contenido de vitamina C (58.8 mg / 100 g de fruto fresco) lo cual representa el 95% de los requerimientos dietéticos diarios recomendados. Sus principales azúcares son la glucosa y la fructosa, que representan más del 80% de los azúcares totales y el 40% de los sólidos solubles presentes. El ácido orgánico primario es el ácido cítrico, que compone el 88% de los ácidos totales (Giampieri *et al.*, 2012). Otros elementos presentes son los componentes fitoquímicos representados principalmente por polifenoles, los cuales son productos del metabolismo de las plantas y cumplen muchas funciones esenciales para el crecimiento y supervivencia de las mismas. Los principales polifenoles encontrados en la fresa son los flavonoides, los taninos y los ácidos fenólicos (Aaby *et al.*, 2012).

El consumo de fresa se ha ido incrementando en todo el mundo, convirtiéndose en un elemento importante dentro de la dieta debido a su alto contenido de nutrientes esenciales y fitoquímicos beneficiosos, que parecen tener una actividad biológica relevante en la salud humana (Hannum, 2004; Forbes *et al.*, 2014; Forbes *et al.*, 2016). Estudios epidemiológicos han sugerido que el consumo de fresa se correlaciona con un riesgo reducido de enfermedades coronarias (Alvarez *et al.*, 2014), accidente cerebrovascular (Seeram, 2008), ciertos tipos de cáncer (Larrosa *et al.*, 2006; Zunino *et al.*, 2012) y envejecimiento (Meyers *et al.*, 2003).

1.2. ANTOCIANINAS

Las antocianinas son un grupo importante de las sustancias llamadas flavonoides, que son pigmentos bioactivos solubles en agua. Estos compuestos se encuentran presentes en plantas, vegetales y frutas donde son responsables de los colores brillantes incluidos el rojo, el azul y el púrpura principalmente (Chung *et al.*, 2015).

En la naturaleza encontramos a las antocianinas en forma de glucósidos, teniendo una estructura molecular compuesta por un núcleo conocido como antocianidina, que consta de 2 anillos de benzoilo (anillos A y B) y un anillo heterocíclico (anillo C), los cuales en conjunto forman un esqueleto de 15 carbonos (Figura 1.1) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

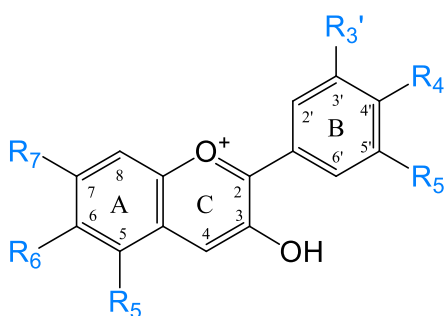


Figura 1.1. Estructura general de antocianinas

Hasta la fecha han sido identificadas 27 antocianidinas, de las cuales surgen más de 700 estructuras de antocianinas (Sui *et al.*, 2018). En la Tabla 1.1 se muestran las 6 principales antocianidinas que han sido objeto de estudio por la mayoría de los investigadores debido a que de ellas se obtienen más del 90% de las antocianinas conocidas actualmente (Kong *et al.*, 2003).

Antocianidina	R ₅	R ₆	R ₇	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}
Pelargonidina	OH	H	OH	H	OH	H
Cianidina	OH	H	OH	OH	OH	H
Delfinidina	OH	H	OH	OH	OH	OH
Peonidina	OH	H	OH	OCH ₃	OH	H
Petunidina	OH	H	OH	OH	OH	OCH ₃
Malvidina	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃

Tabla 1.1. Principales antocianidinas

Generalmente las antocianinas presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y 5 que incrementan su solubilidad. Los principales grupos glicosidantes son la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa (Williams *et al.*, 2004).

Las principales fuentes de antocianinas en la dieta humana son las frutas y verduras, llamadas, berries (arándanos, fresas, moras, arándanos, entre otros). En la fresa se han identificado distintas antocianinas, siendo la más representativa la pelargonidina-3-glucosido (Figura 1.2), la cual se encuentra en cantidades que va del 89 al 95% en peso del total de estos compuestos (De Pascual-Teresa *et al.*, 2008).

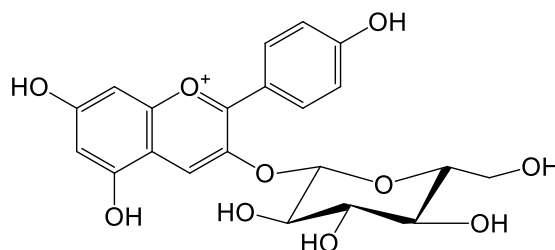


Figura 1.2. Estructura de la pelargonidina-3-glucosido

En la industria alimentaria, las antocianinas se han vuelto muy populares debido a que son utilizadas como colorantes naturales en la elaboración de diferentes productos (Izabela *et al.*, 2004). En el campo de la medicina se han asociado con una amplia variedad de beneficios para la salud, como antioxidante (Halvorsen *et al.*, 2006), antiinflamatorio (Edirisinghe *et al.*, 2011), anticancerígeno (Burton *et al.*, 2010) y antitrombotico (Ellis *et al.*, 2011).

1.2.1. EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS

La extracción es una operación de separación por transferencia de masa en la que se ponen en contacto dos fases inmiscibles o parcialmente miscibles, en continuo o discontinuo, con objeto de transferir uno o varios componentes de una fase a la otra de diferente composición (Paes *et al.*, 2014).

Cuando se realiza la extracción de compuestos a partir de materiales vegetales se consideran distintos factores que tienen una influencia significativa en el proceso como lo son la naturaleza química, el método de extracción empleado, el tamaño de partícula de la muestra, tiempo y condiciones de almacenamiento, así como la presencia de sustancias interferentes (Selvamuthukumar, 2017).

Para la extracción de antocianinas se han utilizado distintos métodos, más comúnmente mediante el uso de disolventes, lo cual ha sido de gran aceptación en la mayoría de los casos debido a las facilidades que otorgan estas metodologías (Cavalcanti *et al.*, 2012). Adicionalmente el uso de nuevas tecnologías ha despertado el interés de los usuarios en las técnicas de extracción como parte de la llamada “Química Verde”, esto con la finalidad de minimizar el uso de disolventes que generen residuos que puedan ser poco amigables al medio ambiente, así como también obtener extractos de mayor calidad, una de estas técnicas es la extracción mediante fluidos supercríticos (Chemat *et al.*, 2012).

1.2.1.1. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES (ED)

Este tipo de extracción consiste en poner en contacto el material vegetal que contiene a las antocianinas con un disolvente orgánico durante un periodo de tiempo. Esta operación se basa en las diferencias de solubilidad que hay entre los componentes de la mezcla que están en contacto.

La polaridad de las antocianinas juega un papel importante debido a que de esto dependerá su afinidad para solubilizarse en un determinado disolvente. Metanol, etanol, acetona, agua, acetato de etilo, propanol, dimetilformamida y sus combinaciones son frecuentemente utilizados en esta extracción (Antolovich *et al.*, 2000).

Los tiempos de extracción usualmente van desde 1 min hasta 24 h. Periodos más largos a los antes mencionados, aumentan la posibilidad de oxidación de las antocianinas a menos que se agreguen agentes reductores al proceso (Naczki *et al.*, 2004).

1.2.1.2. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (EFSC)

Un fluido supercrítico es una sustancia cuyas condiciones de presión y temperatura se encuentran por arriba de sus valores críticos (P_c y T_c) (Brunner, 2005). A esas condiciones la sustancia existe como una sola fase presentando propiedades tanto de un líquido como de un gas (Figura 1.3) (Týskiewicz *et al.*, 2018).

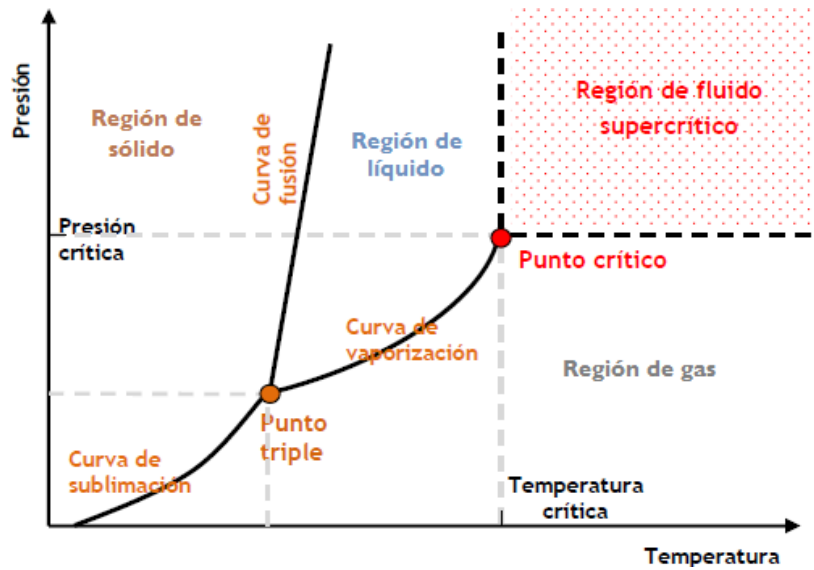


Figura 1.3. Diagrama de fases de un fluido supercrítico

Los fluidos supercríticos presentan propiedades importantes que los caracterizan (Sapkale *et al.*, 2010), como lo son:

- ✓ Pueden provocar reacciones que son difíciles o incluso imposibles de lograr en los disolventes convencionales.
- ✓ Tienen un poder solvente similar a los hidrocarburos ligeros para la mayoría de los solutos. Sin embargo, los compuestos fluorados son a menudo más solubles en CO₂ supercrítico que en hidrocarburos, esta mayor solubilidad es importante para la polimerización.
- ✓ Su solubilidad aumenta al aumentar la densidad (es decir, al aumentar la presión).
- ✓ Son comúnmente miscibles con gases permanentes (por ejemplo, H₂ o N₂) y esto conduce a concentraciones mucho más altas de gases disueltos que las que se pueden lograr con los disolventes orgánicos.

En comparación con sustancias en estado líquido y gaseoso presentan diferencias en propiedades como densidad, difusividad y viscosidad (Tabla 1.2) (Ibáñez *et al.*, 2015).

Estado	Densidad (g / cm ³)	Difusividad (cm ² / s)	Viscosidad (g / cm s)
Gas P= 1 atm, T= 15 - 30°C	(0.6 - 2.0) x 10 ⁻³	0.1 - 0.4	(0.6 - 2.0) x 10 ⁻⁴
Líquido P= 1 atm, T= 15 - 30°C	0.6 - 1.6	(0.2 - 2.0) x 10 ⁻⁵	(0.2 - 3.0) x 10 ⁻²
Fluido supercrítico P= P _c , T= T _c	0.2 - 0.5	0.7 x 10 ⁻³	(1.0 - 3.0) x 10 ⁻⁴
P= 4P _c , T= T _c	0.4 - 0.9	0.2 x 10 ⁻³	(3.0 - 9.0) x 10 ⁻⁴

Tabla 1.2. Comparación de propiedades de los fluidos supercríticos

En la (Tabla 1.3) se muestran algunos compuestos que son utilizados como fluidos supercríticos (Wen *et al.*, 2009).

Compuesto	T _c (°C)	P _c (Bar)
Dióxido de carbono	31.1	73.8
Agua	374.1	221.2
Metano	-82.8	46
Etano	32.1	48.7
Propano	96.7	42.5
Metanol	239.5	80.9
Etanol	240.8	61.4
Acetona	235	47

Tabla 1.3. Fluidos supercríticos más utilizados

El dióxido de carbono (CO₂) es el fluido supercrítico que más se utiliza, esto debido a que permite realizar operaciones supercríticas a presiones bajas y temperaturas cercanas a las ambientales. Además, es un compuesto seguro, está altamente disponible y tiene un bajo costo (Reverchon *et al.*, 2006).

La extracción de antocianinas por fluidos supercríticos se lleva a cabo a partir de una fuente vegetal ya sea sólida o líquida, la cual se coloca en una celda de extracción a la que se bombea el fluido supercrítico en fase gaseosa y ambos se dejan en contacto durante un determinado tiempo a condiciones supercríticas de presión y temperatura (Manjare *et al.*, 2019).

El proceso puede llevarse a cabo de forma estática o dinámica. En la forma estática, la celda de extracción es presurizada con el fluido manteniendo cerrada la válvula de salida del extractor, una vez finalizada la extracción, dicha válvula se abre, pasando el fluido con los analitos extraídos a una celda de colección. En el modelo dinámico, el fluido supercrítico se deja pasar en forma continua a través de la celda de extracción, manteniéndose las válvulas de entrada y salida del extractor abiertas durante todo el proceso (Mokhtari *et al.*, 2019).

En la extracción supercrítica se puede adicionar un co-solvente, el cual es generalmente un disolvente orgánico, esto con la finalidad de promover aún más la extracción. Las condiciones de presión y temperatura a utilizar, así como el tiempo de contacto varían dependiendo de la fuente vegetal que se utilice, en distintas investigaciones ya se han reportado datos que sirven como referencia a estas cuestiones (Tabla 1.4) (Lang, 2001; Sovová, 2012).

Fuente	T (°C)	P (bar)	t (min)	Referencia
Arandano	40	200	-	(Paes <i>et al.</i> , 2014)
Champiñon	48	210	10 - 80	(Bhattacharya <i>et al.</i> , 2014)
Grosella	35-55	81 - 261	360	(Santos <i>et al.</i> , 2015)
Hierbabuena	60	200	60	(Bimakr <i>et al.</i> , 2011)
Lavanda	40	120	-	(Costa <i>et al.</i> , 2012)
Pimienta negra	40	300	30 - 40	(Bagheri <i>et al.</i> , 2014)
Uva roja	45	160	30	(Ghafoor <i>et al.</i> , 2010)
Uva verde	40	80	180	(Da Porto <i>et al.</i> , 2014)
Zarzamora	40 - 60	150 - 250	57	(Pasquel Reátegui <i>et al.</i> , 2014)

Tabla 1.4. Condiciones de extracción con CO₂ supercrítico de algunas fuentes vegetales

1.2.1.2.1. COEFICIENTE DE REPARTO Y PROPIEDADES TERMODINÁMICAS

La determinación de propiedades termodinámicas es de gran importancia en los procesos debido a que nos dan una descripción del tipo de proceso que se está llevando a cabo, así como las magnitudes de energía que se requieren para que este sea posible. En los procesos de extracción supercrítica estas propiedades pueden obtenerse en base a modelos termodinámicos ya establecidos tomando en cuenta que se presenta una etapa de equilibrio.

El coeficiente de reparto es un parámetro cuantitativo que representa una constante de equilibrio entre la distribución que se da de una sustancia determinada en un sistema compuesto por dos fases inmiscibles entre sí. Este coeficiente depende de la temperatura, así como de la naturaleza de las fases y la sustancia involucrados (Fujii *et al.*, 2019).

En la extracción supercrítica la distribución en el equilibrio se da entre el material que contiene la sustancia a extraer (solute) y el fluido supercrítico (solvente). Dicha distribución o reparto se basa en los principios fundamentales de la Ley de Nernst la cual se basa en tres principios fundamentales (Nilsson *et al.*, 1992):

- a) El reparto se debe efectuar a temperatura constante durante todo el proceso
- b) No debe producirse ninguna reacción química entre ninguno de los componentes del sistema
- c) Las disoluciones deben ser diluidas

Cumpliendo con los postulados anteriores se puede calcular el coeficiente de reparto como:

$$K = \frac{C_1}{C_2} \quad (1.1)$$

Donde K es el coeficiente de reparto, C_1 y C_2 son las concentraciones de soluto en las fases 1 y 2 respectivamente.

En base al coeficiente de reparto se pueden calcular otras propiedades termodinámicas del proceso de extracción supercrítica como la energía libre de Gibbs, la cual nos indica el criterio de espontaneidad del proceso. Esta energía se puede calcular a través de la ecuación (1.2) que surge del modelo termodinámico de Gibbs-Helmholtz (Machida *et al.*, 2011).

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (1.2)$$

Donde ΔG^0 es la energía libre de Gibbs, K es el coeficiente de reparto, T es la temperatura absoluta y R es la constante universal de los gases.

Adicionalmente se puede obtener la entalpia y la entropía del proceso de equilibrio a partir del coeficiente de reparto mediante el modelo termodinámico de Van't Hoff mediante de una línea de regresión de un gráfico de $\ln K$ vs $1/T$ (Figura 1.4) (John *et al.*, 2009).

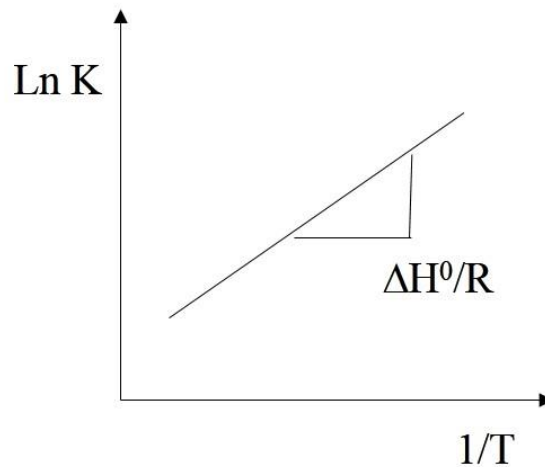


Figura 1.4. Grafica de $\ln K$ vs $1/T$

De la forma de la ecuación obtenida $y = ax+b$, los valores de a y b corresponden a:

$$a = \frac{\Delta H^0}{R} \quad (1.3)$$

$$b = \frac{\Delta S^0}{R} \quad (1.4)$$

Donde ΔH^0 es la entalpia, ΔS^0 es la entropía y R es la constante de los gases.

1.2.1.2.2. SOLUBILIDAD

Un parámetro importante en el proceso de extracción supercrítica es la solubilidad, la cual se define como la concentración de una sustancia dada que puede disolverse en un fluido supercrítico. Además de la temperatura y la presión a las que se encuentra el fluido, las

propiedades del soluto, particularmente la masa molecular, la polaridad y la presión de vapor, afectan la solubilidad (Garlapati *et al.*, 2009).

Cuando se trabaja con fluidos supercríticos como disolventes de extracción, la capacidad para obtener la solubilidad de compuestos en el fluido supercrítico es crucial para determinar las condiciones a las que se lleva a cabo el proceso de extracción. Aunque existen varios métodos para determinarla, como las ecuaciones de estado, estas aproximaciones no siempre son fáciles de aplicar debido a que se requieren los parámetros críticos del soluto, que generalmente no se encuentran disponibles en la literatura, así como la determinación de los parámetros de interacción soluto-disolvente los cuales solo pueden ser evaluados a partir de datos experimentales (Sparks *et al.*, 2008).

Debido a lo anterior, (Chrastil, 1982) ideó un modelo donde se asume que en el equilibrio una molécula de soluto se asocia con un número fijo de moléculas de disolvente dando lugar a la formación del solvato-complejo cuya estructura es constante en todo el rango de presiones y depende solo de la temperatura. Este modelo consiste en una ecuación sencilla que relaciona la solubilidad con la densidad del fluido supercrítico que se emplea como disolvente.

Posteriormente se realizó una modificación al modelo de Chrastil, introduciendo en la ecuación una dependencia del número de asociación k (el número promedio de moléculas de CO_2 en el complejo de solvatación) con la densidad, mejorando así el ajuste de los resultados experimentales.

1.3. CAMPOS ELÉCTRICOS PULSADOS (PEF)

El desarrollo de la tecnología de los campos eléctricos (PEF) para aplicaciones de procesamiento no térmico de alimentos ha sido uno de los principales campos de investigación en los últimos años.

Esta tecnología consiste en la aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad a un material colocado en una cámara de tratamiento confinada entre 2 electrodos, en la cual la duración de los pulsos generalmente es de ms o μs (Soliva-Fortuny *et al.*, 2009).

Diversas investigaciones en el sector alimenticio han demostrado varias aplicaciones de los PEF como un tratamiento para mejorar la extracción intracelular de metabolitos (Ade-Omowaye *et al.*, 2000; Fincan *et al.*, 2004), mejorar la eficiencia de secado (Taiwo *et al.*, 2002),

modificar la actividad enzimática (Giner *et al.*, 2002; Yeom *et al.*, 2000), preservar ingredientes alimenticios (Jia *et al.*, 1999) y producir metabolitos secundarios induciendo reacciones de estrés en sistemas de plantas (Guderjan *et al.*, 2005).

Para la extracción de antocianinas, los PEF sirven como un pre tratamiento al material vegetal del cual se obtienen dichos componentes, generando un fenómeno intracelular llamado electroporación (Cholet *et al.*, 2014; El Kantar *et al.*, 2018).

La electroporación es un proceso que consiste en la ampliación o ruptura de los poros de una membrana vegetal debido a la aplicación de un potencial eléctrico de alta intensidad (Haberl *et al.*, 2013) (Figura 1.5). Este proceso hace que los materiales celulares dentro de la membrana queden más expuestos a los disolventes utilizados en la extracción haciendo que se transporten más fácilmente (Son *et al.*, 2014).

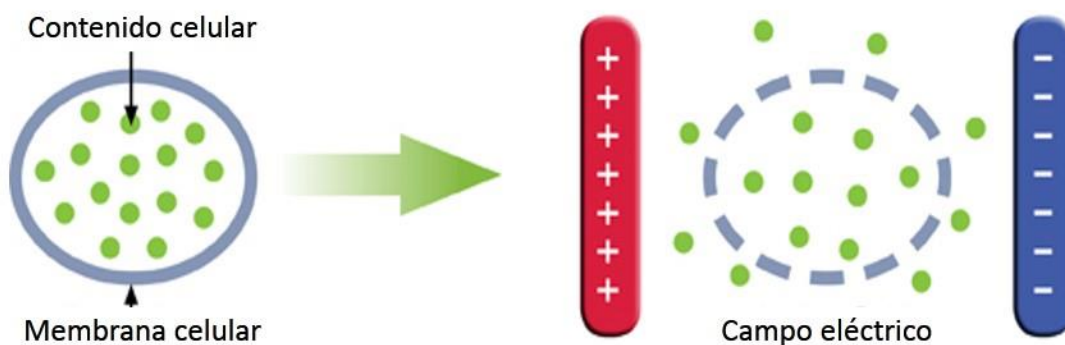


Figura 1.5. Fenómeno de electroporación

La cantidad de potencial eléctrico aplicado depende del uso de los PEF, todo esto basado en investigaciones que se han realizado en años recientes, en el caso específico de la extracción de antocianinas se ha determinado aplicar un rango de voltaje óptimo de 0.2 a 1.0 kV / cm en periodos cortos de tiempo de 10 μ s (Donsì *et al.*, 2010). En la (Tabla 1.5) se muestran las condiciones de operación del equipo de PEF utilizadas en investigaciones previas para la extracción de algunos compuestos de distintas fuentes vegetales.

Componente extraído	Fuente vegetal	Condiciones de tratamiento	Referencia
Aceite	Aceituna	0.7 kV / cm 30 pulsos	(Guderjan <i>et al.</i> , 2005)
Betalainas	Betabel	1 kV / cm 20 pulsos	(Fincan <i>et al.</i> , 2004)
Isoflavonoides	Soja	1.3 kV / cm 50 pulsos	(Guderjan <i>et al.</i> , 2005)
Jugo y antocianinas	Uva	3 kV / cm 50 pulsos	(Bozinou <i>et al.</i> , 2019)
Polifenoles	Uva	0.5 kV / cm 50 pulsos	(Cholet <i>et al.</i> , 2014)
Sacarosa	Caña de azúcar	1.2 – 2.5 kV / cm 1 – 200 pulsos	(Eshtiaghi <i>et al.</i> , 2002)
Vitamina C	Pimiento rojo	2 kV / cm 1 – 50 pulsos	(Ade-Omowaye <i>et al.</i> , 2003)

Tabla 1.5. Condiciones de operación de PEF para la extracción de distintos tipos de compuestos

1.3.1. ENERGÍA EN EL PROCESO DE PEF

La cantidad de energía utilizada es un factor importante a considerar desde el diseño hasta la operación de un proceso, en el caso del pre tratamiento con campos eléctricos pulsados esta no es la excepción debido a que de esto dependerá su eficiencia de acuerdo al tipo y a la cantidad de muestras a tratar, así como de los tiempos de procesamiento que estas requieran (Elez-Martínez *et al.*, 2007).

De acuerdo a (Jaeger *et al.*, 2010) en el proceso de PEF, la energía eléctrica se aplica a los medios de tratamiento y la cantidad de energía suministrada por pulso único (energía de pulso) se puede calcular en función del voltaje y la corriente eléctrica.

$$W_{pulse} = \int U(t) \cdot I(t) \cdot dt \quad (1.5)$$

Donde W_{Pulse} (J) es la cantidad de energía por pulso, I (A) es la intensidad de corriente.

Dependiendo el número de pulsos aplicados a una cantidad de producto, se puede calcular el aporte de energía específica total de acuerdo al siguiente modelo:

$$W_{Spec} = \frac{f}{\dot{m}} \cdot W_{Pulse} \quad (1.6)$$

Donde W_{Spec} (J / mol) es la energía total aplicada, f (s^{-1}) es la frecuencia, m (kg / h) es el flujo másico y W_{Pulse} (J) es la energía aplicada por pulso eléctrico.

La energía específica total suministrada se considera como un parámetro clave para describir la intensidad del tratamiento ya que permite una estimación del aumento de temperatura que ocurre durante este proceso (Jaeger *et al.*, 2012).

1.4. CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS

1.4.1. CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS

El color y la estabilidad de las antocianinas experimentan cambios por diversos factores del medio en el que se encuentren como lo son el pH, la temperatura, la luz, el oxígeno, las enzimas y la asociación inter e intramolecular con otros compuestos como los ácidos ascórbicos, iones metálicos, azúcares y proteínas (Takeoka *et al.*, 2002).

Las antocianinas son particularmente sensibles al pH y muestran un cambio reversible de color de rojo a azul cuando el pH cambia de ácido a básico (Figura 1.6). Este fenómeno puede explicarse por su existencia en equilibrio en solución acuosa con pH entre 1 y 7 con al menos 4 formas diferentes que se convierten a través del equilibrio dependiente del pH, como el catión flavilio (naranja a púrpura) la base carbinol (incolora), la chalcona (incolora) y la base quinoidal (azul) (He *et al.*, 2010).

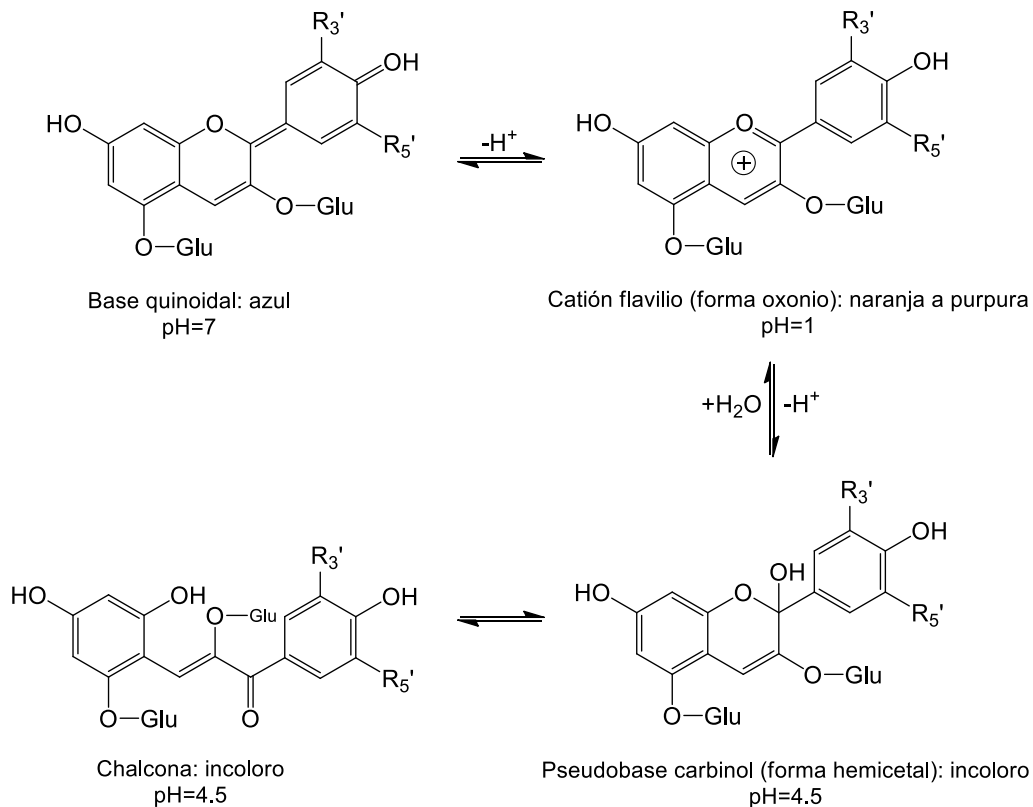


Figura 1.6. Cambios en la estructura de las antocianinas debido al pH

(Giusti *et al.*, 2005) desarrollaron el método de pH diferencial para determinar la concentración de antocianinas en una muestra. Este método se basa en la transformación que sufre la antocianina debido al cambio de pH lo que conlleva a un llamativo cambio en la absorbancia, para ello se somete la muestra a una solución acuosa con pH de 1 y otra con pH de 4.5, en donde predominan la forma oxonio y hemiacetal respectivamente, en las cuales se presentan diferencias significativas como lo es el color entre ambas muestras.

El pH diferencial es un método que permite una rápida y exacta medida de la cantidad de antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos degradados polimerizados y de otros compuestos interferentes (Lee *et al.*, 2008).

1.4.2. COLORIMETRÍA

Dado que el color es un parámetro crítico de calidad en los alimentos, debido a su influencia en la aceptación del consumidor, su medición ha llamado la atención de los científicos de

alimentos y la industria (De Oliveira Alves *et al.*, 2008). En el caso de las antocianinas es de gran interés la evaluación del color ya que una de sus principales aplicaciones es servir como colorantes naturales.

La medición de color se puede realizar utilizando distintos equipos entre los que se encuentran principalmente colorímetros, espectrofotómetros y densitómetros, sin embargo, las cantidades medidas deben ser expresadas en base a sistemas o modelos con la finalidad de estandarizar (Torskangerpoll *et al.*, 2005).

Varios sistemas para expresar el color numéricamente han sido desarrollados por una organización internacional interesada en temas de iluminación y color, la Comisión Internacional de Iluminación (CIE). Uno de los más conocidos de estos sistemas es el espacio de color $L^* a^* b^*$ (también conocido como CIELAB) creado en 1976 (CIE Standard, 2008). En este espacio como se muestra en la (Figura 1.7). L^* indica la luminosidad, su valor va de 0 (negro) a 100 (blanco). Las letras a^* y b^* indican las direcciones del color: $+a^*$ es la dirección del rojo, $-b^*$ es la dirección del verde, $+b^*$ es la dirección del amarillo y $-a^*$ es la dirección del azul. El origen es acromático, a medida que aumentan los valores de a^* y b^* el punto se aleja del centro por lo que aumenta la saturación del color.

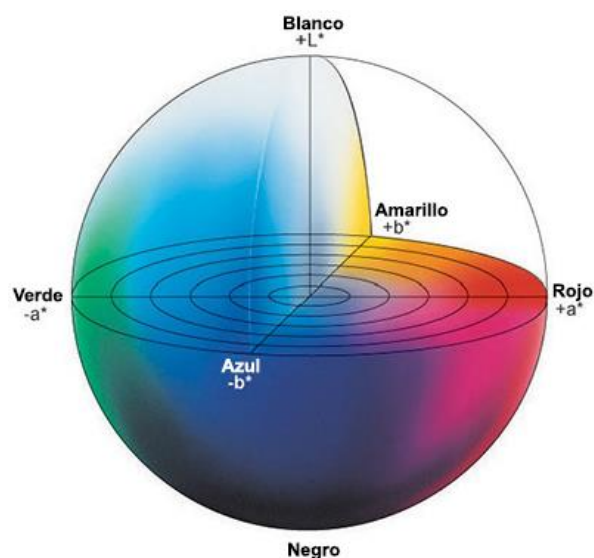


Figura 1.7. Sistema de color CIELAB

1.4.3. RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES

El rendimiento de las extracciones es un indicador importante de fácil acceso que nos da un panorama general acerca de la eficiencia del método utilizado. Este valor se puede obtener de forma sencilla relacionando la cantidad de extracto obtenido con la cantidad de materia prima utilizada.

1.4.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

La espectroscopia de infrarrojo es una técnica que se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorbe la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente es igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula (Kanou *et al.*, 2017). Existen 2 tipos básicos de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre 2 átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces (Zara, 2017). En la (Figura 1.8) se muestran los diferentes tipos de vibraciones moleculares.

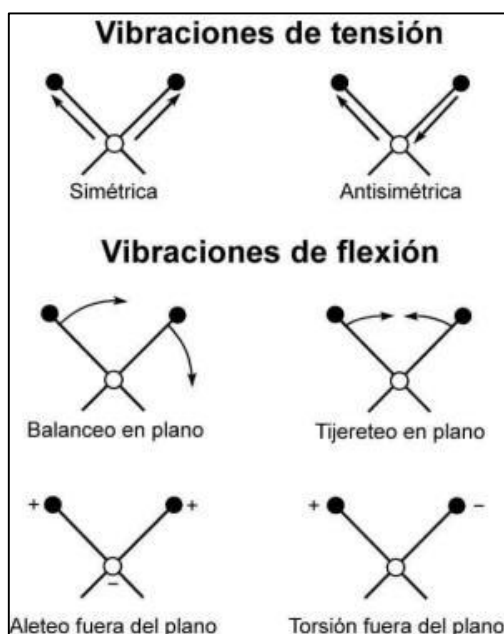


Figura 1.8. Tipos de vibraciones moleculares

La espectroscopia de infrarrojo se utiliza para estudiar una amplia gama de tipos de muestras y puede ser llevada a cabo desde una simple prueba de identificación hasta un análisis profundo de espectro completo, cualitativo y cuantitativo (Larkin, 2011). Algunas de sus ventajas son que las muestras se pueden examinar a granel o en cantidades microscópicas en un amplio rango de temperaturas y estados físicos, es por esto que las evaluaciones de extractos como los de antocianinas se pueden analizar mediante esta técnica en su estado natural sin la necesidad de aplicar algún proceso para cambio de fase en el que pudieran verse afectados los compuestos de interés (Garrigues *et al.*, 2015).

El equipo básico utilizado para llevar a cabo esta técnica consiste en un espectrofotómetro IR y un accesorio de reflexión que generalmente cabe en el compartimento donde se coloca la muestra. El ATR (Attenuated Total Reflection) es una técnica de muestreo utilizada en el IR, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito (Fringeli, 2017).

2. JUSTIFICACIÓN

La utilización de fluidos supercríticos (FSC) como disolventes en operaciones de separación, preparación de materiales y reacciones homogéneas y heterogéneas son muchas de las aplicaciones que han despertado gran interés en el campo de la investigación. Desde el punto de vista industrial la tecnología de fluidos supercríticos ya ha alcanzado importantes aplicaciones en el campo de los alimentos, por sus excelentes propiedades disolventes y de transporte, que posibilitan la realización de los procesos en condiciones favorables, tanto desde el punto de vista del producto como desde un punto de vista medioambiental, satisfaciéndose varios postulados de la química “verde”. Durante mucho tiempo se ha buscado la seguridad microbiana de los alimentos junto con una conservación de sus propiedades. Sin embargo, la mayoría de las veces, la seguridad es acompañada con la pérdida de sus características nutricionales, de textura y sabor; es por esto que se recurre a tecnologías no térmicas como los campos eléctricos pulsados. Esta tecnología se emplea para la extracción de diversos compuestos como antioxidantes, antimicrobianos y colorantes, permitiendo mayores rendimientos de éstos. Las antocianinas son un grupo de pigmentos de color rojo, hidrosolubles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Son interesantes por dos razones, la primera por su impacto sobre las características sensoriales de los alimentos, las cuales pueden influenciar su comportamiento tecnológico durante el procesamiento de alimentos, y la segunda, por su implicación en la salud humana a través de diferentes vías. El presente trabajo tiene como objetivo general el extraer las antocianinas contenidas en la fresa por medio de fluidos supercríticos asistido por campos eléctricos pulsados y caracterizarlas, todo esto con la finalidad de analizar su factibilidad como un método alternativo que puede traer muchas ventajas y así proponerlo como un método que cumpla con las expectativas deseadas.

3. HIPÓTESIS

El % de rendimiento de la extracción es mayor con el uso de fluidos supercríticos asistido por campos eléctricos pulsados que con el uso de solventes.

4. OBJETIVOS

GENERAL

Extraer y caracterizar las antocianinas contenidas en la fresa por medio de fluidos supercríticos asistido por campos eléctricos pulsados.

ESPECÍFICOS

- Extraer las antocianinas mediante métodos alternativos de extracción.
- Determinar las propiedades termodinámicas del proceso de extracción por medio de fluidos supercríticos y por fluidos supercríticos asistido por campos eléctricos pulsados.
- Caracterizar las antocianinas extraídas.
- Determinar los datos colorimétricos de las antocianinas obtenidas de la fresa.
- Determinar el % de rendimiento de la extracción en cada uno de los métodos.

5. METODOLOGÍA

5.1. MATERIA PRIMA Y REACTIVOS

Se utilizó fresa adquirida con productores regionales de este fruto del municipio de Villa Guerrero, Estado de México, México (18°58'N 99°38'O).

Para el proceso de extracción supercrítica se utilizó dióxido de carbono (99.99%) puro el cual fue adquirido con la empresa Infra México S.A. de C.V. (Toluca, Estado de México, México).

Para el proceso de extracción por maceración y la metodología de cuantificación de antocianinas se utilizó metanol (99.8%), ácido clorhídrico (37%), cloruro de potasio (>99%) y acetato de sodio (>99%), todos estos reactivos fueron adquiridos con la compañía Sigma-Aldrich S.A. de C.V. (Toluca, Estado de México, México).

5.2. PREPARACIÓN DE MATERIA PRIMA

La fresa fresca fue seleccionada y lavada con agua a temperatura de 10 °C para eliminar impurezas y suciedades que pudiera contener. Posteriormente, los frutos limpios fueron cortados en rebanadas de 0.4 mm de espesor aproximadamente, esto con el objetivo de facilitar el secado de las muestras.

Secado de materia prima

El proceso de secado se realizó en 2 etapas, ultracongelamiento y liofilización.

En el ultracongelamiento, 600 grs de las muestras rebanadas fueron colocadas en 2 frascos de vidrio (Labconco 7540800) que fueron tapados con papel aluminio. Los vasos fueron depositados en un ultra congelador (Thermo Scientific Revco EXF) operando a -80°C durante 24 hrs.

En la liofilización, los frascos con las muestras congeladas fueron colocados en un equipo liofilizador (Labconco FreeZone) para extraer la cantidad de agua presente en las muestras mediante una presión de vacío de 0.02 mBar y una temperatura de -50°C.

La humedad de las muestras fue verificada pesándolas en una balanza analítica (Mettler Toledo AB204-S). Cuando las muestras aun presentaron humedad, los procesos de ultracongelamiento y liofilización fueron repetidos hasta que el contenido de agua de las muestras fue menor al 5%.

Finalmente, las muestras secas fueron molidas con un molino para café (MrCoffee BVMC-BMH23/26) y tamizadas con una malla 20 para homogenizar su tamaño.

5.3. CAMPOS ELÉCTRICOS PULSADOS (PEF)

La fresa seca fue procesada por lotes de 50 g en un equipo PEF, el cual consta de un generador de pulsos (Makita EG4550A) que a su vez está conectado a un osciloscopio (Owon Sds1022). La cámara de tratamiento está conectada al generador mediante 2 electrodos de acero inoxidable. El control de las condiciones de operación se realizó a través de un equipo de cómputo, el cual está en contacto con el osciloscopio y el generador de pulsos. La (Figura 1.9) muestra la representación del proceso.

A cada muestra se le aplicaron 3 pulsos de $10 \mu\text{s}$ con potenciales eléctricos de 0.5, 0.75 y 1.0 kV / cm.

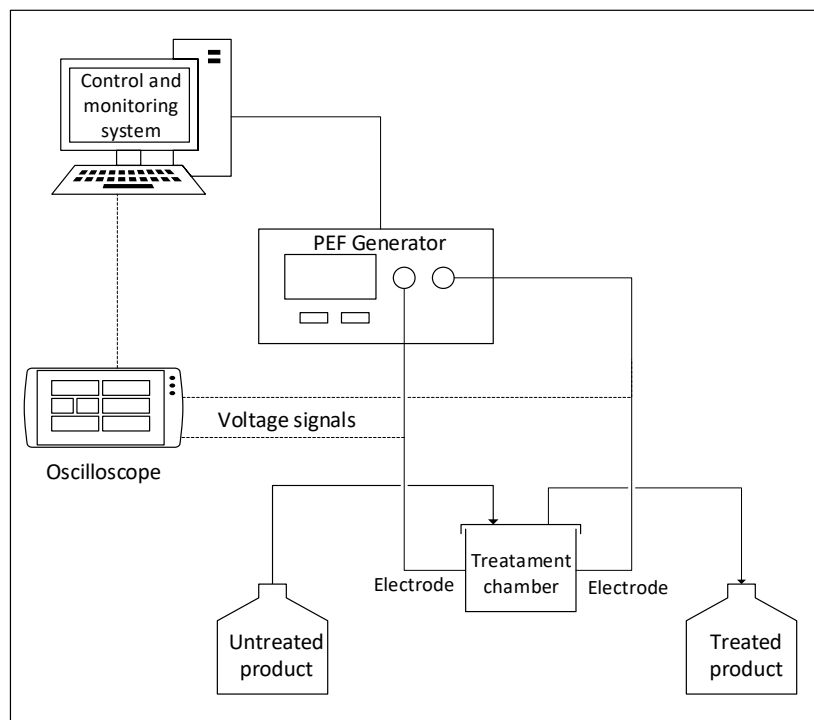


Figura 1.9. Pre tratamiento con campos eléctricos pulsados (PEF)

5.3.1. ENERGÍA EN EL PROCESO DE PEF

Para el proceso de pre tratamiento con campos eléctricos pulsados se determinó la cantidad de energía utilizada, para ello primero se obtuvo la cantidad de energía aplicada en cada pulso de acuerdo al modelo propuesto por (Jaeger *et al.*, 2010).

$$W_{Pulse} = U \cdot I \cdot \tau \quad (1.7)$$

Donde W_{Pulse} (J) es la cantidad de energía aplicada por pulso eléctrico, U (V) es el potencial eléctrico, I (A) es la intensidad de corriente y τ (s) es el tiempo de pulso. La intensidad de corriente eléctrica se puede obtener a partir de la ley de Ohm (1.8):

$$I = \frac{U}{R} \quad (1.8)$$

Donde R (Ω) es la resistencia, en nuestro sistema la resistencia fue de 3.6Ω de acuerdo a la especificación técnica del equipo utilizado. A partir de la cantidad de energía de cada pulso se pudo calcular la energía total aplicada en cada pre tratamiento, esto mediante la ecuación (1.9):

$$W_{Spec} = \frac{f}{m} \cdot W_{Pulse} \quad (1.9)$$

Donde W_{Spec} (J / mol) es la energía total aplicada, f (s^{-1}) es la frecuencia, m (kg / h) es el flujo másico y W_{Pulse} (J) es la energía aplicada por pulso eléctrico. La frecuencia se obtuvo mediante la ecuación (1.10) (Jaeger *et al.*, 2010):

$$f = \frac{n}{t_{res}} \quad (1.10)$$

Donde n es el número de pulsos aplicados y t_{res} (s) es el tiempo de residencia de la muestra en el equipo.

5.4. EXTRACCIONES

El proceso de extracción se llevó a cabo utilizando muestras con y sin pre-tratamiento de campos eléctricos pulsados mediante 2 metodologías: extracción por maceración y extracción con CO_2 supercrítico.

5.4.1. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES (ED)

De acuerdo a estudios realizados se ha demostrado que, para la extracción de antocianinas de la fresa, el metanol acidificado ha dado buenos resultados como disolvente en este tipo de extracciones (González-Paramás *et al.*, 2006).

Se colocaron 10 g de fresa seca en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, posteriormente se agregarán 60 ml de metanol (con HCl al 0.1% v/v) y se dejó durante 24 hrs a 5°C. Transcurrido este tiempo la muestra se filtró a vacío con un embudo Buchner. El filtrado obtenido se secó a 65°C utilizando un rotovapor (Buchi R-215) hasta obtener un peso constante. Para pesar el producto obtenido se utilizó una balanza analítica (Mettler Toledo AB204-S).

5.4.2. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (EFSC)

Antes de realizar los experimentos, se plantearon las condiciones de operación del equipo para este proceso de acuerdo a las propiedades del CO₂ y del soluto a extraer.

Se seleccionó el rango de temperatura de 40-60°C y de presión de 100-200 bar debido a que se encuentran por arriba de las condiciones críticas del CO₂, además de que no se tiene el riesgo de degradación de las antocianinas dentro de estos rangos.

La (Figura 1.10) muestra la representación esquemática del equipo utilizado para este proceso.

En la celda de extracción se colocaron 50 grs de muestra seca. La celda se conectó a una línea de tuberías y se dejó dentro de la cámara de acondicionamiento. Se hizo pasar CO₂ contenido en el tanque a través de las líneas para desplazar el aire en las tuberías y en la celda de extracción. El CO₂ se comprimió utilizando una bomba de alta presión. Posteriormente se hizo pasar el CO₂ comprimido a la celda de extracción hasta que se alcanzó la presión experimental deseada, la cual se obtuvo a través de un sensor (Honeywell GM) y medidor de presión. La cámara de acondicionamiento cuenta con 2 fuentes de calor con las cuales se alcanzó la temperatura deseada, la cual se registró con un medidor de temperatura (Honeywell DC). Cuando la presión y la temperatura se mantuvieron estables, se dejó en contacto la muestra seca con el CO₂ dentro de la celda durante 24 hrs. Una vez transcurrido el tiempo de contacto, se liberó el CO₂ de la celda abriendo una válvula de calefacción micrométrica. En esta etapa del

proceso el extracto de fresa fue arrastrado a través del CO₂ y se recolectó en una celda de recuperación. El extracto obtenido fue pesado en una balanza analítica (Mettler Toledo AB204-S) para su cuantificación.

Siguiendo la metodología descrita en este apartado, se realizaron distintos experimentos a 100, 150 y 200 Bar de presión y 40, 50 y 60 °C de temperatura, considerando que estas son condiciones supercríticas del CO₂, ya que se encuentran por encima de su punto crítico (73.8 Bar y 31.1°C).

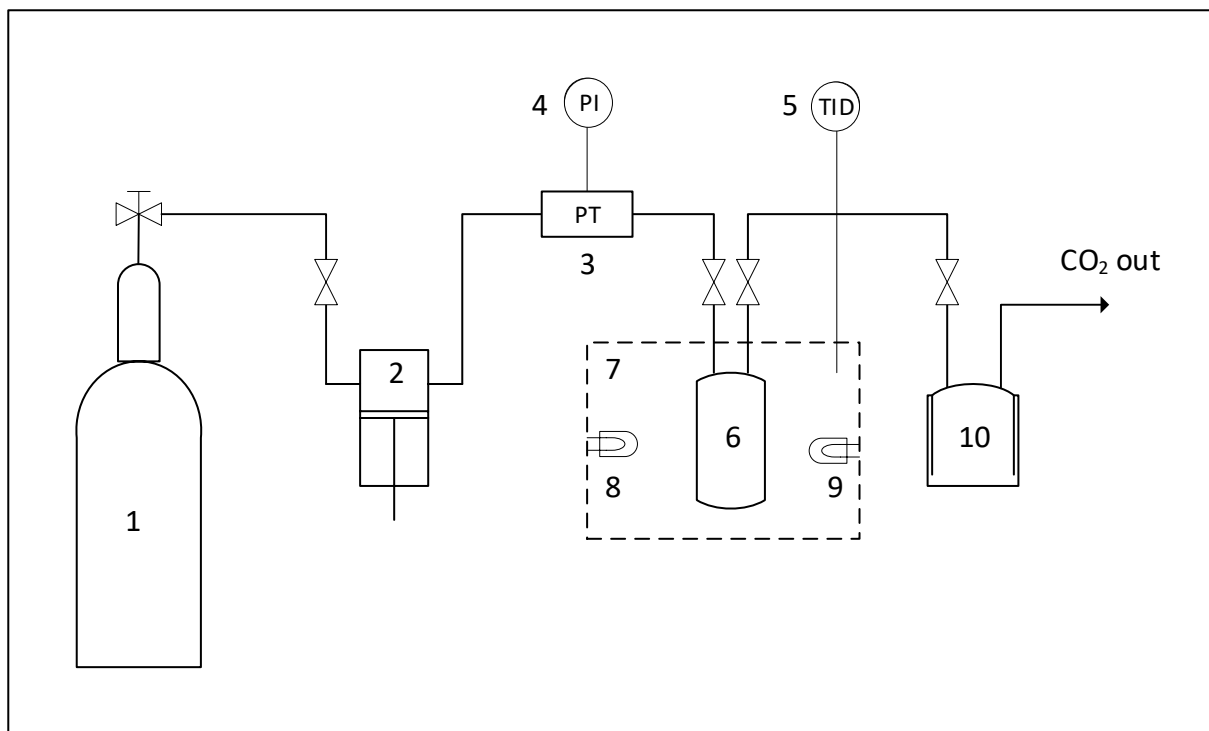


Figura 1.10. Proceso de extracción con CO₂ supercrítico. (1) Tanque de CO₂, (2) Bomba de alta presión, (3) Sensor de presión, (4) Medidor de presión, (5) Medidor de temperatura, (6) Celda de extracción, (7) Cámara de acondicionamiento, (8,9) Fuentes de calor, (10) Celda de recuperación

5.4.2.1. COEFICIENTE DE REPARTO Y PROPIEDADES TERMODINÁMICAS

El coeficiente de reparto se calculó de acuerdo a la ecuación que representa la ley de distribución:

$$K_D = \frac{m_{oe}}{m_{or}} \quad (1.11)$$

Donde m_{oe} es la masa del extracto de fresa contenida en el CO_2 , m_{or} es la masa del resto de extracto de fresa en la materia prima molida. En este procedimiento se consideró como la máxima cantidad de extracto a la obtenida en ME.

Las propiedades termodinámicas del proceso de extracción se calcularon utilizando los valores obtenidos del coeficiente de distribución. Para determinar la energía libre de Gibbs se utilizó la ecuación del modelo de Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_D \quad (1.12)$$

Donde K_D es el coeficiente de distribución o de reparto, ΔG^0 (J / mol) es la energía libre de extracción, T (K) es la temperatura absoluta y R es la constante universal de los gases (8.314 J / mol K). El valor de K_D puede ser expresado en términos de ΔH^0 (J / mol) y ΔS^0 (J / mol K).

La entalpía y entropía se calcularon a través de la ecuación de Van't Hoff:

$$\ln K_D = \frac{\Delta H^0}{R} \left(\frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (1.13)$$

Los valores de ΔH^0 y ΔS^0 se obtuvieron a partir de la pendiente y de la intersección de la ordenada de una gráfica de $\ln K_D$ vs. $1/T$.

5.4.2.2. SOLUBILIDAD

Se calcularon las solubilidades experimentales de cada uno de los extractos obtenidos en la extracción con CO_2 supercrítico mediante la siguiente ecuación:

$$S = \frac{M_E}{M_E + M_{\text{CO}_2}} \quad (1.14)$$

Donde M_E es la masa de extracto obtenido en (g) y M_{CO_2} es la masa de CO_2 en (g) utilizada en el proceso.

A partir de las solubilidades experimentales se determinaron las solubilidades calculadas de acuerdo a las condiciones de operación del proceso de extracción, esto se realizó aplicando el modelo de Chrastil modificado el cual se adapta al equilibrio sólido-fluido que se presenta en el proceso.

$$\ln S = k \cdot \ln d + \frac{a}{T} + b \quad (1.15)$$

Donde S es la solubilidad expresada como fracción de masa (w / w), T es la temperatura en (K), el número de asociación k es el número promedio de moléculas de disolvente en el complejo solvatado; a depende del calor de solvatación y vaporización del soluto, y b está en función de k y depende también de peso molecular del soluto y el fluido supercrítico

La comparación entre los datos de solubilidad experimentales y calculados se determinó mediante el promedio de las desviaciones relativas absolutas (AARD).

$$AARD = \frac{1}{n} \sum \frac{|S^{cal} - S^{exp}|}{S^{exp}} \quad (1.16)$$

Donde n es el número de datos, S^{cal} es la solubilidad calculada mediante la ecuación (1.15) y S^{exp} es la solubilidad experimental obtenida con la ecuación (1.14).

5.5. CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS

5.5.1. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS TOTALES

Se realizó el método de pH diferencial descrito por (Giusti *et al.*, 2005) para calcular la concentración de antocianinas totales de cada uno de los extractos obtenidos. La antocianina a seguir fue la pelargonidina-3-glucosido, la cual es la más representativa y de mayor interés de los extractos de fresa.

Primero se prepararon 2 soluciones buffer, la primera de ellas de cloruro de potasio 0.025M/HCl con pH=1, la segunda fue una solución de acetato de sodio 0.4M/HCl con pH=4.5, para medir el pH de cada una de estas soluciones se utilizó un potenciómetro (Conductronic pH 120).

Posteriormente se prepararon soluciones de los extractos obtenidos en cada uno de los métodos con el fin de determinar el factor de dilución a utilizar, para ello se tomó una muestra de cada extracción y se disolvió en 10 ml de la solución de cloruro de potasio 0.025M/HCl; la cantidad de extracto utilizado para preparar esta solución se determinó tomando en consideración que la absorbancia medida fuera menor a 1.2. Con el factor de dilución obtenido se tomaron dos muestras de cada extracto y se prepararon soluciones con los buffers de cloruro de potasio y acetato de sodio. De cada solución obtenida se midieron 2 absorbancias en un espectrofotómetro

UV-Vis (Thermo Scientific UV-Vis 10), una a 496 nm y la otra a 700 nm. El cálculo de las absorbancias y el total de antocianinas se obtuvieron mediante las ecuaciones (1.17) y (1.18).

$$A = (A_{496} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{496} - A_{700})_{pH\ 4.5} \quad (1.17)$$

Donde A es la absorbancia total, A_{496} es la absorbancia medida a 496 nm y A_{700} es la absorbancia medida a 700 nm.

$$TA = \frac{(A)(MW)(DF)(1000)}{(\epsilon)} \quad (1.18)$$

Donde TA es el total de antocianinas en (mg / L), A es la absorbancia total, MW es el peso molecular de la antocianina (para la pelargonidina 3-glucósido es 433 g / mol), DF es el factor de dilución (por ejemplo, si una muestra de 0.2 ml es diluida en 3 ml, $DF= 15$) y ϵ es la absorptividad molar (para la pelargonidina 3-glucósido es 15600 L / mol cm).

5.5.2. COLORIMETRÍA

Para determinar el color de las antocianinas se utilizó la metodología realizada por (Montes *et al.*, 2005) con algunas modificaciones, para lo cual se prepararon soluciones acuosas de 50 mL con extractos obtenidos en cada método, cada una de ellas con el mismo factor de dilución que se obtuvo en la metodología para la determinación de antocianinas totales. De cada solución se midió el pH con un potenciómetro (Conductronic pH 120) hasta ajustarlo a 1.0 con HCl. Las soluciones obtenidas se midieron en un espectrofotómetro de color (X-Rite Color-i5) bajo el iluminante D65/10°, utilizando agua destilada como blanco. Los datos obtenidos mediante el equipo fueron L^* , a^* y b^* correspondientes al sistema CIELAB.

5.5.3. RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN

El rendimiento de la extracción se pudo calcular mediante una relación entre la masa de extracto obtenido y la masa de extracto máxima que se puede obtener, todo esto con la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{M_2}{M_1} * 100 \quad (1.19)$$

Donde M_2 es la masa del extracto obtenido, M_1 es la masa de la cantidad de extracto máximo que se puede obtener. Para este procedimiento se utilizó la cantidad de extracto obtenido en ME como el valor de M_1 .

5.5.4. ESPECTROSCOPIA IR

Se realizó un análisis de espectroscopia IR mediante la técnica de ATR para una muestra de extracto de cada método, esto con la finalidad de identificar los grupos funcionales presentes en la estructura química de la antocianina estudiada (pelargonidina-3-glucosido) (Figura 2). El equipo utilizado fue un espectrofotómetro (Bruker Tensor 27), en el cual se midieron las muestras en la región media del espectro IR.

Las muestras fueron tomadas del proceso de extracción sin realizarles ninguna modificación, únicamente se almacenaron en envases ámbar para evitar el contacto con la luz. Para la medición en el espectrofotómetro, se tomó una gota de cada muestra y se colocó en el compartimento adecuado del equipo, los resultados fueron obtenidos mediante el software Opus Data Collection.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Strawberry anthocyanin extraction (*Fragaria ananassa*) with supercritical CO₂ assisted by pulsed electric fields

Marco Antonio Ávila-Hernández^{a,*}, Julián Cruz-Olivares^{a,b,*}, César Pérez-Alonso^a, Juan Orozco-Villafuerte^a, Carlos Eduardo Barrera-Díaz^a, María del Carmen Chaparro-Mercado^c.

^a Facultad de Química. Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón esq. Paseo Tollocan S/N. 50120. Toluca, Estado de México, México.

^b MCCM Ciencia e Innovación Tecnológica S.A. de C.V. Av. Benito Juárez Sur 1002, Col. Universidad, C.P. 50130, Toluca, Estado de México, México.

^c Departamento de Ingeniería de Alimentos, Universidad Iberoamericana. Prol. Paseo de la Reforma 880, Lomas de Santa Fé, Álvaro Obregón, 01219, Ciudad de México, México.

*Corresponding authors: marcoavila.201@gmail.com (Marco Antonio Ávila-Hernández) and jcruzo@uaemex.mx (Julián Cruz-Olivares)

ABSTRACT

Maceration (ME) and extraction with supercritical CO₂ (SCDE) processes were utilized for extracting anthocyanins from strawberry. In order to improve the extraction yield, a pretreatment with pulsed electric fields (PEF) of 0.5, 0.75 and 1.0 kV/cm was applied to the freeze dried strawberry samples.

ME was carried out using methanol as a solvent at atmospheric pressure and room temperature. Whereas in the SCDE, the CO₂ was used at three pressure levels (100, 150 and 200 bar) at 40, 50 and 60°C.

The extraction yield, anthocyanin content and product purity with both technologies were obtained. The best results were found in the samples where a PEF pretreatment of 1.0 kV/cm was applied.

Comparing the results of extraction yield and total content of strawberry anthocyanins with and without PEF pretreatment, it was found that, the percentage of extraction yield was 13% higher, while the total anthocyanin content was 14.3% higher with ME. On the other hand, with SCDE, at 60°C and 200 bar, these same results were 24% and 87% higher, respectively. Furthermore, using the IR spectroscopy analysis, the anthocyanin called pelargonidin-3-glucoside was identified, mainly in the extract obtained with SCDE.

In SCDE, it was also possible to obtain the distribution coefficient of the extract, the apparent solubility of anthocyanins and the thermodynamic parameters of the extraction process.

Keywords: Strawberry, Anthocyanins, Supercritical Extraction, Pulsed Electric Fields, Supercritical Carbón Dioxide

Highlights

- Supercritical CO₂ was selectively utilized as a solvent to extract anthocyanins from strawberry.
- Pulsed electric fields as a pretreatment improved extraction yield and total content of anthocyanins.
- The apparent solubility of anthocyanins is satisfactorily adjusted with the modified Chrastil equation.
- Pelargonidin-3-glucoside was successfully identified by Colorimetry and IR analysis.

1. Introduction

Anthocyanins constitute the largest and probably the most important group of water soluble plant pigments [1]. These are responsible for the blue, purple, red and orange color of many fruits and vegetables [2]. Another important property is its antioxidant activity, which plays a vital role in the prevention of neuronal and cardiovascular diseases, as well as in cancer and diabetes, among others [3].

Anthocyanins are glycosylated polyphenolic compounds (anthocyanidins) characterized by the presence of two benzyl rings (A and B) and a heterocyclic ring (C). Ring C is attached to A and B through a three carbon bridge [1] (Fig. 1).

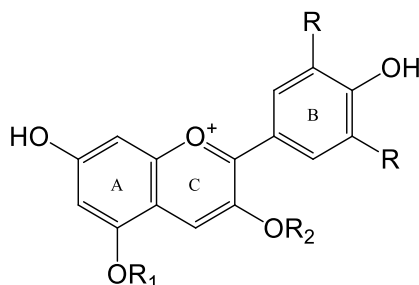


Fig. 1. General structure of anthocyanins (R₁ and R₂ can be H or sugars, R can be OH or H)

Strawberry (*Fragaria ananassa*) has been widely studied due to its high content of bioactive compounds, which show outstanding antioxidant abilities [4]. The anthocyanins in the

strawberry are the most representative polyphenolic components [5]. Several studies report that the amount of anthocyanins in strawberry ranges from 150 to 350 mg/kg [6]. Pelargonidin-3-glucoside is an anthocyanin that has been found mostly in strawberries, in proportions ranging from 89 to 95% by weight of the anthocyanins present in this fruit [7].

The extraction of anthocyanins from plants is usually carried out by maceration (ME) with an acidified organic solvent, which breaks down the cell membranes by dissolving and stabilizing the anthocyanins [8]. Alternatively, in order to minimize the use of organic solvents and increase the quality of the extracted product, other methodologies have been used in accordance with the "Green Chemistry". Supercritical fluid extraction (SFE) is a technology that satisfies both purposes [9-10].

A supercritical fluid is a substance that is at a temperature and pressure above its critical values (T_c and P_c). Supercritical fluids have the ability to diffuse through solids as a gas and to dissolve materials as a liquid [11-12].

Carbon dioxide (CO_2) is the most commonly used supercritical fluid because it is safe, available and has a low cost, in addition to allowing supercritical operations at low pressures and near ambient temperatures [13-14].

A technology that has received great attention in recent years is that of pulsed electric fields (PEF), which consists of the intermittent application of high voltage (kV/cm) pulses for periods of time ranging from microseconds to milliseconds, through of a material placed between 2 electrodes. This voltage generates an electric field whose intensity depends on the space between the electrodes and the voltage supplied. When the voltage is high enough, a phenomenon called electroporation occurs, which increases the permeability of the cytoplasmic membrane, improving the passage of ions and macromolecules through it [15-16].

When electroporation is carried out in the membrane of a product from which it is intended to extract a component, the solvent or fluid used travels more easily and transports the component to be obtained more freely, this is the reason why PEF technology is used as a treatment prior to the extraction process [17].

PEF technology has different applications, for each of them the optimal operating conditions of the equipment that provide this technology have been studied. To generate electroporation in vegetable membranes such as strawberries, it is recommended to apply an electric potential of

0.2 to 1.0 kV/cm during periods of 10 μ s, in order to give a proper pretreatment to the sample without modifying its chemical components [18-20].

The objective of this work was to extract anthocyanins from the strawberry by maceration and supercritical CO₂ methods by applying a pretreatment of PEF to the strawberry sample, in addition to characterizing the extracts obtained.

2. Materials and methods

2.1 Plant materials

The strawberry was purchased with regional producers of this fruit from the municipality of Villa Guerrero, State of Mexico, Mexico (18 ° 58'N 99 ° 38'W).

2.2 Reagents

Pure carbon dioxide (99.99%) was supplied by Infra México S.A. of C.V. (Toluca, State of Mexico, Mexico). The reagents methanol (99.8%), hydrochloric acid (37%), potassium chloride (> 99%) and sodium acetate (> 99%) were purchased with the company Sigma-Aldrich S.A. of C.V. (Toluca, State of Mexico, Mexico).

2.3 Preparation and drying of the strawberry

The fresh strawberries were selected and washed with water at a temperature of 10°C to remove impurities and dirt. The clean fruits were cut into slices approximately 0.4 mm thick. The drying process was carried out in 2 stages, ultra freezing and lyophilization.

In the ultra freezing, 600 g of the sliced samples were placed in 2 glass jars (Labconco 7540800) that were covered with aluminum foil. The vessels were deposited in an ultra freezer (Thermo Scientific Revco EXF) operating at -80°C for 24 hrs.

In lyophilization, the bottles with the frozen samples were placed in a lyophilizer (Labconco FreeZone) to extract the amount of water present in the samples through a vacuum pressure of 0.02 mBar and a temperature of -50°C.

The humidity of the samples was verified by weighing them on an analytical balance (Mettler Toledo AB204-S). When the samples still showed humidity, the freezing and lyophilization processes were repeated until a maximum amount of water of 5% was reached.

Finally, the dry samples were ground with a coffee mill (MrCoffee BVMC-BMH23 / 26) and sieved with a 20 mesh to homogenize their size.

2.4 Pulsed electric fields (PEF)

The dried strawberries were processed in batches of 50 g in a PEF device, which consists of a pulse generator (Makita EG4550A), which is connected to an oscilloscope (Owon Sds1022). The treatment chamber is connected to the generator by means of 2 stainless steel electrodes. The control of the operating conditions was carried out through a computer equipment, which is in contact with the oscilloscope and the pulse generator. The (Fig. 2) shows the representation of the process.

To each of the samples 3 pulses of $10 \mu\text{s}$ were applied with electrical potentials of 0.5, 0.75 and 1.0 kV / cm.

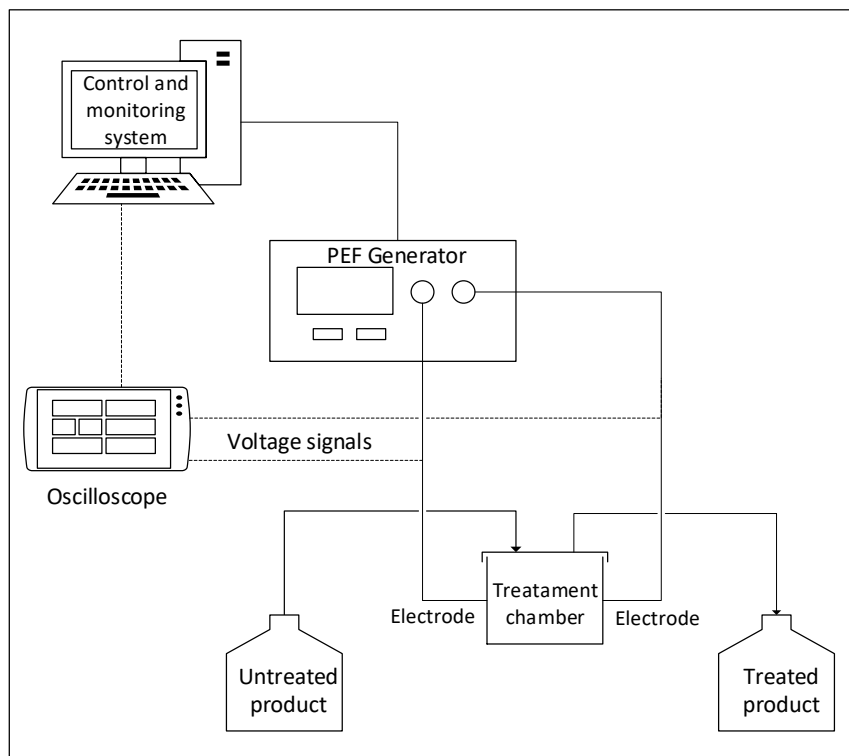


Fig. 2. Pretreatment with pulsed electric fields (PEF)

2.5 Extractions

The extraction process was carried out using samples with and without pre-treatment of pulsed electric fields by means of 2 methodologies: extraction by maceration (ME) and extraction with supercritical CO₂ (SCDE).

2.5.1 Extraction by maceration (ME)

According to studies carried out, it has been shown that, for the extraction of anthocyanins from the strawberry, acidified methanol has given good results as a solvent in the process by maceration [21].

10 g of dry strawberry were placed in a 250 mL Erlenmeyer flask, then 60 ml of methanol (with 0.1% HCl v/v) were added and left for 24 hrs at 5 ° C. After this time the sample was filtered under vacuum with a Buchner funnel. The obtained filtrate was dried at 65°C using a rotary evaporator (Buchi R-215) until a constant weight was obtained. To weigh the product obtained, an analytical balance (Mettler Toledo AB204-S) was used.

2.5.2 Extraction process with supercritical CO₂ (SCDE)

2.5.2.1 Selection of operating conditions

For this methodology, different factors were taken into account according to the properties of both the solvent (CO₂) and the solute to be extracted (anthocyanins).

It was decided to work at the temperature conditions of 40, 50 and 60 ° C, and pressures of 100, 150 and 200 bar, because they are above the critical temperature and pressure of CO₂. According to studies carried out by other researchers it has been recommended to work in these ranges since anthocyanins undergo a degradation at mainly temperature conditions from 70°C, while in pressure it is from 1000 bar [22-23].

2.5.2.2 Extraction process with supercritical CO₂ (SCDE)

The (Fig. 3) shows the schematic representation of the equipment used for this process.

50 grams of dry sample were placed in the extraction cell. The cell was connected to a line of pipes and left inside the conditioning chamber. CO₂ contained in the tank was passed through the lines to move the air in the pipes and in the extraction cell. The CO₂ was compressed using a high pressure pump. Subsequently, the compressed CO₂ was passed to the extraction cell until the desired experimental pressure was reached, which was obtained through a sensor (Honeywell GM) and pressure gauge. The conditioning chamber has 2 heat sources with which the desired temperature was reached, which was recorded with a temperature meter (Honeywell DC). When the pressure and temperature were stable, the sample was left in contact with the CO₂ inside the cell for 24 hrs. After the contact time had elapsed, the CO₂ was released from the cell by opening a micrometric heating valve. At this stage of the process the strawberry extract was carried by CO₂ and collected in a recovery cell. The extract obtained was weighed on an analytical balance (Mettler Toledo AB204-S) for quantification.

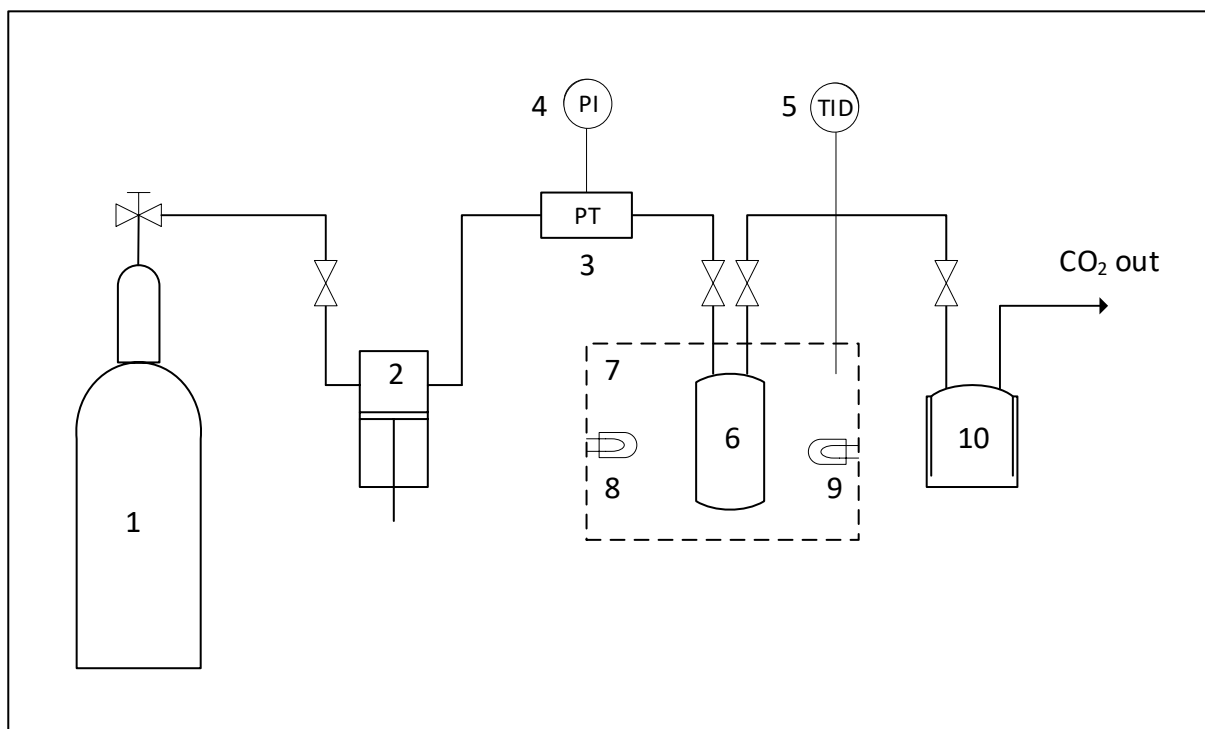


Fig. 3. Extraction process with supercritical CO₂. (1) CO₂ tank, (2) High pressure pump, (3) Pressure sensor, (4) Pressure gauge, (5) Temperature gauge, (6) Extraction cell, (7) Conditioning chamber, (8,9) Heat sources, (10) Recovery cell

2.6 Determination of total anthocyanins

The amount of total anthocyanins was determined according to the differential pH methodology reported in the literature [24], for which 2 buffer solutions were prepared, the first one of 0.025M/HCl potassium chloride with pH = 1, the second was a 0.4M sodium acetate / HCl solution with pH = 4.5, both solutions were measured with a potentiometer (Conductronic pH 120). Subsequently, solutions of the extracts obtained in each of the methods were prepared in order to determine the dilution factor to be used, for this, a sample of each extraction was taken and dissolved in 10 ml of the 0.025 M/HCl potassium chloride solution. The amount of extract used to prepare this solution was determined taking into account that the measured absorbance was less than 1.2.

With the dilution factor obtained, two samples of each extract were taken and solutions were prepared with the potassium chloride and sodium acetate buffers. Of each solution obtained, 2 absorbances were measured in a UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific UV-Vis 10), one at 496 nm and the other at 700 nm. The calculation of absorbances and total anthocyanins were obtained by equations (1) and (2).

$$A = (A_{496} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{496} - A_{700})_{pH\ 4.5} \quad (1)$$

Where A is the total absorbance, A_{496} is the absorbance measured at 496 nm and A_{700} is the absorbance measured at 700 nm.

$$TA = \frac{(A)(MW)(DF)(1000)}{(\epsilon)} \quad (2)$$

Where TA is the total anthocyanins in (mg/L), A is the total absorbance, MW is the molecular weight of the anthocyanin (for the pelargonidin 3-glucoside is 433 g/mol), DF is the dilution factor (per example, if a sample of 0.2 ml is diluted in 3 ml, DF = 15) and ϵ is the molar absorptivity (for the pelargonidin 3-glucoside it is 15600 L/mol cm).

2.7 Colorimetry

Tristimulus colorimetry is a useful technique for color analysis and is based on the transmittance values of the entire spectrum. For the study of this colorimetry, different models have been developed for the color space such as CIELAB, which was based on the measurement of three

parameters mainly: L^* is the luminosity, a^* is the chromaticity of red to green and b^* it is the chromaticity of blue to yellow [25].

To determine the color of the anthocyanins, aqueous solutions of 50 mL were prepared with extracts obtained in each method, each one with the same dilution factor obtained in the methodology for the determination of total anthocyanins. From each solution the pH was measured with a potentiometer (Conductronic pH 120) until it was adjusted to 1.0 with HCl. The obtained solutions were measured in a color spectrophotometer (X-Rite Color-i5) under the illuminant D65/10°, using distilled water as target.

2.8 Apparent solubility

The ability to obtain the apparent solubility of compounds in the supercritical fluid is crucial to determine the conditions to which the extraction process is carried out. Although there are several methods to determine the apparent solubility, models are often used to provide correlations. The modified Chrastil model (3) is based on the density of pure supercritical CO₂ and is widely used in the correlation of solid-supercritical fluid equilibrium; mainly due to its simplicity and easy application [26-27].

$$\ln S = (k_0 + k_1 \cdot d) \ln d + \frac{(a_0 + a_1 \cdot d)}{T} + b \quad (3)$$

Where S is the apparent solubility expressed as a mass fraction (w/w), T is the temperature in (K), the association numbers k_0 and k_1 are the average number of solvent molecules in the solvated complex; a_0 and a_1 depend on the heat of solvation and vaporization of the solute, and b is a function of k and also depends on the molecular weight of the solute and the supercritical fluid, k also depends on the density of the supercritical fluid (d), therefore:

$$k = k_0 + k_1 \cdot d \quad (4)$$

$$a = a_0 + a_1 \cdot d \quad (5)$$

Substituting (4) and (5) in (3) equation (6) was obtained:

$$\ln S = k \cdot \ln d + \frac{a}{T} + b \quad (6)$$

To determine the apparent solubility experimentally can be done by the following equation:

$$S = \frac{M_E}{M_E + M_{CO_2}} \quad (7)$$

Where M_E is the mass of extract obtained in (g) and M_{CO_2} is the mass of CO_2 in (g) used in the process.

The comparison between the experimental and calculated apparent solubility data can be determined by the average of the absolute relative deviations (AARD).

$$AARD = \frac{1}{n} \sum \frac{|S^{cal} - S^{exp}|}{S^{exp}} \quad (8)$$

Where n is the data number, S^{cal} is the apparent solubility calculated by equation (6) and S^{exp} is the experimental apparent solubility obtained with equation (7)

2.9 The partition coefficient and thermodynamic properties

The partition coefficient is a quantitative parameter that represents the relative solubility of a given substance in a system composed of two phases immiscible with each other, at a specific temperature. Equation (9) is used to determine this coefficient.

$$K_D = \frac{m_{oe}}{m_{or}} \quad (9)$$

Where m_{oe} is the mass of the strawberry extract contained in the CO_2 , m_{or} is the mass of the rest of the strawberry extract in the ground raw material. In this procedure it was considered as the maximum amount of extract obtained in maceration extraction process.

In a process, the thermodynamic parameters are fundamental since they give a description of the type of process that is carried out. Properties such as free energy (ΔG^0), enthalpy (ΔH^0) and entropy (ΔS^0) tell us whether the process is spontaneous, endothermic or exothermic depending on their values. These thermodynamic properties can be calculated through a series of equations, which are a function of the partition coefficient (K_D) [28-29].

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_D \quad (10)$$

Where K_D is the partition coefficient, ΔG^0 (J / mol) is the extraction free energy, T (K) is the absolute temperature and R is the universal gas constant (8.314 J / mol K). The K_D value can be expressed in terms of ΔH^0 (J / mol) and ΔS^0 (J / mol K).

Enthalpy and entropy can be calculated through the Van't Hoff equation:

$$\ln K_D = \frac{\Delta H^0}{R} \left(\frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (11)$$

The values of ΔH^0 and ΔS^0 are obtained from the slope and the intersection of the ordinate of $\ln K_D$ vs. $1/T$ in equation (11) [30-31].

In the pretreatment of PEF, the amount of energy applied in each pulse can be calculated according to the electrical potential applied in each test [32] by means of equation (12):

$$W_{Pulse} = U \cdot I \cdot \tau \quad (12)$$

Where W_{Pulse} (J) is the amount of energy applied per electric pulse, U (V) is the electric potential, I (A) is the current intensity and τ (s) is the pulse width. The electric current intensity can be determined from Ohm's law (13) [33]:

$$I = \frac{U}{R} \quad (13)$$

Where R (Ω) is the resistance, in our system the resistance was 3.6Ω according to the coil used.

From the amount of energy of each pulse can calculate the total energy applied in each pre-treatment [34-35], this by means of the equation (14):

$$W_{Spec} = \frac{f}{\dot{m}} \cdot W_{Pulse} \quad (14)$$

Where W_{Spec} (J / mol) is the total applied energy, f (s^{-1}) is the frequency, \dot{m} (kg / h) is the mass flow and W_{Pulse} (J) is the energy applied by electric pulse. The frequency is determined by equation (15) [32]:

$$f = \frac{n}{t_{res}} \quad (15)$$

Where n is the number of pulses applied and t_{res} (s) is the residence time of the sample in the equipment.

2.10 Extraction yield

The extraction yield is an indicator that shows the efficiency of the method used, this value can be determined by the following equation:

$$\%R = \frac{M_2}{M_1} * 100 \quad (16)$$

Where M_2 is the mass of the extract obtained, M_1 is the mass of the maximum amount of extract that can be obtained. For this procedure the amount of extract obtained in ME was used as the value of M_1 .

2.11 IR spectroscopy

Infrared spectroscopy is an analytical technique that allows to know the main functional groups of the molecular structure of a compound by means of infrared light that is absorbed by a substance. This absorption depends on the wavelength of light [36-37].

An IR spectroscopy analysis was performed using the ATR technique for an extract sample, where the compound to be followed was the pelargonidin-3-glucoside. The equipment used was a spectrophotometer (Bruker Tensor 27), which measures the samples in the middle region of the IR spectrum [38-39].

3. Results and discussion

3.1 Extract obtained and yield of extractions

Extractions were performed by ME and SCDE methods using strawberry with and without PEF pretreatment. Notable differences were obtained between the amount of extract obtained with both methods, as can be seen in the results of Table 1.

With the ME method, 1.0527 g and 1.196 g of extract were obtained using strawberry without and with pretreatment of 1.0 kV/cm, respectively.

According to the results obtained, it can be seen that the amount of extract increases when applying PEF, this behavior has already been observed in similar methodologies that have been carried out by various researchers, for example, in the process of grape component extraction, it was reached up to 88% more extract when applying this pretreatment [40].

These results can be explained based on the electroporation phenomenon generated by the PEF. By applying the electric pulse, the structure of the plant matrix is modified, which causes an increase in the size of the pores and therefore, the extraction process is easier and the yields are substantially increased [41].

With the SCDE method, experiments were carried out at pressures of 100, 150 and 200 bar, and temperatures of 40, 50 and 60°C. At the pressure of 100 bar no quantifiable amount of extract was obtained, while at 150 and 200 bar quantities of extract were obtained with significant differences in each of the temperatures. At both pressure values, the lowest amount of extract was obtained using strawberry without pre-treatment with PEF at 40°C and the greatest amount was achieved with pre-treated strawberry with an electrical potential of 1.0 kV/cm and temperature of 60°C in the extraction process.

At 150 bar and 40°C the amount of extract increased considerably using PEF-treated strawberry as the electric potential increased, while at that same pressure more extract was obtained when the temperature was increased. This same behavior was presented in the experiments performed at 200 bar pressure. In both extraction methods, the electroporation phenomenon caused by pretreatment with PEF is responsible for the positive effect on the amount of extract obtained [42]. Additionally, it can be seen that pressure and temperature play an important role in extraction yield. At constant pressure, the amount of extract depends on the temperature through two mechanisms. An increase in temperature reduces the solubility of the solute in the supercritical fluid, since the density of the solvent decreases. On the other hand, solute solubility is increased by increasing its volatility.

The effect of solvent density is predominant in the solubility near the critical pressure. The density of the supercritical fluid increases with pressure, which increases its extraction capacity, however, it has been reported that the effect of temperature exceeds that of density.

This type of behavior has already been verified by other authors who have used supercritical extraction to obtain components of different plant matrices [43].

Table 1. Amount of extract obtained in ME and SCDE

P (bar)	T (°C)	Amount of extract (g)			
		Without PEF	PEF 0.5 kV/cm	PEF 0.75 kV/cm	PEF 1.0 kV/cm
1	25	1.0527	1.1015	1.1405	1.196
150	40	0.0379	0.0436	0.0455	0.0515
	50	0.0419	0.0465	0.0495	0.0565
	60	0.0467	0.0536	0.0555	0.0635
200	40	0.0513	0.0570	0.0612	0.0740
	50	0.0644	0.0729	0.0770	0.0860
	60	0.1032	0.1127	0.1191	0.1280

In (Fig. 4) the extraction yields are shown without pretreatment and with treatment at three voltage levels depending on the temperature. The highest yields were obtained from the strawberry sample with pretreatment at the highest voltage and pressure levels, with a positive trend due to the effect of temperature.

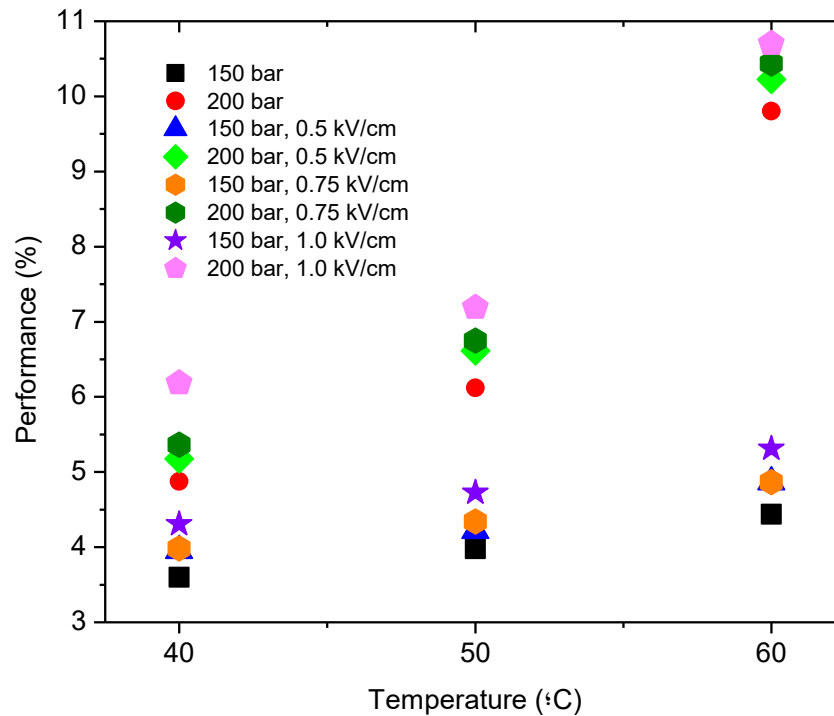


Fig. 4. Percentages of performance in SCDE

3.2 Total anthocyanins

The amount of anthocyanins was determined for each of the extracts using the differential pH method, these results are shown in Table 2, where it can be seen that the application of PEF as a pretreatment has a positive effect favoring the recovery of these polyphenolic compounds.

With the ME method, the amount of anthocyanins extracted is greater in the strawberry sample with pretreatment than without it. In samples with pretreatment, an increasing trend is observed as the voltage increases. The highest concentration of anthocyanins was obtained with a pretreatment of 1.0 kV/cm, this result is 14.4% higher than that obtained with the sample without pretreatment.

The concentration of anthocyanins that is obtained, depends on the extraction method used, but mainly, on the operating conditions of the process, since according to Klopotek et al [44], in the case of the strawberry, the anthocyanins undergo degradation at temperatures close to 70 °C, this same behavior has been observed in the anthocyanins of other fruits such as grapes or raspberries [45].

The application of PEF is a non-thermal and harmless treatment, so there is no risk of degradation through the use of this technology, however, the amount of electrical potential is a factor that must be taken care of, as is demonstrated by Zhang and collaborators [46] who report that when applying potentials greater than 1.2 kV/cm they observed that the concentration of anthocyanins decreased.

The maceration extraction process was carried out at atmospheric pressure and room temperature, so that the concentration of anthocyanins was not affected, but it must be taken into account that at a later stage the residual methanol was evaporated. The use of methanol as a solvent is justified by the fact that, firstly, it shows a great affinity with anthocyanins due to its polarity and secondly its boiling point, which is below 70°C which as already mentioned is a temperature at which degradation occurs. The degradation due to the effect of the potential used is also excluded, since there are no reports that using 1.0 kV/cm, any plant sample has suffered any deterioration.

In the supercritical extraction process, as the temperature increased from 40 to 60°C at constant pressure, the amount of anthocyanins increased 16%. This can be explained by the fact that when the temperature increases, although the density of the solvent decreases, the vapor pressure of the solute increases. Therefore, the effect of the increase in the vapor pressure of the solute is greater than that of the reduction in the density of the solvent, obtaining greater amounts of anthocyanins.

On the other hand, due to the increase in pressure from 150 to 200 bar at a constant temperature, the amount of anthocyanins increased 15.7%. This result is attributed to the increased solvation power of CO₂ due to the effect of density, since, when the pressure increases, the density of the supercritical fluid increases considerably, therefore, the distance between its molecules decreases and a better interaction is achieved. between the solute and solvent molecules. Additionally, the effect of pressure on the solute causes ruptures in the matrix of the plant sample, facilitating the release of the solute and consequently improving both solubility and mass transfer rates.

When anthocyanins are extracted with supercritical fluids, it is pertinent to take into account the operating conditions. According to Marszalek et al [47], anthocyanins are more susceptible to pressure than to temperature, since they are degraded at pressures above 1000 bar. In this study, the temperature and pressure conditions did not exceed 60°C and 200 bar, respectively.

In addition, the pretreatment of the sample with PEF was 1.0 kV/cm, which does not represent any risk of the loss of anthocyanins due to these causes.

As shown in Table 2, the amount of total anthocyanins in the extracts with and without pretreatment with PEF was in the range of 75 to 235 mg/L, according to the literature [6] it has been found that the amount of anthocyanins obtained from strawberry is between 50 and 350 mg/L.

































Table 2. Content of total anthocyanins in the extracts.

P (bar)	T (°C)	Total anthocyanins (mg/L)			
		Without PEF	PEF 0.5 kV/cm	PEF 0.75 kV/cm	PEF 1.0 kV/cm
1	25	75.78	79.94	82.44	86.60
150	40	108.02	138.46	155.18	188.74
	50	110.21	143.82	162.11	194.29
	60	117.74	151.24	165.72	203.88
200	40	108.37	148.92	166.54	211.87
	50	114.78	160.29	177.60	222.05
	60	125.74	168.32	189.73	235.03

3.3 Colorimetry

The colorimetry of each of the extracts in acidified aqueous solutions (pH = 1) was measured, since at these conditions anthocyanins have their highest intensity. The colorimetry model used was CIELab, from which the parameters L *, a * and b * were obtained. L * is the luminosity (its range of values is 0 to 100), a * is the chromaticity of red to green and b * is the chromaticity of blue to yellow (a* and b* have their range of values from -100 to 100). Table 3 shows the results of colorimetry obtained for each extract.

Table 3. Colorimetry data in CIELab system.

P (bar)	T (°C)	Without PEF				PEF 0.5 kV / cm				PEF 0.75 kV / cm				PEF 1.0 kV / cm			
		L*	a*	b*		L*	a*	b*		L*	a*	b*		L*	a*	b*	
1	25	61.2	28.8	15.3		62	30.1	14.6		62.3	30.6	14.9		62.4	31.3	14.6	
150	40	82.5	19.1	25.6		80.3	24.1	20.8		79.5	27.2	17.4		77.8	31.7	11.6	
	50	82.8	18.4	26.3		79.9	25.3	19.6		78.9	28.3	14.5		77.6	32.8	9.7	
	60	82.1	19.5	25		79.4	26.5	18.4		78.5	29.1	14		77.3	33.6	9.4	
200	40	82.4	18.9	26.6		79.5	26.1	18.9		78.4	30.1	13.6		76.7	34	8.7	
	50	81.9	18.2	25.9		79	27.5	16.8		77.8	31.4	12.3		76.9	34.8	7.7	
	60	82.2	19	25.7		78	30.6	12.9		77.5	32.4	10.5		76.7	35.5	6.9	

The difference in the tone of the extracts is due to the concentration of anthocyanins in each of them. In the ME process, the values of L* remain almost constant in the extracts of the strawberry samples with pretreatment, regardless of the voltage dose applied, while in the SCDE process the values of L* declined. The above can be explained taking into account that, at a higher concentration of components in the extract, light is more easily absorbed; while, at a lower concentration, light is absorbed to a lesser extent, causing an amount to be perceived as reflected light [48]. The values of L* in ME are on average 20 units lower than those of SCDE, this is because the concentration of anthocyanins is lower in the extracts obtained by maceration.

Strawberry anthocyanins are responsible for providing the color to this fruit, in this case, the predominant shade is red when the concentration of anthocyanins is higher, according to the CIELAB model the value of a* represents the chromaticity that goes from red to green, when the values are positive that tendency towards red predominates. For example, in SCDE at 150 bar and 60 ° C with PEF at 0.75 kV/cm an anthocyanin concentration of 165.72 mg/L was obtained and a value of a* of 29.1, while at 200 bar and 60 ° C with PEF at 0.75 kV/cm the concentration was 189.3 mg/L and a* value of 32.4. In ME extracts that have a lower concentration of anthocyanins than those of SCDE, some values of a* become higher, this effect is due to the presence of other compounds in addition to the anthocyanins present in the extracts obtained by maceration.

All values of b* were positive, indicating that the colors obtained have a yellowish hue. In the extracts where the highest concentration of anthocyanins was obtained, the values of b* were lower. According to the CIELab model color space, at the point of b* equal to zero the yellow

and red tones come together, making the extracts with a higher concentration of anthocyanins have a more charged tendency towards red, this has a direct relationship with the values of a^* mentioned above.

The trends of the values of L^* , a^* and b^* show similarity with the work of other authors. So far, no research paper has been reported in which the pretreatment of PEF is combined with the extraction of supercritical fluids for strawberries, but separate studies have been carried out, for example, Patras et al. [49] studied the impact of extraction conditions with supercritical fluids and Odriozola et al. [50] focused on the effect of pretreatment with PEF.

3.4 Partition coefficient and thermodynamic properties

The partition coefficient (K_D) in the extraction process with supercritical CO_2 was determined, in (Fig. 5) the results of this parameter are shown at different pressure conditions, in strawberry samples without and with pretreatment at different voltages, depending on of temperature.

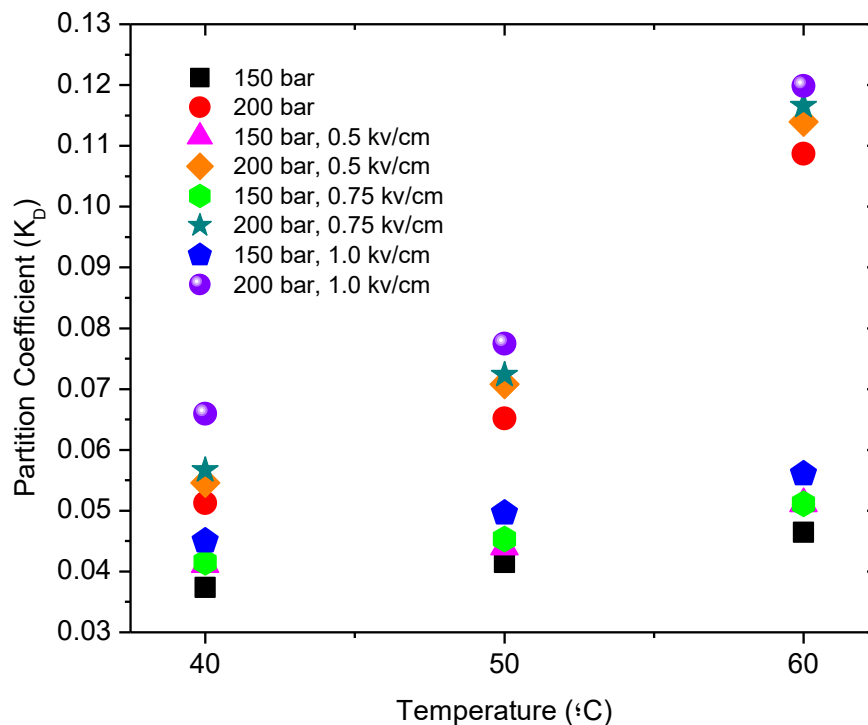


Fig. 5. Partition coefficient at different conditions

The highest partition coefficient values were obtained in the samples with pretreatment, a positive effect was observed when the voltage increased. Based on these results, it is inferred

that the electroporation phenomenon favors the extraction process. However, the effect of pressure and temperature is more evident, since the value of K_D increases its value more than twice in the case of the pretreated sample regardless of the voltage dose applied, at the temperature of 60°C.

As is well known, in all extraction processes, the amount of extract obtained depends on the thermodynamic equilibrium between the phases. Physically, the distribution coefficient represents the equilibrium constant, which depends mainly on pressure and temperature. The value of K_D is also an indication of the viability of the extraction process, that is, the larger the value of K_D the easier the extraction is.

If K_D is related to Gibbs free energy (see equation 10), it is possible to determine the change in free energy (ΔG^0), and therefore, demonstrate whether the process is spontaneous or not [51]. In this case, the positive values of ΔG^0 indicate that the process is not spontaneous. In addition, $K_D < 1$, in all experiments, which indicates that when equilibrium was reached, the greatest amount of extract still remains in plant matter [52]. Table 4 shows the results of the thermodynamic properties of the process.

The enthalpy change represents the amount of energy that a thermodynamic system can exchange with its surroundings, this can be verified from the positive or negative value of ΔH^0 .

In this study, the values of ΔH^0 were determined using the Van't Hoff equation (see equation 11). In all cases, negative enthalpy changes were obtained, which means that our process is exothermic, that is; energy is released. This exothermic character decreases at higher pressures, in the samples with PEF pretreatment at lower electrical potentials.

From the same thermodynamic model (equation 11) the change of entropy (ΔS^0) values were determined for the same data set, in all cases positive values were obtained indicating that our process is irreversible. This trend of irreversibility is greater as the pressure increases and the electrical potential decreases.

Table 4. Thermodynamic properties: ΔG^0 (J/mol), ΔH^0 (J/mol) and ΔS^0 (J/mol K) of the SCDE extraction process.

P (bar)	T (°C)	Without PEF			PEF 0.5 kV / cm			PEF 0.75 kV / cm			PEF 1.0 kV / cm		
		ΔG^0	ΔH^0	ΔS^0	ΔG^0	ΔH^0	ΔS^0	ΔG^0	ΔH^0	ΔS^0	ΔG^0	ΔH^0	ΔS^0
150	40	8559.1			8305.7			8284.3			8073.9		
	50	8552.2	-9425.6	2.7	8390.4	-9379.0	3.3	8309.5	-9046.5	2.4	8071.0	-9526.2	4.6
	60	8503.3			8234.6			8234.5			7980.2		
200	40	7736.3			7571.7			7474.2			7078.5		
	50	7337.0	-32490.3	78.7	7113.2	-31811.9	77.1	7055.8	-31170.0	75.3	6871.9	-25771.7	59.3
	60	6146.9			6016.7			5953.5			5876.2		

As we have seen, the amount of energy related to the electric potential applied in pretreatment with PEF has a great effect on the efficiency of the extraction process. According to research carried out, that energy depends on several factors, such as; the amount of sample and the frequency, intensity and duration of the electrical pulses applied [53].

In the pretreatment process with PEF it is important to highlight two ways of expressing the energy supplied. The first one refers to the amount of energy in each pulse, which increases with the level of potential used. In this case, the values were 0.695, 1.56 and 2.78 J, for potentials of 0.50, 0.75 and 1.0 kV/cm, respectively. The second is the amount of energy required per mole of sample as a function of the number of pulses applied, which also increases as the potential level increases. The values range from 1808.21 to 7232.85 J / mol, as can be seen in Table 5.

Table 5. Parameters and amount of energy applied in the PEF pretreatment

	0.5 kV / cm	0.75 kV / cm	1.0 kV / cm
I (A)	139	208	278
n	3	3	3
t_{res} (s)	0.72	0.72	0.72
f (s ⁻¹)	4.17	4.17	4.17
τ (s)	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁵
W_{Pulse} (J)	0.695	1.56	2.78
W_{Spec} (J/mol)	1808.21	4058.72	7232.85

3.5 Apparent solubility

Based on the amount of extract obtained and using equation 7, the apparent solubility was determined. Experimental results were successfully correlated ($R^2 > 0.99$) with the modified Chrastil model. The model adjustment parameters were obtained by non-linear regression using Polymath 6.0 software and are reported in table 6.

Table 6. Parameters obtained for the modified Chrastil model

P (bar)	PEF (kV/cm)	k	a	b	R ²
150		-3.3901	0.4554	10.0442	0.9964
200		-10.6599	111.8506	56.1547	0.9995
150	0.5	-4.8884	32.2854	19.4534	0.9946
200		-9.4568	87.4252	48.7415	0.9954
150	0.75	-3.7417	8.9998	12.3923	0.9999
200		-9.6948	95.3146	50.2616	0.9998
150	1	-3.6461	5.3897	11.9431	0.9952
200		-10.0655	117.4080	52.3916	0.9998

The results of the apparent solubility of strawberry anthocyanins in supercritical CO₂ were determined at three temperature levels at 150 and 200 bar pressure. The results are presented in table 7.

Table 7. Experimental and calculated 10⁶ (w/w) apparent solubility with modified Chrastil model

P (bar)	T (°C)	Without PEF			PEF 0.5 kV/cm			PEF 0.75 kV/cm			PEF 1.0 kV/cm		
		S ^{Exp}	S ^{Cal}	AARD	S ^{Exp}	S ^{Cal}	AARD	S ^{Exp}	S ^{Cal}	AARD	S ^{Exp}	S ^{Cal}	AARD
150	40	3.00	2.95		3.44	3.37		3.59	3.60		4.07	4.00	
	50	3.98	3.92	0.34	4.42	4.33	0.35	4.71	4.72	0.33	5.37	5.28	0.35
	60	5.46	5.39		6.27	6.17		6.49	6.51		7.43	7.31	
200	40	3.07	3.04		3.42	3.24		3.66	3.64		4.43	4.41	
	50	4.30	4.27	0.34	4.87	4.64	0.37	5.14	5.11	0.34	5.75	5.72	0.34
	60	8.07	8.01		8.81	8.43		9.31	9.27		10.01	9.96	

Since CO₂ is a non-polar solvent, the solid-gas equilibrium depends on the physical interactions between CO₂ and anthocyanins [54]. The temperature increase from 40 to 60°C significantly increased the solubility by more than 100%. The ability of a supercritical fluid to dissolve a solute depends on its density, which can be manipulated by changing the temperature, pressure or both variables. When the pressures are low at constant temperature, there is a dissolution of non-polar and weakly polar compounds. However, there will be more polar and high molecular weight compounds at higher pressures, several researchers have emphasized this. Since an increase in temperature decreases density, increasing the vapor pressure of the gas to increase solubility is a major factor. Therefore, the vapor pressure of a compound affects solubility more than solvent resistance (density) at higher temperatures [55].

The increase in pressure from 150 to 200 bar resulted in a gradual increase in anthocyanin recovery to 60°C. As the pressure rises at a constant temperature, the CO₂ density also increases, thus decreasing the intermolecular space between CO₂ molecules, therefore, increases the interactions between anthocyanins and CO₂ molecules, causing solubility to increase with pressure. This is due to the fact that the density of supercritical CO₂ is more sensitive to this variable. Another factor that affects the solubility of anthocyanins is the temperature of the system, which influences the vapor pressure of the solute, the density of the solvent and the intermolecular interactions in the fluid phase. This is why the solubility results at 60°C are greater than at 40 or 50°C due to the high interactions of anthocyanin and CO₂ molecules [56].

The application of PEF increased the solubility gradually, although in this case, this technology does not play such a direct factor as the temperature and pressure of the supercritical extraction physically does, except for the fact that electroporation allows for greater ability to interact between solvent and solute. According to the results of Table 7, it is observed that the lowest solubility was obtained when strawberry without PEF was used at a pressure of 150 bar with values ranging from 3.0 to 5.46 x 10⁻⁶, while the highest solubility it was obtained when strawberry with PEF of 1.0 kV/cm was used at a pressure of 200 bar with values ranging from 4.43 to 10.01 x 10⁻⁶.

The calculated apparent solubility was determined by the modified Chrastil equation (equation 6) from the experimental apparent solubility values, where for each data set the percentage of variation (% AARD) was obtained, which was kept in a range from 0.33 to 0.37.

3.6 IR spectroscopy

The analysis of the extracts obtained by ME and SCDE was carried out by IR spectroscopy with the ATR technique. The IR spectra are shown in Fig. 6, the functional groups of pelargonidin-3-glucoside were identified, this molecule is composed of alcohols, phenols, aromatic compounds and ethers [57].

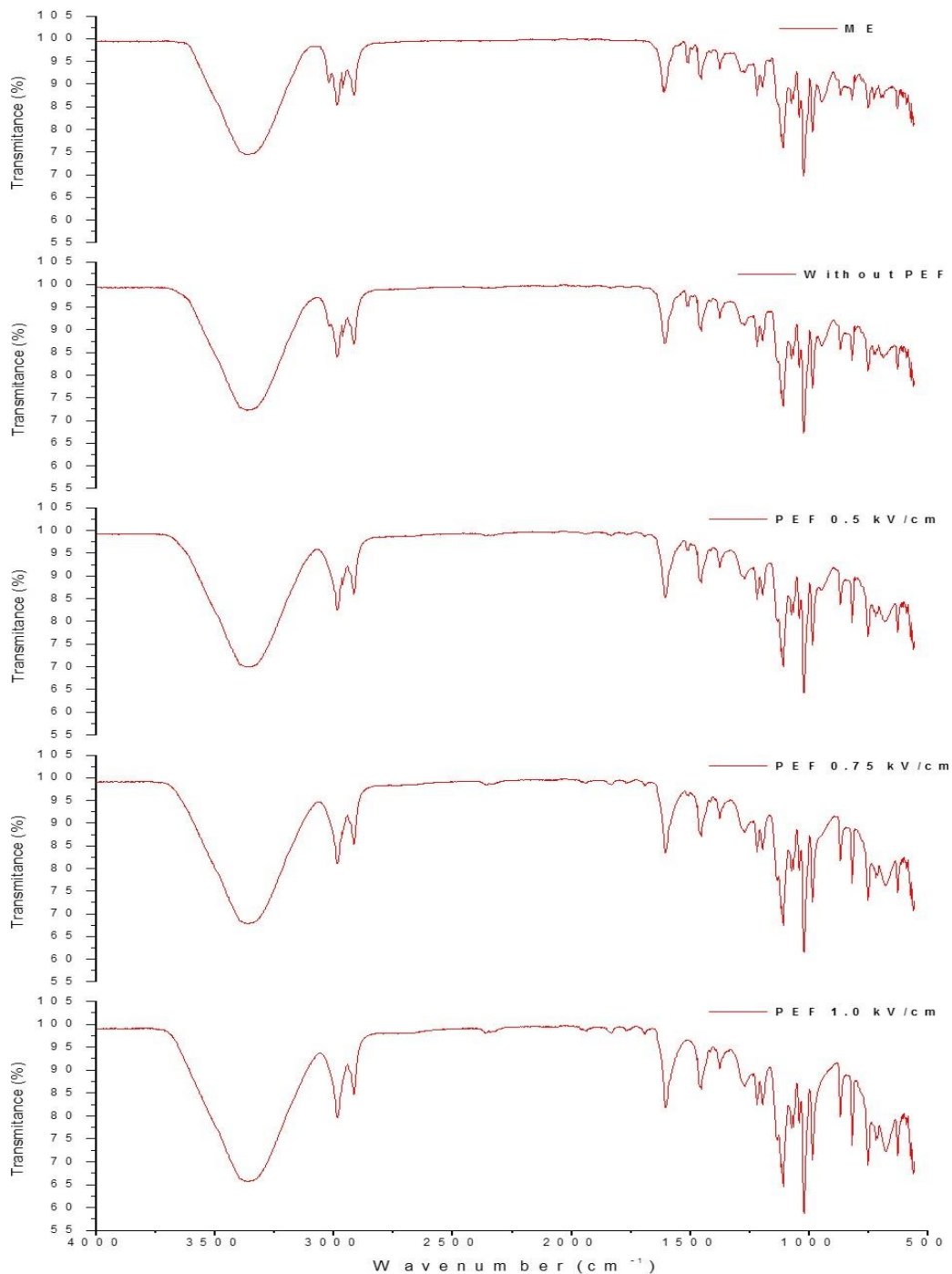


Fig. 6. IR spectra of pelargonidin-3-glucoside obtained in ME and SCDE

Table 8 shows the characteristic functional groups identified in anthocyanin called pelargonidin-3-glucoside, as well as the type of vibration according to its components and the wave number where they occur.

Table 8. Functional groups in the IR spectrum of the pelargonidin-3-glucoside

Functional group	Type of vibration	Wave number (cm-1)
Alcohols y fenols	Stress O-H	3600 – 3200
	Stress C-H	1100
Aromatics	Stress =C-H	3000
	Stress –C=C	1600 y 1450
	Combinations bands	2000 – 1660
Eters	Stress C-O	1100 – 1000

According to the IR spectra shown in Figure 6, it is observed that the bands that identify the different functional groups show greater intensity and a better definition in the SCDE extracts with PEF at higher electrical potentials, this is due because in these samples higher anthocyanin concentrations were obtained.

4. Conclusions

The SCDE process gave better results than ME in terms of the amount of anthocyanins obtained. The increase of the pressure and the temperature in SCDE favored so that they had greater yields in the process of extraction, obtaining products with higher concentration of anthocyanins, making it a more selective method with respect to ME. The pretreatment with PEF helped to increase these yields and concentrations significantly by increasing the applied electrical potential from 0.5 to 1.0 kV/cm. The maximum amount of anthocyanins extracted was 235 mg/L, using a pretreated strawberry with PEF of 1.0 kV/cm and operating the supercritical extraction equipment at 60 °C and 200 bar. The minimum conditions at which anthocyanins were extracted from the strawberry with supercritical CO₂ were 150 bar and 40 °C. Thermodynamically, the process is no spontaneous, exothermic and irreversible, which is favored at higher operating pressures and temperatures and with raw material treated with PEF at lower electrical potentials.

The difference of colorimetry in extracts with low concentration to extracts with high concentration of anthocyanins was evident, in both cases red tones were obtained, but their tendency was different changing from yellow to blue.

The experimental results of apparent solubility of anthocyanins in supercritical CO₂ were suitably adjusted ($R^2 > 0.99$) with the modified Chrastil model. In samples with pretreatment, the solubility is 21% higher than in samples without pretreatment. The maximum solubility (10.01×10^{-6} w/w) was obtained at 200 bar and 60°C.

The obtained extracts had the presence of pelargonidin-3-glucoside, this could be verified by IR spectroscopy, which helped to identify the functional groups that make up the molecule.

Acknowledgment

The authors would like to thank the National Council of Science and Technology for the scholarship granted to the master's student in chemical sciences Marco Antonio Ávila-Hernández.

References

- [1] Smeriglio, A. *et al.* (2016). ‘Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins’, *Phytotherapy Research*, (March), pp. 1265–1286. doi: 10.1002/ptr.5642.
- [2] De Pascual-Teresa, S. and Sanchez-Ballesta, M. T. (2008). ‘Anthocyanins: From plant to health’, *Phytochemistry Reviews*, 7(2), pp. 281–299. doi: 10.1007/s11101-007-9074-0.
- [3] Castañeda-Ovando, A. *et al.* (2009). ‘Chemical studies of anthocyanins: A review’, *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 113(4), pp. 859–871. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001.
- [4] Romandini, S. *et al.* (2013). ‘Effects of an acute strawberry (*Fragaria ananassa*) consumption on the plasma antioxidant status of healthy subjects’, *Journal of Berry Research*, 3(3), pp. 169–179. doi: 10.3233/JBR-130055.
- [5] Aaby, K., Skrede, G. and Wrolstad, R. E. (2005). ‘Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*fragaria ananassa*)’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), pp. 4032–4040. doi: 10.1021/jf048001o.
- [6] Clifford, M. N. (2000). ‘Anthocyanins – nature, occurrence and dietary’, 1072(January), pp. 1063–1072.

- [7] Lopes-Da-Silva, F. *et al.* (2002). 'Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection', *European Food Research and Technology*, 214(3), pp. 248–253. doi: 10.1007/s00217-001-0434-5.
- [8] Naczki, M. and Shahidi, F. (2004). 'Extraction and analysis of phenolics in food.', *Journal of chromatography. A*, 1054(1–2), pp. 95–111. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.059.
- [9] Chemat, F., Vian, M. A. and Cravotto, G. (2012). 'Green extraction of natural products: Concept and principles', *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), pp. 8615–8627. doi: 10.3390/ijms13078615.
- [10] Meireles, M. A. A. (2003). 'Supercritical extraction from solid: Process design data (2001-2003)', *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 7(4–5), pp. 321–330. doi: 10.1016/j.cossms.2003.10.008.
- [11] Brunner, G. (2005). 'Supercritical fluids: Technology and application to food processing', *Journal of Food Engineering*, 67(1–2), pp. 21–33. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060.
- [12] Eckert, C. A., Knutson, B. L. and Debenedetti, P. G. (1996). 'Supercritical fluids as solvents for chemical and materials processing', *Nature*, pp. 313–318. doi: 10.1038/383313a0.
- [13] Alexandre, A. M. R. C. *et al.* (2018). 'High-pressure CO₂ assisted extraction as a tool to increase phenolic content of strawberry-tree (*Arbutus unedo*) extracts', *Journal of CO₂ Utilization*. Elsevier, 27(July), pp. 73–80. doi: 10.1016/j.jcou.2018.07.002.
- [14] Sapkale, G. N. *et al.* (2010). 'Supercritical fluid extraction - a review', *International Journal of Chemical Sciences*, 8(2), pp. 729–743.
- [15] Soliva-Fortuny, R. *et al.* (2009). 'Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review', *Trends in Food Science and Technology*, 20(11–12), pp. 544–556. doi: 10.1016/j.tifs.2009.07.003.
- [16] Tsong Y, T. (1991). 'Electroporation of cell membranes', *Biophysical Journal*, 60:297-306(4), pp. 297–306.
- [17] Saulis, G. (2010). 'Electroporation of cell membranes: The fundamental effects of pulsed electric fields in food processing', *Food Engineering Reviews*, 2(2), pp. 52–73. doi: 10.1007/s12393-010-9023-3.
- [18] Ricci, A., Parpinello, G. (2018). 'Recent Advances and Applications of Pulsed Electric

Fields (PEF) to Improve Polyphenol Extraction and Color Release during Red Winemaking’, *Beverages*, 4(1), pp. 18-30. doi: 10.3390/beverages4010018.

[19] Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R. and Martín-Belloso, O. (2009). ‘Impact of high-intensity pulsed electric fields variables on vitamin C, anthocyanins and antioxidant capacity of strawberry juice’, *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), pp. 93–100. doi: 10.1016/j.lwt.2008.05.008.

[20] Aguiló-Aguayo, I., Soliva-Fortuny, R. and Martín-Belloso, O. (2009). ‘Avoiding non-enzymatic browning by high-intensity pulsed electric fields in strawberry, tomato and watermelon juices’, *Journal of Food Engineering*. Elsevier Ltd, 92(1), pp. 37–43. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2008.10.017.

[21] González-Paramás, A. M. *et al.* (2006). ‘Flavanol-anthocyanin condensed pigments in plant extracts’, *Food Chemistry*, 94(3), pp. 428–436. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.11.037.

[22] Lang, Q. (2001). ‘Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies; a practical review’, *Talanta*, 53(4), pp. 771–782. doi: 10.1016/S0039-9140(00)00557-9.

[23] Capuzzo, A., Maffei, M. E. and Occhipinti, A. (2013). ‘Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances’, *Molecules*, 18(6), pp. 7194–7238. doi: 10.3390/molecules18067194.

[24] Mónica Giusti, M. and Wrolstad, R. E. (2005). ‘Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy’, *Handbook of Food Analytical Chemistry*, 2–2(August 2001), pp. 19–31. doi: 10.1002/0471709085.ch18.

[25] Gordillo, B. *et al.* (2012). ‘Comprehensive colorimetric study of anthocyanic copigmentation in model solutions. Effects of pH and molar ratio’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(11), pp. 2896–2905. doi: 10.1021/jf2046202.

[26] Vezzetti, D. J. (1982). ‘Solubility of solids in supercritical gases’, *The Journal of Chemical Physics*, 77(3), pp. 1512–1516. doi: 10.1063/1.443931.

[27] Knez, Ž., Cör, D. and Knez Hrnčič, M. (2018). ‘Solubility of Solids in Sub- and Supercritical Fluids: A Review 2010-2017’, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 63(4), pp. 860–884. doi: 10.1021/acs.jced.7b00778.

[28] Machida, H., Takesue, M. and Smith, R. L. (2011). ‘Green chemical processes with

supercritical fluids: Properties, materials, separations and energy', *Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier B.V., 60, pp. 2–15. doi: 10.1016/j.supflu.2011.04.016.

[29] Ben-Naim, A. and Mazo, R. (2002). 'Size Dependence of Solvation Gibbs Energies: A Critique and a Rebuttal of Some Recent Publications', *The Journal of Physical Chemistry B*, 101(51), pp. 11221–11225. doi: 10.1021/jp970257s.

[30] Van Der Kraan, M. *et al.* (2007). 'Equilibrium Study on the Disperse Dyeing of Polyester Textile in Supercritical Carbon Dioxide', *Textile Research Journal*, 77(8), pp. 550–558. doi: 10.1177/0040517507077483.

[31] John, D. M. and Weeks, K. M. (2009). 'Van't Hoff enthalpies without baselines', *Protein Science*. University of Rochester, 9(7), pp. 1416–1419. doi: 10.1110/ps.9.7.1416.

[32] Jaeger, H. *et al.* (2010). 'Model for the differentiation of temperature and electric field effects during thermal assisted PEF processing', *Journal of Food Engineering*, 100(1), pp. 109–118. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.03.034.

[33] Saxena, T. *et al.* (2011). 'Microcircuit modeling and simulation beyond Ohm's law', *IEEE Transactions on Education*, 54(1), pp. 34–40. doi: 10.1109/TE.2010.2041932.

[34] Jaeger, H. *et al.* (2009). 'Protective effect of milk constituents and sublethal injuries limiting process effectiveness during PEF inactivation of *Lb. rhamnosus*', *International Journal of Food Microbiology*, 134(1–2), pp. 154–161. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.007.

[35] Jaeger, H. *et al.* (2012). 'Adjustment of milling, mash electroporation and pressing for the development of a PEF assisted juice production in industrial scale', *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 14, pp. 46–60. doi: 10.1016/j.ifset.2011.11.008.

[36] Wiercigroch, E. *et al.* (2017). 'Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review', *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Elsevier B.V, 185, pp. 317–335. doi: 10.1016/j.saa.2017.05.045.

[37] Gautam, R. *et al.* (2015). 'Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy', *EPJ Techniques and Instrumentation*. EPJ Techniques and Instrumentation, 2(1). doi: 10.1140/epjt/s40485-015-0018-6.

[38] Fagan, C. C. (2014). 'Infrared spectroscopy', *Food Engineering Series*, pp. 73–101. doi:

10.1007/978-1-4939-0311-5_4.

[39] Schulz, H. and Baranska, M. (2007). ‘Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy’, *Vibrational Spectroscopy*, 43(1), pp. 13–25. doi: 10.1016/j.vibspec.2006.06.001.

[40] Barba, F. J. et al. (2015). ‘Effect of Alternative Physical Treatments (Ultrasounds, Pulsed Electric Fields, and High-Voltage Electrical Discharges) on Selective Recovery of Bio-compounds from Fermented Grape Pomace’, *Food and Bioprocess Technology*, 8(5), pp. 1139–1148. doi: 10.1007/s11947-015-1482-3.

[41] Ribas-agustí, A. et al. (2019). ‘Influence of pulsed electric fields processing on the bioaccessible and non- bioaccessible fractions of apple phenolic compounds’, *Journal of Functional Foods*. Elsevier, 59(May), pp. 206–214. doi: 10.1016/j.jff.2019.05.041.

[42] Donsì, F., Ferrari, G. and Pataro, G. (2010). ‘Applications of pulsed electric field treatments for the enhancement of mass transfer from vegetable tissue’, *Food Engineering Reviews*, 2(2), pp. 109–130. doi: 10.1007/s12393-010-9015-3.

[43] Nautiyal Omprakash, H. (2016). ‘Food Processing by Supercritical Carbon Dioxide-Review Omprakash’, *EC Chemistry*, 2.1, pp. 111–135.

[44] Klopotek, Y., Otto, K. and Böhm, V. (2005). ‘Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), pp. 5640–5646. doi: 10.1021/jf047947v.

[45] Rein, M. J. and Heinonen, M. (2004). ‘Stability and Enhancement of Berry Juice Color’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), pp. 3106–3114. doi: 10.1021/jf035507i.

[46] Zhang, Y. et al. (2007). ‘Kinetic analysis of the degradation and its color change of cyanidin-3-glucoside exposed to pulsed electric field’, *European Food Research and Technology*, 224(5), pp. 597–603. doi: 10.1007/s00217-006-0343-8.

[47] Marszałek, K. et al. (2017). ‘The effect of high pressure techniques on the stability of anthocyanins in fruit and vegetables’, *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms18020277.

[48] Yawadio, R. and Morita, N. (2007). ‘Color enhancing effect of carboxylic acids on anthocyanins’, *Food Chemistry*, 105(1), pp. 421–427. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.12.066.

- [49] Patras, A. et al. (2009). 'Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées', *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Elsevier B.V., 10(3), pp. 308–313. doi: 10.1016/j.ifset.2008.12.004.
- [50] Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R. and Martín-Belloso, O. (2009). 'Impact of high-intensity pulsed electric fields variables on vitamin C, anthocyanins and antioxidant capacity of strawberry juice', *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), pp. 93–100. doi: 10.1016/j.lwt.2008.05.008.
- [51] Kazarian, S. G. et al. (1998). 'Partitioning of solutes and cosolvents between supercritical CO₂ and polymer phases', *Journal of Supercritical Fluids*, 13(1–3), pp. 107–112. doi: 10.1016/S0896-8446(98)00041-2.
- [52] Müller, L. et al. (2005). 'Estimation of partition coefficients by MEKC part 2: Anthocyanins', *Journal of Separation Science*, 28(12), pp. 1285–1290. doi: 10.1002/jssc.200500072.
- [53] Koubaa, M. et al. (2017). 'Pulsed Electric Field Processing of Fruit Juices', *Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis*, pp. 437–449. doi: 10.1016/B978-0-12-802230-6.00022-9.
- [54] Baghban, A., Sasanipour, J. and Zhang, Z. (2018). 'A new chemical structure-based model to estimate solid compound solubility in supercritical CO₂', *Journal of CO₂ Utilization*. Elsevier, 26(May), pp. 262–270. doi: 10.1016/j.jcou.2018.05.009.
- [55] Shi, W. et al. (2018). 'Experimental determination and correlation of the solubility of a new reactive disperse orange SCF-AOL2 dye in pure supercritical carbon dioxide fluid', *Fluid Phase Equilibria*. Elsevier B.V., 463, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.fluid.2018.01.009.
- [56] Shi, J. et al. (2009). 'Solubility of lycopene in supercritical CO₂ fluid as affected by temperature and pressure', *Separation and Purification Technology*, 66(2), pp. 322–328. doi: 10.1016/j.seppur.2008.12.012.
- [57] Fossen, T., Rayyan, S. and Andersen, Ø. M. (2004). 'Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols', *Phytochemistry*, 65(10), pp. 1421–1428. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.05.003.

CONCLUSIONES

- En las extracciones con disolventes se obtuvieron cantidades de extracto que van de 1.0527 a 1.196 g. En las extracciones supercríticas las cantidades estuvieron en el rango de 0.0379 a 0.1280 g, a mayores presiones y temperaturas las cantidades fueron mayores.
- En las extracciones supercríticas, la presión de 100 bar y las temperaturas utilizados no fueron suficientes para obtener una cantidad de extracto.
- La cantidad de antocianinas en las extracciones con disolventes estuvieron en el rango de 75.78 a 86.0 mg / L. En las extracciones supercríticas las concentraciones de antocianinas estuvieron entre 108.02 a 235.03 mg / L, a mayores presiones y temperaturas las cantidades fueron mayores.
- La aplicación de PEF como un pre tratamiento a la materia prima tuvo un efecto positivo ayudando a incrementar los valores de algunos parámetros de interés en este proyecto de investigación como lo son la cantidad de extracto, el rendimiento de las extracciones, la cantidad de antocianinas y la solubilidad. A mayores cantidades de potencial eléctrico aplicado se obtuvieron resultados más altos.
- De acuerdo a los valores obtenidos de energía libre, entalpia y entropía, el proceso de extracción supercrítica es no espontaneo, exotérmico e irreversible.
- Las cantidades de energía requerida para el pre tratamiento de PEF se incrementaron al aumentar la cantidad de potencial eléctrico aplicado.
- La colorimetría en los extractos obtenidos con disolventes orgánicos fue similar en todos los casos presentándose tonos rojos muy oscuros. En los extractos obtenidos con fluidos supercríticos las diferencias en la cantidad de antocianinas hicieron que se obtuvieran distintos tonos, en concentraciones bajas predominaron los tonos rojos con tendencia a lo amarillo y valores de luminosidad alrededor de las 82 unidades, mientras que a concentraciones más altas se obtuvieron tonos rojos con tendencia a lo azul y valores de luminosidad alrededor de las 76 unidades.
- La solubilidad aumento con el incremento de presión y temperatura y con la aplicación de un mayor potencial eléctrico. El modelo de Chrastil modificado permitió ajustar los datos de solubilidad experimental obteniéndose valores de AARD que van de 0.34 a 0.37 %.

- En las muestras analizadas mediante espectroscopia IR se identificaron los grupos funcionales de la molécula de pelargonidina-3-glucosido por lo que se confirma la presencia de este compuesto en los extractos obtenidos.

REFERENCIAS

1. Aaby, K. et al. (2012). 'Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 132(1), pp. 86–97. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.10.037.
2. Ade-Omowaye, B. I. O. et al. (2000). 'Impact of high intensity electric field pulses on cell permeabilisation and as pre-processing step in coconut processing', *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1(3), pp. 203–209. doi: 10.1016/S1466-8564(00)00014-X.
3. Ade-Omowaye, B. I. O. et al. (2003). 'Comparative evaluation of the effects of pulsed electric field and freezing on cell membrane permeabilisation and mass transfer during dehydration of red bell peppers', *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4(2), pp. 177–188. doi: 10.1016/S1466-8564(03)00020-1.
4. Alvarez-Suarez, J. M. et al. (2014). 'One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans', *Journal of Nutritional Biochemistry*. Elsevier Inc., 25(3), pp. 289–294. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.11.002.
5. Antolovich, M. et al. (2000). 'Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits', *Analyst*, pp. 989–1009. doi: 10.1039/b000080i.
6. Bagheri, H., Abdul Manap, M. Y. Bin and Solati, Z. (2014). 'Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation', *Talanta*. Elsevier, 121, pp. 220–228. doi: 10.1016/j.talanta.2014.01.007.
7. Bauer, M. and Plehn, T. (2019). 'Further Reading', *Lecture Notes in Physics*, 959, pp. 175–177. doi: 10.1007/978-3-030-16234-4_8.
8. Bhattacharya, M., Srivastav, P. P. and Mishra, H. N. (2014). 'Optimization of process variables for supercritical fluid extraction of ergothioneine and polyphenols from *Pleurotus ostreatus* and correlation to free-radical scavenging activity', *Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier B.V., 95, pp. 51–59. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.031.
9. Bimakr, M. et al. (2011). 'Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves', *Food and Bioprocess Processing*. Institution of Chemical Engineers, 89(1), pp. 67–72. doi: 10.1016/j.fbp.2010.03.002.

10. Bozinou, E. et al. (2019). 'Pulsed Electric Field Extraction and Antioxidant Activity Determination of Moringa oleifera Dry Leaves: A Comparative Study with Other Extraction Techniques', *Beverages*, 5(1), p. 8. doi: 10.3390/beverages5010008.
11. Brunner, G. (2005). 'Supercritical fluids: Technology and application to food processing', *Journal of Food Engineering*, 67(1–2), pp. 21–33. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060.
12. Burton-Freeman, B. et al. (2010). 'Strawberry modulates ldl oxidation and postprandial lipemia in response to high-fat meal in overweight hyperlipidemic men and women', *Journal of the American College of Nutrition*, 29(1), pp. 46–54. doi: 10.1080/07315724.2010.10719816.
13. Castañeda-Ovando, A. et al. (2009). 'Chemical studies of anthocyanins: A review', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 113(4), pp. 859–871. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001.
14. Cavalcanti, R. N. and Meireles, M. A. A. (2012). *Fundamentals of supercritical fluid extraction, Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-381373-2.00039-9.
15. Chemat, F., Vian, M. A. and Cravotto, G. (2012). 'Green extraction of natural products: Concept and principles', *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), pp. 8615–8627. doi: 10.3390/ijms13078615.
16. Cholet, C. et al. (2014). 'Structural and biochemical changes induced by pulsed electric field treatments on cabernet sauvignon grape berry skins: Impact on cell wall total tannins and polysaccharides', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(13), pp. 2925–2934. doi: 10.1021/jf404804d.
17. Chrastil, J. (1982). 'Solubility of solids in supercritical gases', *The Journal of Chemical Physics*, 77(3), pp. 1512–1516. doi: 10.1063/1.443931.
18. Chung, C. et al. (2015). 'Enhanced stability of anthocyanin-based color in model beverage systems through whey protein isolate complexation', *Food Research International*. Elsevier Ltd, 76, pp. 761–768. doi: 10.1016/j.foodres.2015.07.003.
19. CIE Standard (2008). 'Colorimetry -- Part 4: CIE 1976 L*a*b* Colour space', *Iso 11664-4:2008 (Cie S 014-4/E:2007)*, p. 8.
20. Costa, P. et al. (2012). 'Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for the recovery of bioactive compounds from *Lavandula viridis* L'Hér', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 135(1), pp. 112–121. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.108.

21. Da Porto, C., Natolino, A. and Decorti, D. (2014). 'Extraction of proanthocyanidins from grape marc by supercritical fluid extraction using CO₂ as solvent and ethanol-water mixture as co-solvent', *Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier B.V., 87(2014), pp. 59–64. doi: 10.1016/j.supflu.2013.12.013.
22. De Oliveira Alves, C. C. et al. (2008). 'Stability of the microstructure and carotenoids contents of the freeze-dried pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp in the powdered form | Estabilidade da microestrutura e do teor de carotenóides de pós obtidos da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Cam', *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 28(4), pp. 830–839.
23. De Pascual-Teresa, S. and Sanchez-Ballesta, M. T. (2008) 'Anthocyanins: From plant to health', *Phytochemistry Reviews*, 7(2), pp. 281–299. doi: 10.1007/s11101-007-9074-0.
24. Donsì, F., Ferrari, G. and Pataro, G. (2010). 'Applications of pulsed electric field treatments for the enhancement of mass transfer from vegetable tissue', *Food Engineering Reviews*, 2(2), pp. 109–130. doi: 10.1007/s12393-010-9015-3.
25. Edirisinghe, I. et al. (2011). 'Strawberry anthocyanin and its association with postprandial inflammation and insulin', *British Journal of Nutrition*, 106(6), pp. 913–922. doi: 10.1017/S0007114511001176.
26. El Kantar, S. et al. (2018). 'Pulsed electric field treatment of citrus fruits: Improvement of juice and polyphenols extraction', *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Elsevier Ltd, 46, pp. 153–161. doi: 10.1016/j.ifset.2017.09.024.
27. Elez-Martínez, P. and Martín-Belloso, O. (2007). 'Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup', *Food Chemistry*, 102(1), pp. 201–209. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.04.048.
28. Ellis, C. L. et al. (2011). 'Attenuation of meal-induced inflammatory and thrombotic responses in overweight men and women after 6-week daily strawberry (*Fragaria*) intake. A randomized placebo-controlled trial.', *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 18(4), pp. 318–327. doi: 10.5551/jat.6114.
29. Eshtiaghi, M. N. and Knorr, D. (2002). 'High electric field pulse pretreatment: Potential for sugar beet processing', *Journal of Food Engineering*, 52(3), pp. 265–272. doi: 10.1016/S0260-8774(01)00114-5.
30. FAO. (2017). <http://www.fao.org/faostat>.

31. Fincan, M., DeVito, F. and Dejmek, P. (2004). 'Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment', *Journal of Food Engineering*, 64(3), pp. 381–388. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2003.11.006.
32. Forbes-Hernández, T. Y. et al. (2014). 'The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms', *Food and Chemical Toxicology*, 68, pp. 154–182. doi: 10.1016/j.fct.2014.03.017.
33. Forbes-Hernandez, T. Y. et al. (2016). 'The Healthy Effects of Strawberry Polyphenols: Which Strategy behind Antioxidant Capacity?', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(August 2017), pp. S46–S59. doi: 10.1080/10408398.2015.1051919.
34. Fringeli, U. P. (2017). *ATR and Reflectance IR Spectroscopy , Applications*. 3rd edn, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. 3rd edn. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/B978-0-12-803224-4.00104-7.
35. Fujii, T. and Kawasaki, S. ichiro (2019). 'Effects of process parameters on vanillin partition coefficient in water-supercritical CO₂ extraction', *Fluid Phase Equilibria*. Elsevier Ltd, 485, pp. 153–157. doi: 10.1016/j.fluid.2018.12.030.
36. Garlapati, C. and Madras, G. (2009). 'Solubilities of solids in supercritical fluids using dimensionally consistent modified solvate complex models', *Fluid Phase Equilibria*, 283(1–2), pp. 97–101. doi: 10.1016/j.fluid.2009.05.013.
37. Garrigues, S. and de la Guardia, M. (2015). *Vibrational spectroscopy, Handbook of Mineral Elements in Food*. doi: 10.1002/9781118654316.ch15.
38. Ghafoor, K., Park, J. and Choi, Y. H. (2010). 'Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology', *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Elsevier Ltd, 11(3), pp. 485–490. doi: 10.1016/j.ifset.2010.01.013.
39. Giampieri, F. et al. (2012). 'The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health', *Nutrition*, 28(1), pp. 9–19. doi: 10.1016/j.nut.2011.08.009.
40. Giner, J. et al. (2002). 'Inactivation of peach polyphenoloxidase by exposure to pulsed electric fields', *Journal of Food Science*, 67(4), pp. 1467–1472. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb10307.x.
41. Giusti, M. and Wrolstad, R. E. (2005). 'Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy', *Handbook of Food Analytical Chemistry*, 2–2(August 2001), pp. 19–31. doi: 10.1002/0471709085.ch18.

42. González-Paramás, A. M. et al. (2006). 'Flavanol-anthocyanin condensed pigments in plant extracts', *Food Chemistry*, 94(3), pp. 428–436. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.11.037.
43. Guderjan, M. et al. (2005). 'Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils', *Journal of Food Engineering*, 67(3), pp. 281–287. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.04.029.
44. Haberl, S. et al. (2013). 'Cell membrane electroporation-Part 2: The applications', *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 29(1), pp. 29–37. doi: 10.1109/MEI.2013.6410537.
45. Halvorsen, B. L. et al. (2006). 'Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States', *American Journal of Clinical Nutrition*, 84(1), pp. 95–135. doi: 10.1093/ajcn/84.1.95.
46. Hannum, S. M. (2004). 'Potential Impact of Strawberries on Human Health: A Review of the Science', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(1), pp. 1–17. doi: 10.1080/10408690490263756.
47. He, J. and Giusti, M. M. (2010). 'Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties', *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), pp. 163–187. doi: 10.1146/annurev.food.080708.100754.
48. Ibáñez, E., Mendiola, J. A. and Castro-Puyana, M. (2015). *Supercritical Fluid Extraction*. 3rd edn, *Encyclopedia of Food and Health*. 3rd edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00675-9.
49. Izabela, K. and Wei, Z. (2004) 'Anthocyanins-more than nature' s colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, pp. 239–240
50. Jaeger, H. et al. (2010). 'Model for the differentiation of temperature and electric field effects during thermal assisted PEF processing', *Journal of Food Engineering*, 100(1), pp. 109–118. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.03.034.
51. Jaeger, H. et al. (2012). 'Adjustment of milling, mash electroporation and pressing for the development of a PEF assisted juice production in industrial scale', *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 14, pp. 46–60. doi: 10.1016/j.ifset.2011.11.008.
52. Jia, M., Howard Zhang, Q. and Min, D. B. (1999). 'Pulsed electric field processing effects on flavor compounds and microorganisms of orange juice', *Food Chemistry*, 65(4), pp. 445–451. doi: 10.1016/S0308-8146(98)00186-1.

53. John, D. M. and Weeks, K. M. (2009). 'Van't Hoff enthalpies without baselines', *Protein Science*. University of Rochester, 9(7), pp. 1416–1419. doi: 10.1110/ps.9.7.1416.
54. Kanou, M. et al. (2017). 'Mid-infrared spectroscopic analysis of saccharides in aqueous solutions with sodium chloride', *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. Taylor & Francis, 81(4), pp. 735–742. doi: 10.1080/09168451.2016.1277943.
55. Kong, J. M. et al. (2003). 'Analysis and biological activities of anthocyanins', *Phytochemistry*, 64(5), pp. 923–933. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00438-2.
56. Lang, Q. (2001). 'Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies; a practical review', *Talanta*, 53(4), pp. 771–782. doi: 10.1016/S0039-9140(00)00557-9.
57. Larkin, P. J. (2011). 'Chapter 3: Instrumentation and Sampling Methods', *Infrared and Raman Spectroscopy: principles and spectral interpretation*, pp. 27–54. doi: 10.1016/B978-0-12-386984-5.10001-1.
58. Larrosa, M., Tomás-Barberán, F. A. and Espín, J. C. (2006). 'The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(9), pp. 611–625. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.09.004.
59. Lee, J., Rennaker, C. and Wrolstad, R. E. (2008). 'Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods', *Food Chemistry*, 110(3), pp. 782–786. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.03.010.
60. Machida, H., Takesue, M. and Smith, R. L. (2011). 'Green chemical processes with supercritical fluids: Properties, materials, separations and energy', *Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier B.V., 60, pp. 2–15. doi: 10.1016/j.supflu.2011.04.016.
61. Manjare, S. D. and Dhingra, K. (2019). 'Supercritical fluids in separation and purification: A review', *Materials Science for Energy Technologies*. The Authors, 2(3), pp. 463–484. doi: 10.1016/j.mset.2019.04.005.
62. Meyers, K. J. et al. (2003). 'Antioxidant and Antiproliferative Activities of Strawberries', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(23), pp. 6887–6892. doi: 10.1021/jf034506n.
63. Mokhtari, L. and Ghoreishi, S. M. (2019). 'Supercritical carbon dioxide extraction of trans-anethole from *Foeniculum vulgare* (fennel) seeds: Optimization of operating conditions through response surface methodology and genetic algorithm', *Journal of*

- CO₂ Utilization. Elsevier, 30(December 2018), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.jcou.2018.12.018.
64. Montes, C. et al. (2005). ‘Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrcia Jaboticaba* Berg.)’, *Food Research International*, 38(8–9), pp. 983–988. doi: 10.1016/j.foodres.2005.01.016.
65. Naczki, M. and Shahidi, F. (2004). ‘Extraction and analysis of phenolics in food.’, *Journal of chromatography. A*, 1054(1–2), pp. 95–111. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.059.
66. Nilsson, W. B., Seaborn, G. T. and Hudson, J. K. (1992). ‘Partition coefficients for fatty acid esters in supercritical fluid CO₂ with and without ethanol’, *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 69(4), pp. 305–308. doi: 10.1007/BF02636055.
67. Paes, J. et al. (2014). ‘Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids’, *Journal of Supercritical Fluids*, 95, pp. 8–16. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.025.
68. Pasquel Reátegui, J. L. et al. (2014). ‘Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound’, *Journal of Supercritical Fluids. Elsevier B.V.*, 94, pp. 223–233. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.019.
69. Reverchon, E. and De Marco, I. (2006). ‘Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter’, *Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), pp. 146–166. doi: 10.1016/j.supflu.2006.03.020.
70. SAGARPA. (2017). <https://www.gob.mx/agricultura>.
71. Santos, D. N. E. et al. (2015). ‘Study of supercritical extraction from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.) with bioactive compounds’, *Food and Bioproducts Processing. Institution of Chemical Engineers*, 94, pp. 365–374. doi: 10.1016/j.fbp.2014.04.005.
72. Sapkale, G. N. et al. (2010). ‘Supercritical fluid extraction - a review’, *International Journal of Chemical Sciences*, 8(2), pp. 729–743.
73. Seeram, N. P. (2008). ‘Berry fruits for cancer prevention: Current status and future prospects’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), pp. 630–635. doi: 10.1021/jf072504n.

74. Selvamuthukumar, M. and Shi, J. (2017). 'Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries', *Food Quality and Safety*, 1(1), pp. 61–81. doi: 10.1093/fqsafe/fyx004.
75. Soliva-Fortuny, R. et al. (2009). 'Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review', *Trends in Food Science and Technology*, 20(11–12), pp. 544–556. doi: 10.1016/j.tifs.2009.07.003.
76. Son, R. S. et al. (2014). 'Basic Features of a Cell Electroporation Model: Illustrative Behavior for Two Very Different Pulses', *Journal of Membrane Biology*, 247(12), pp. 1209–1228. doi: 10.1007/s00232-014-9699-z.
77. Sovová, H. (2012). 'Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times', *Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier B.V., 66, pp. 73–79. doi: 10.1016/j.supflu.2011.11.004.
78. Sparks, D. L., Hernandez, R. and Estévez, L. A. (2008). 'Evaluation of density-based models for the solubility of solids in supercritical carbon dioxide and formulation of a new model', *Chemical Engineering Science*, 63(17), pp. 4292–4301. doi: 10.1016/j.ces.2008.05.031.
79. Sui, X. et al. (2018). *Anthocyanins in Food*, *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-814026-0.21669-7.
80. Taiwo, K. A., Angersbach, A. and Knorr, D. (2002). 'Influence of high intensity electric field pulses and osmotic dehydration on the rehydration characteristics of apple slices at different temperatures', *Journal of Food Engineering*, 52(2), pp. 185–192. doi: 10.1016/S0260-8774(01)00102-9.
81. Takeoka, G. and Dao, L. (2002). 'Anthocyanins', *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, 2, pp. 219–241. doi: 10.1016/B978-0-12-394807-6.00229-X.
82. Torskangerpoll, K. and Andersen, Ø. M. (2005). 'Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values', *Food Chemistry*, 89(3), pp. 427–440. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.03.002.
83. Týskiewicz, K., Konkol, M. and Rój, E. (2018). 'The application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials', *Molecules*, 23(10). doi: 10.3390/molecules23102625.
84. Wen, D., Jiang, H. and Zhang, K. (2009). 'Supercritical fluids technology for clean biofuel production', *Progress in Natural Science*. National Natural Science Foundation

- of China and Chinese Academy of Sciences, pp. 273–284. doi: 10.1016/j.pnsc.2008.09.001.
85. Williams, C. A. and Grayer, R. J. (2004). ‘Anthocyanins and other flavonoids’, *Natural Product Reports*, 21(4), pp. 539–573. doi: 10.1039/b311404j.
86. Yeom, H. W. et al. (2000). ‘Effects of pulsed electric fields on the quality of orange juice and comparison with heat pasteurization’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), pp. 4597–4605. doi: 10.1021/jf000306p.
87. Zara, J. (2017). ‘Empleo de la Espectroscopia Infrarroja (FT-IR-ATR) como herramienta para la Caracterización del bagazo de caña proveniente de la Sierra Falconiana’, *Química Viva*, 16(3), pp. 17–24.
88. Zunino, S. J. et al. (2012). ‘Effects of dietary strawberry powder on blood lipids and inflammatory markers in obese human subjects’, *British Journal of Nutrition*, 108(5), pp. 900–909. doi: 10.1017/S0007114511006027.

ANEXOS

ANEXO I. ECUACIÓN DE PENG-ROBINSON

Para obtener la solubilidad con la ecuación de Chrastil modificada fue necesario obtener la densidad a las condiciones de presión y temperatura de operación en la extracción con CO₂ supercrítico, para lo cual se utilizó la ecuación de Peng-Robinson.

$$P = \frac{RT}{V_m - b} - \frac{a\alpha}{V_m^2 + 2bV_m - b^2} \quad (\text{I.1})$$

Donde:

$$a = \frac{0.45723553R^2T_c^2}{P_c} \quad (\text{I.2})$$

$$b = \frac{0.07779607RT_c}{P_c} \quad (\text{I.3})$$

$$\alpha = \left(1 + (0.37464 + 1.54226\omega - 0.26992\omega^2)(1 - T_r^{0.5})\right)^2 \quad (\text{I.4})$$

$$T_r = \frac{T}{T_c} \quad (\text{I.5})$$

Se utilizaron los siguientes datos para calcular cada una de las ecuaciones anteriores:

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

T_c = 304.1 K (Temperatura crítica del CO₂)

P_c = 73.8 bar (Presión crítica del CO₂)

ω = 0.204 (Factor acéntrico del CO₂)

T = 313, 323, 333 K (Temperaturas de operación del proceso de extracción supercrítica)

P = 150, 200 bar (Presiones de operación del proceso de extracción supercrítica)

Para calcular el volumen molar con la ecuación de Peng-Robinson se utilizó el complemento *Solver* incluido en el programa Excel.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I.1.

P (bar)	T (°K)	a	b	α	Vm (cm ³ /mol)	ρ (g/L)
150	313	3964323.33	26.67	0.9796	58.81	748.39
	323			0.9572	66.97	657.17
	333			0.9355	78.28	562.23
200	313			0.9796	53.01	830.26
	323			0.9572	57.63	763.63
	333			0.9354	63.34	694.82

Tabla I.1. Parámetros y densidad obtenida con la ecuación de Peng- Robinson

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

PROGRAMA DE MAESTRÍA	MESES																									
Actividad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
Revisión bibliográfica.																										
Pruebas de secado de materia prima																										
Calibración y acondicionamiento de equipo de campos eléctricos pulsados y equipo de extracción con CO ₂ supercrítico																										
Calibración de colorímetro																										
Pruebas de tratamiento de materia prima con campos eléctricos pulsados																										
Pruebas de extracción de antocianinas con CO ₂ supercrítico																										
Secado de materia prima																										
Extracción de antocianinas con solventes y con CO ₂ supercrítico																										
Extracción de antocianinas con solventes y con CO ₂ supercrítico asistido por Campos Eléctricos Pulsados																										
Determinación de antocianinas totales y obtención de datos colorimétricos																										
Calculo del coeficiente de reparto, de propiedades termodinámicas y de la solubilidad																										
Calculo del rendimiento de las extracciones																										
Artículo																										
Tesis																										
Obtención de título de maestría																										