



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**

POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**COMPUESTOS BIOACTIVOS Y POTENCIAL PIGMENTANTE DE
EXTRACTOS DE *Vaccinium corymbosum* L. FRACCIONADOS
CON SISTEMAS ACUOSO-BIFÁSICOS**

TESIS

**Que como requisito parcial para
obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

Presenta:

MAYRA CARRANZA GOMEZ

Bajo la supervisión de: SALVADOR VALLE GUADARRAMA, DR.



APROBADA



Chapingo, Estado de México, diciembre de 2021

COMPUESTOS BIOACTIVOS Y POTENCIAL PIGMENTANTE DE EXTRACTOS DE *Vaccinium corymbosum* L. FRACCIONADOS CON SISTEMAS ACUOSO-BIFÁSICOS

Tesis realizada por **MAYRA CARRANZA GOMEZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR

DR. SALVADOR VALLE GUADARRAMA

ASESOR

DRA. OFELIA SANDOVAL CASTILLA

ASESOR

DR. RICARDO DOMÍNGUEZ PUERTO

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
DEDICATORIAS	ix
AGRADECIMIENTOS	x
DATOS BIOGRÁFICOS	xi
RESUMEN GENERAL	xii
GENERAL ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Objetivo general	3
1.2. Objetivos específicos	3
1.3. Hipótesis	4
1.4. Organización de la tesis	4
1.5. Literatura citada	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1. Arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	8
2.2. Sistemas acuosos bifásicos	10
2.3 Compuestos fenólicos	11
2.4 Antocianinas	12
2.4.1 Estructura	13
2.4.2 Capacidad antioxidante	15

2.4.3 Degradación	16
2.4.3.1 pH	16
2.4.3.2 Enzimas	17
2.4.3.3 Procesamiento	18
2.4.3.4 Color	18
2.4.4 Antocianinas como colorantes	18
2.4.4.1 Influencia del pH en el color	20
2.4.5 Extracción	22
2.3. Literatura citada	22
3. COMPUESTOS BIOACTIVOS Y POTENCIAL PIGMENTANTE DE EXTRACTOS DE <i>Vaccinium corymbosum</i> L. FRACCIONADOS CON SISTEMAS ACUOSOS BIFÁSICOS	38
3.1. Resumen	38
3.2 Abstract	39
3.2. Introducción	40
3.3. Materiales y métodos	41
3.3.1 Sistemas acuosos bifásicos	41
3.3.2 Separación de compuestos bioactivos	42
3.3.2.1. Material vegetal	42
3.3.2.2. Sistemas acuosos bifásicos (ABS)	43
3.3.3. Evaluación de composiciones	43
3.3.3.1. Azúcares totales (AT)	43
3.3.3.2. Flavonoides totales (F)	44
3.3.3.3. Fenoles solubles totales (FST)	44
3.3.3.4. Antocianinas totales (ANT)	45
3.3.3.5. Actividad antioxidante con ensayo FRAP	45

3.3.3.6. Eficiencia de separación.....	45
3.3.4. Extracción convencional con metanol.....	46
3.3.5. Evaluación del potencial pigmentante	46
3.3.5.1. Matriz alimenticia.....	46
3.3.5.2. Preparación de pigmentos	47
3.3.5.3. Curvas de saturación de tono	47
3.3.5.4. Comportamiento del pigmento en el medio líquido	48
3.3.6. Análisis de datos.....	48
3.4. Resultados y discusión	49
3.4.1 Diagrama de fases	49
3.4.2. Separación de compuestos bioactivos.....	50
3.4.3 Extracción metanólica de antocianinas	54
3.4.3. Curvas de tonalidad adquirida por el medio líquido	55
3.4.4. Comportamiento de los extractos	58
3.4.4.1. Cantidades de material pigmentante.....	58
3.4.4.2. Estabilidad de pigmentos.....	58
3.4.4.3. Comportamiento de antocianinas en el medio líquido.....	61
3.4.4.4. pH.....	62
3.5. Conclusiones.....	62
3.6. Literatura citada.....	63
4. CONCLUSIONES GENERALES	69

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Uso permitido de polietilenglicol en condiciones especificadas para ciertas categorías de alimentos o determinados productos alimenticios CODEX Alimentarius (FAO/OMS, 1995).	47
Cuadro 2. pH de las fases obtenidas en sistemas acuosos bifásicos.....	49
Cuadro 3. Valores percentiles de la distribución de Fisher ($\alpha = 0.05$) correspondientes al ANOVA de la separación de compuestos bioactivos mediante sistemas acuosos bifásicos.....	50
Cuadro 4. Concentración de compuestos bioactivos en los extractos de arándano obtenidos mediante ABS.	51
Cuadro 5. Valores percentiles de la distribución de Fisher ($F_{0.05}$) correspondientes al ANOVA de separación de antocianinas en jugo de arándano.	55
Cuadro 6. Modelado de las tendencias en las curvas de saturación de tono del medio líquido con los pigmentos obtenidos con ABS.	57
Cuadro 7. Descripción de los tratamientos para evaluar el potencial pigmentante en un medio líquido.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Identificación estructural de antocianidinas (agliconas) (Castañeda-Ovando, et al., 2009).	14
Figura 2. Estructura de la antocianina cianidina-3-(sinapil)diglusósido-5-glucósido presente en col roja.	17
Figura 3. Distribución de equilibrio de una antocianina general en función del pH de la solución acuosa (Brouillard y Harborne 1988).	21
Figura 4. Antocianinas más comunes en la naturaleza. Los sustituyentes R1 y R2 son H y H) en pelargonidina, con absorción máxima a 494 nm (naranja), OH y H en cianidina (506 nm; rojo-naranja), OMe y H en peonidina (506 nm; rojo-naranja), OH y OH en delphinidina (508 nm; rojo), OMe y OH en petunidina (508 nm; rojo) y OMe y OMe en Malvidina (510 nm; rojo-azulado) (Giusti y Wrolstad, 2003).....	21
Figura 5. Diagrama binodal de fases de la mezcla formada por citrato trisódico (Na3Cit) polietilenglicol 4000 (PEG 4000). Fuente: Carranza-Gomez (2018)...	42
Figura 6. Curvas de tonalidad adquirida por el medio líquido con los pigmentos obtenidos con R15C (A), R30C (B), R15C (C) y R30C (D).....	56
Figura 7. Curvas de tonalidad adquirida para los extractos obtenidos a partir de <i>Vaccinium corymbosum</i> adicionados en bebida para deportistas.....	57
Figura 8. Variación del ángulo de tono en medio líquido pigmentado con los extractos líquidos y liofilizados en condiciones conservativas y deteriorativa. Los círculos cerrados corresponden a condición conservativa y los abiertos a condición deteriorativa. A: extracto líquido obtenido con R15C. B: extracto líquido obtenido con R30C. C: extracto liofilizado obtenido con R15C. D: extracto liofilizado obtenido con R30C.....	59

Figura 9. Comparación de la concentración de antocianinas para cada pigmento en conservación y deterioro. Los círculos cerrados corresponden a condición conservativa y los abiertos a condición deteriorativa. A: extracto líquido obtenido con R15C. B: extracto líquido obtenido con R30C. C: extracto liofilizado obtenido con R15C. D: extracto liofilizado obtenido con R30C. 60

DEDICATORIAS

A Dios y a la vida por guiarme y llenarme de fuerzas.

A mis padres, Laura Gomez y Mario Carranza por todo su amor, sus esfuerzos, su apoyo y dedicación, por ser un gran ejemplo de valentía, por encaminarme y guiarme.

A mi hermano Leonardo, por su compañía, su amor, por su apoyo incondicional y por ser el mejor compañero de vida.

A mi abue Mari, por sus atenciones y su amor en todo momento.

A mis amigos por sus palabras de aliento y su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por ser mi casa de estudios, mi segundo hogar.

Al Departamento de Ingeniería Agroindustrial y a la maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria por formarme con conocimientos y enseñanzas.

Al laboratorio de Atmosferas Controladas por darme un espacio y medios para desarrollar esta investigación

Al Dr. Salvador Valle Guadarrama, por compartir sus conocimientos, su tiempo y por orientarme en mi formación académica y en la realización de esta investigación.

A la Dra. Ofelia Sandoval Castilla, por su atención, su tiempo y su disposición para lograr esta investigación.

AL Dr. Ricardo Domínguez Puerto por su apoyo, su asesoramiento y su tiempo en el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez por su apoyo incondicional para la realización experimental de esta investigación.

DATOS BIOGRÁFICOS

Mayra Carranza Gomez nació en el municipio de Texcoco, Estado de México el 25 de agosto de 1994. Realizó sus estudios de educación media superior en la Escuela Preparatoria Texcoco durante los años 2009 a 2012. En 2012 ingresó a la Universidad Autónoma Chapingo, cursando propedéutico y posteriormente, en 2013 ingresó a la Licenciatura en Ingeniería Agroindustrial egresando en 2017. Durante ese año realizó estancia preprofesional “Apoyo en la implementación de los programas agropecuarios de la SAGARPA”, en DDR 075 SAGARPA Texcoco, Estado de México. En el año 2018 realizó investigación sobre separación de antocianinas de frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) y desarrolló ese tema como proyecto de titulación. En 2019 laboró como Supervisora de Calidad en una empresa de productos lácteos en Texcoco, Estado de México. En este mismo año ingresó a la Maestría en Ciencia y Tecnología, programa perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo.

RESUMEN GENERAL

Compuestos bioactivos y potencial pigmentante de extractos de *Vaccinium corymbosum* L. fraccionados con sistemas acuoso-bifásicos

El fruto de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) posee compuestos bioactivos como fenoles, flavonoides y antocianinas que otorgan beneficios a la salud. Los Sistemas Acuosos Bifásicos (ABS) son una alternativa a la extracción convencional de biomoléculas por su sencillez, selectividad y bajo costo, pero requieren tiempos largos de sedimentación. Los objetivos del trabajo fueron: separar compuestos bioactivos de jugo de arándano mediante ABS basados en sedimentación pasiva y centrifugación y, evaluar el potencial pigmentante de los extractos en un medio líquido. Se obtuvo jugo de arándano mediante molienda y filtrado y se usó como disolvente de polietilenglicol 4000 y citrato de sodio para formar ABS. Se evaluaron manejos con sedimentación pasiva de 15 (R15C) y 30 (R30C) min, seguidos de centrifugación por 15 min y manejo con sedimentación pasiva de 24 h sin centrifugación (R24H). La fase superior de las unidades ABS retuvo casi el total de antocianinas, con concentración de 0.159, 0.172 y 0.131 mg g⁻¹ en R15C, R30C y R24H y no se detectaron estos compuestos en la fase inferior. La fase superior de R15C, R30C y R24H presentó mayor concentración de fenoles (0.286, 0.301 y 0.519 mg g⁻¹), flavonoides totales (0.275, 0.177 y 0.175 mg g⁻¹) y actividad antioxidante (703.375, 777.145 y 785.22 mmol g⁻¹), respecto a la inferior. En contraste, se tuvo más concentración de azúcares en la fase inferior, con los valores mayores en R15C (17.114 mg g⁻¹). Se realizaron pruebas de pigmentación de un medio líquido usando extractos con y sin liofilizar. Se obtuvieron tonalidades con ángulo de tono entre 20 y 30°, las cuales se mantuvieron durante 15 d en condiciones de degradación inducida de las antocianinas. Con ello, se demostró que los extractos obtenidos con ABS son adecuados para pigmentar medios líquidos.

Palabras clave: *Vaccinium corymbosum* L., compuestos bioactivos, potencial pigmentante, sistemas acuosos bifásicos.

Tesis de Maestría en Ciencias en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Ing. Mayra Carranza Gomez.

Director de tesis: Dr. Salvador Valle Guadarrama.

GENERAL ABSTRACT

Bioactive compounds and pigmenting potential of *Vaccinium corymbosum* L. extracts fractionated with aqueous biphasic systems

The blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruit has bioactive compounds such as phenols, flavonoids, and anthocyanins that provide health benefits. Aqueous Biphasic Systems (ABS) constitute an alternative to the conventional extraction of biomolecules due to their simplicity, selectivity, and low cost, but they require long sedimentation times. The objectives of the work were to separate bioactive compounds from blueberry juice using ABS based on passive sedimentation and centrifugation, and to evaluate the pigmenting potential of the extracts in a liquid medium. Blueberry juice obtained through grinding and filtering was used as solvent of polyethylene glycol 4000 and sodium citrate to form ABS. Handling with passive sedimentation during 15 (R15C) and 30 (R30C) min, followed by centrifugation for 15 min were evaluated, and also handling with passive sedimentation of 24 h without centrifugation (R24H). The top phase of the ABS units retained almost the total of anthocyanins, with concentrations of 0.159, 0.172, and 0.131 mg g⁻¹ in R15C, R30C, and R24H, and these compounds were not detected in the bottom phase. The top phase of R15C, R30C, and R24H presented higher concentration of phenols (0.286, 0.301 and 0.519 mg g⁻¹), total flavonoids (0.275, 0.177, and 0.175 mg g⁻¹), and antioxidant activity (703.375, 777.145, and 785.22 mmol g⁻¹) than the bottom one. In contrast, there was higher concentration of sugars in the bottom phase of systems than in the top one, with the highest values in R15C (17.114 mg g⁻¹). Pigmentation tests of a liquid medium were performed using lyophilized and non-lyophilized extracts. Tonalities with hue angle between 20 and 30° were obtained, which were maintained for 15 d under anthocyanins degradative conditions. With this, it was shown that the extracts obtained with ABS are suitable for pigmenting liquid media.

Key words: *Vaccinium corymbosum* L., bioactive compounds, pigmenting potential, aqueous biphasic systems.

Thesis of Master Science. Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Ing. Mayra Carranza Gomez.

Thesis Director: Dr. Salvador Valle Guadarrama.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La demanda de alimentos naturales ha incrementado en los últimos años y el interés de los consumidores por los colorantes naturales empleados en los alimentos no es la excepción. Los principales colorantes naturales incluyen clorofilas, carotenoides, ficocianinas, betalaínas, antocianinas y otros flavonoides, que proporcionan una amplia gama de colores que van desde el verde/amarillo hasta el violeta/azul (de Mejia, Zhang, Penta, Eroglu y Lila, 2020).

Los flavonoles, las proantocianidinas y las antocianinas son las principales sustancias flavonoides que se encuentran en los arándanos (Yang, Shi, Li, Bai y Hou, 2019) ocasionando que las bayas sean fuentes ricas en compuestos bioactivos, principalmente polifenoles, con beneficios comprobados para la salud (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus y Pouységu, 2011; Özçelik, Kartal y Orhan 2011). Por todo esto, los arándanos son cada vez más buscados por el consumidor, por su rico perfil antioxidante y por sus atractivos atributos sensoriales (Giovanelli, Brambilla, Rizzolo y Sinelli, 2012).

Por consiguiente, la recuperación de antocianinas a partir de frutos de arándano, para su aplicación como pigmento natural y, al mismo tiempo, para enriquecer de la matrce alimenticias, por sus propiedades antioxidantes, debe estudiarse para lograr obtener un pigmento estable.

Los métodos convencionales de extracción de estos fitoquímicos se basan en el uso de disolventes orgánicos como mezclas que contienen agua y etanol, metanol o acetona (Bochi et al., 2014). Generalmente, la extracción de antocianinas usa estas mezclas de solventes orgánicos para romper las estructuras celulares y entregar los compuestos en un ambiente acidificado

(Rodríguez-Saona y Wrolstad, 2001). Los sistemas acuosos bifásicos se han propuesto como potentes plataformas para la separación y purificación de biomoléculas de alto valor (Pereira, Freire y Coutinho, 2020). Están compuestos predominantemente de agua, se basan en los principios de la química verde (Assis, Mageste, de Lemos, Orlando y Rodrigues, et al., 2021), su operación continua, su escalamiento es fácil y son de bajo costo (Grilo, Airesbarros y Azevedo, 2016; Walter, Johansson y Brooks, 1991).

Convencionalmente, los sistemas acuosos bifásicos se componen de dos fases inmiscibles basadas en combinaciones de polímero-polímero, sal-polímero o sal-sal que al mezclar estos compuestos en agua, por encima de ciertas concentraciones, se induce la formación de dos fases acuosas inmiscibles (Tian, Berton y Rogers, 2019; Carreira et al., 2021), en donde las moléculas de interés se concentran.

La aplicación de antocianinas como colorantes naturales o aditivos a escala comercial ha estado limitada debido a su baja estabilidad a las condiciones de procesamiento y almacenamiento (Fan et al., 2019; Flores et al., 2015). La extracción de pigmentos de los tejidos vegetales frescos todavía presenta algunos problemas como bajo rendimiento de metabolitos, disponibilidad estacional, deterioro rápido, calidad inconsistente del producto, degradación del pigmento debido al proceso de extracción y almacenamiento (Lila, 2004; Ram et al., 2011).

Aunado a lo anterior, la creciente conciencia del impacto humano en el medio ambiente ha impulsado la 'extracción verde' como un proceso alternativo con respecto a la investigación y el desarrollo científico e industrial (Radošević et al., 2016).

Sin embargo, los sistemas acuosos bifásicos requieren de tiempos largos de sedimentación pasiva para conseguir la separación de compuestos de interés, lo

que puede ser una desventaja para compuestos como antocianinas, pues pueden quedar expuestas a condiciones no adecuadas durante tiempos largos. Al respecto, se ha sugerido que mediante el uso de centrifugación es factible acelerar la separación (García-Cruz et al., 2021) y reducir tiempos de exposición a condiciones deteriorativas, pero ello implica asegurar primero la formación del sistema bifásico.

Al respecto, la importancia de esta investigación fue separar compuestos bioactivos de jugo de arándano, aprovechando su elevado contenido de antocianinas, para obtener un pigmento natural estable en una matriz alimenticia, usando los sistemas acuosos bifásicos basados en sedimentación pasiva y centrifugación y, de esta forma, obtener un alimento coloreado con pigmentos naturales de alto poder antioxidante.

En tal contexto, el presente trabajo se realizó con los siguientes **Objetivos**:

1.1. Objetivo general:

- Separar compuestos bioactivos de jugo de arándano mediante sistemas acuosos bifásicos (ABS) basados en sedimentación pasiva y centrifugación y evaluar el potencial pigmentante de los extractos en un medio líquido.

1.2. Objetivos específicos:

- Evaluar el contenido de antocianinas, fenoles, flavonoides y azúcares, así como la capacidad antioxidante de extractos obtenidos con sistemas acuosos bifásicos.
- Comparar los efectos de una extracción metanólica, extracción metanólica con asistencia de baño ultrasónico y sistemas acuosos bifásicos en la separación de antocianinas presentes en jugo de arándano.

- Evaluar la estabilidad de un pigmento rico en antocianinas obtenido a partir de extractos de sistema acuoso bifásicos, en un medio líquido y en condiciones de degradación inducida.

Asimismo, se plantearon las siguientes **hipótesis**:

1.3. Hipótesis:

- Los sistemas acuoso bifásicos constituyen una alternativa de extracción y recuperación de compuestos bioactivos.
- El jugo de arándano contiene altas concentraciones de antocianinas.
- Las antocianinas de jugo de arándano tienen potencial pigmentante elevado y son estables en condiciones de degradación inducida.

1.4. Organización de la tesis:

El trabajo se realizó en tres etapas. La primera se enfocó a la separación de compuestos bioactivos mediante sistemas acuoso bifásicos a partir de sistemas de polietilenglicol 4000 y citrato de sodio, usando como disolvente jugo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). Los sistemas se reposaron para lograr una sedimentación pasiva y otros se auxiliaron posteriormente con centrifugación, con el objetivo de acortar el tiempo de separación de fases para obtener un extracto rico en antocianinas. La segunda etapa consistió en la cuantificación de fenoles, flavonoides, antocianinas, azúcares y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos en la separación. En la tercera etapa se seleccionó un medio líquido como matriz alimenticia para adicionarle el extracto rico en compuestos bioactivos con y sin liofilización, para lo cual se construyeron curvas de saturación de tono y se evaluó la concentración de antocianinas y el ángulo de matiz en condiciones de degradación inducida durante 15 d.

1.5. Literatura citada

Assis, R.C., Mageste, A. B., de Lemos, L.R., Orlando, R.M. & Rodrigues, G.D. (2021). Application of aqueous two-phase system for selective extraction

- and clean-up of emerging contaminants from aqueous matrices. *Talanta*, 223, 1, 121697.
- Bochi, V.C., Barcia, M.T., Rodrigues, D., Speroni, C.S., Giusti, M.M. & Godoy, H.T. (2014). Polyphenol extraction optimisation from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. *Food Chemistry*, 164, 347-354, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.031>
- Carreira, A., Rocha, S., e Silva, F., Sintra, T., Passos, H., Ventura, S. & Coutinho, J. (2021). Amino-acid-based chiral ionic liquids characterization and application in aqueous biphasic systems. *Fluid Phase Equilibria*, 15, 542–543, 113091. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2021.113091>
- de Mejia, E.G., Zhang, Q., Penta, K., Eroglu, A. & Lila, M.A. (2020). The colors of health: Chemistry, bioactivity, and market demand for colorful foods and natural food sources of Colorants. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11 (1), 145-182.
- Fan, L., Wang, Y., Xie, P., Zhang, L., Li, Y. & Zhou, J. (2019). Copigmentation effects of phenolics on color enhancement and stability of blackberry wine residue anthocyanins: Chromaticity, kinetics and structural simulation. *Food Chemistry*, 275, 299-308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.103>
- Flores, G., del Castillo, M.L.R., Costabile, A., Klee, A., Guergoletto, K.B. & Gibson, G.R. (2015). In vitro fermentation of anthocyanins encapsulated with cyclodextrins: Release, metabolism and influence on gut microbiota growth. *Journal of Functional Foods*, 16, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.022>
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Soto-Hernández, R. M., Guerra-Ramírez, D., Zuleta-Prada, H., Martínez-Damián, M. T., & Ramírez-Valencia, Y. D. (2021). Separation of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) betaxanthins, betacyanins, and soluble phenols through multistage aqueous two-phase systems. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 1791–1804. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02676-1>
- Giovanelli, G., Brambilla, A., Rizzolo, A. & Sinelli, N. (2012). Effects of blanching pre-treatment and sugar composition of the osmotic solution on physico-

- chemical, morphological and antioxidant characteristics of osmodehydrated blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Research International*, 49 (1), 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.015>
- Grilo, A.L., Airesbarros, M.R. & Azevedo, A.M. (2016). Partitioning in aqueous two-phase systems: fundamentals, applications and trends. *Separation & Purification Reviews*, 45, 68-80.
- Lila, M.A. (2004). Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004 (5), 306-313. <https://doi.org/10.1155/S111072430440401X>
- Özçelik, B., Kartal, M. & Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*, 49 (4), 396-402. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.519390>
- Pereira, J. F. B., Freire, M. G. & Coutinho, J. A.P. (2020). Aqueous two-phase systems: Towards novel and more disruptive applications, *Fluid Phase Equilibria*, 505, 112341. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.112341>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 586-621, <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Radošević, K., Ćurko N., Gaurina Srček, V., Cvjetko Bubalo, M., Tomašević, M., Kovačević, K. & Radojčić, I. (2016). Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT*, 73, 45-51, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>
- Ram, M., Prasad, K., Kaur, C., Singh, S., Arora, A. & Kumar, S. (2011). Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of *Rosa hybrida* L. in response to sucrose and ammonical nitrogen levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104 (2), 171-179.
- Rodriguez-Saona, L.E. & Wrolstad, R.E. (2001). Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry F1*, 1-11. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0101s00>

- Tian, H., Berton, P. y Rogers, R.D. (2019). Choline-based aqueous biphasic systems: overview of applications. *Fluid Phase Equilibria*, 502, 112258, <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.112258>
- Walter, H., Johansson, G. & Brooks, D.E. (1991). Partitioning in aqueous two-phase system. *Analytical Biochemistry*, 197, 1-18. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90348-W](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90348-W)
- Yang, J., Shi, W., Li, B., Bai, Y. & Hou, Z. (2019). Preharvest and postharvest UV radiation affected flavonoid metabolism and antioxidant capacity differently in developing blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry*, 301, 125248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125248>

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)

Los arándanos (*Vaccinium* spp.) pertenecen a la familia Ericaceae (Luby et al., 1999). Los frutos de *V. corymbosum* están cubiertos con una piel formada por una epidermis de una sola capa cubierta con una cutícula y una capa cerosa e hipodermis de una o dos capas que contienen pigmentos. Debajo de la piel, hay una amplia capa de parénquima con haces vasculares y células de cálculos. El endocarpio leñoso encierra cinco carpelos con 10 lóculos (Gough, 1994).

La especie *V. corymbosum* es nativa de América del Norte y regiones de Europa (Reque et al., 2014). El continente americano es el mayor productor de arándanos, acumulando tres cuartas partes de la producción mundial (Hidalgo y Almajano, 2017). El arándano alto (*Vaccinium corymbosum*) es uno de los principales frutales cultivados en el sur de Chile, Argentina y Estados Unidos, caracterizado por altos niveles de compuestos fenólicos y flavonoides en sus frutos y hojas (Ribera, Reyes-Díaz, Alberdi, Zuñiga y Mora, 2010; Retamales et al., 2014). Es un cultivo importante bien adaptado a suelos ácidos, pero sensible a la toxicidad de Al^{3+} (Alarcón-Poblete et al., 2020). Por lo que las plantas han desarrollado dos tipos principales de mecanismos para disminuir la toxicidad a este elemento: (i) mecanismos de evitación o exclusión, mediante los cuales la desintoxicación del Al ocurre en la rizosfera a través de la exudación de aniones de ácidos orgánicos que quelan el Al tóxico y lo hacen inofensivo y, (ii) mecanismos de tolerancia, mediante los cuales el Al en las células se desintoxica y se secuestra en la vacuola sin dañar o alterar los procesos biológicos (Yang, Qi, Jiang y Chen, 2013; Zhang, Long, Huang y Xia et al., 2019).

Los arándanos se clasifican como frutas no-climatéricas que muestran una tasa de respiración moderada y una baja producción de etileno, en comparación con otras frutas y con una vida potencial promedio de almacenamiento de dos

semanas (Kader, 2002). La calidad de la fruta es consecuencia de muchos procesos bioquímicos que resultan en cambios de sus propiedades intrínsecas como color, textura, sabor y aroma, junto con el aspecto exterior (tamaño, color y forma) y valor nutricional (Bianchi et al., 2016). Estos frutos son muy apreciados por su calidad, pero tienen vida postcosecha muy corta a temperatura ambiente debido a la descomposición microbiana, daño mecánico y pérdida de humedad y nutrición (Hancock, Callow, Serce, Hanson y Beaudry, 2008). Una de las principales razones de la corta vida útil es el ablandamiento postcosecha, que puede influir no sólo en la calidad de la fruta, sino también en su vida de almacenamiento, capacidad de transporte y resistencia a las enfermedades postcosecha, reduciendo así significativamente el valor comercial de la fruta (Chen et al., 2015). Los problemas de ablandamiento y descomposición de la fruta son comunes a diferentes variedades de arándanos durante el almacenamiento (Hongyu et al., 2021). La vida de almacenamiento de los arándanos se puede extender a baja temperatura, pero se pueden desarrollar picaduras asociadas con la refrigeración, especialmente durante la vida útil posterior (Qian et al., 2014).

Durante la maduración, la dulzura de la fruta aumenta a medida que los ácidos se convierten en azúcares, se utilizan en la respiración o se diluyen por la expansión celular a medida que maduran las bayas (Dai et al., 2009; Famiani et al., 2005). Woodruff, Dewey y Sell (1960) mostraron que el porcentaje de azúcares totales aumentó durante nueve días después del cambio de color en los arándanos, mientras que la acidez titulable disminuyó continuamente durante la maduración de las bayas.

Los arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) son una rica fuente de antioxidantes y se cree que su consumo contribuye a la protección relacionada con los alimentos contra el estrés oxidativo (Oprea et al., 2014). Los antioxidantes se han convertido en una característica de calidad deseable de las bayas debido a sus efectos antiinflamatorios (Kraujalytė, Venskutonis, Pukalskas, Česonienė y Daubaras, 2015). Los arándanos también acumulan flavonoles (principalmente derivados de quercetina), antocianinas, flavan-3-oles y proantocianidinas

(Brownmiller, Howard y Prior et al., 2009; Cho, Howard, Prior y Clark, 2004; Häkkinen y Törrönen, 2000; Wang, Chen, Sciarappa, Wang y Camp, 2008). Debido a esta composición, hay un aumento en el consumo, no sólo de arándano, sino de diversas frutillas, por ser fuentes importante de compuestos fenólicos y, en el caso particular de arándano, también de antocianinas. Estos productos químicos se han encontrado en *Vaccinium corymbosum* en niveles elevados (Li-Yang et al., 2019). Al respecto, se han identificado cinco antocianidinas, de las cuales la cianidina es bastante abundante (Kähkönen y Heinonen, 2003; Wu et al., 2006). De hecho, en vista de su rico contenido en nutrientes, una serie de estudios sobre arándanos han demostrado un alto contenido de antocianinas (Kazan, Sevimli-Gur, Yesil-Celiktas y Dunford, 2016) así como de polifenoles, flavonoides y diversos nutrientes que mejoran el sistema inmunológico humano (Basu, Rhone y Lyons, 2010; Rendeiro et al., 2012).

2.2. Sistemas acuosos bifásicos

La extracción acuosa en dos fases (ATPS) es un procedimiento de separación basado en la mezcla de dos polímeros, un polímero y una sal (Raja et al., 2011; Ventura et al., 2011) o la mezcla de un solvente orgánico y una sal (Rodríguez-Salazar y Valle-Guadarrama, 2020). Entre los polímeros están el polietilenglicol, el dextrano, la polivinolpirrolidona, el poli (óxido de etileno), el poli (óxido de propileno) (da Rocha et al., 2011; Rosa, Ferreira, Azevedo y Aires-Barros, 2010; Sadeghi y Maali, 2016). Entre las sales están citratos, fosfatos y sulfatos (Jiménez-Velázquez et al., 2020; Rodríguez-Salazar y Valle-Guadarrama, 2020), entre otros, y entre los solventes orgánicos están la acetona (Rodríguez-Salazar y Valle-Guadarrama, 2020) y el propanol (García-Cruz et al., 2021), entre otros. En ciertas concentraciones, relativamente bajas, la mezcla forma una solución homogénea en una sola fase, pero, en otras concentraciones mayores, la mezcla se desestabiliza y forma dos fases inmiscibles que se separan, entre las cuales se reparten los componentes presentes (Raja et al., 2011). En virtud de que las soluciones y las fases formadas usan al agua como disolvente, al procedimiento también se le llama Sistemas Acuosos Bifásicos. En el proceso la mezcla se separa en dos fases inmiscibles, una ligera que se ubica como fase superior y es

rica en el polímero o el solvente orgánico, y otra pesada, que resulta como fase inferior, y es rica en el segundo polímero o la sal. En el sistema se genera una interfaz más o menos nítida entre las fases superior e inferior (Albertsson, 1986). Normalmente, con ATPS formado por un polímero y una sal se obtiene, por sedimentación, una fase superior enriquecida con el polímero y una fase inferior enriquecida con la sal (Tomaz et al., 2021).

En comparación con los métodos de extracción líquido-líquido convencionales, el ATPS es mucho más simple y más respetuoso con el medio ambiente (Zhijian et al., 2012). Las principales ventajas del ATPS polímero-sal o polímero- líquidos iónicos (IL), en comparación con los sistemas polímero-polímero, se basan en su menor viscosidad y la posibilidad de cambiar las polaridades de las fases coexistentes. Además, suelen mostrar una rápida separación de fases y altas eficiencias de extracción que pueden manipularse fácilmente mediante una selección adecuada de los componentes (Freire et al., 2012).

El procedimiento de extracción acuosa en dos fases se apoya, con frecuencia, en el uso de diagramas binodales de fase que permiten identificar regiones donde se producen dos fases inmiscibles y por tanto permite una selección adecuada de las condiciones de trabajo (Han et al., 2010).

2.3 Compuestos fenólicos

El arándano es particularmente rico en compuestos fenólicos tales como antocianinas, derivados del ácido hidroxicinámico y flavonoles (Zhong et al., 2017). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas (Lima et al., 2019) que pueden clasificarse según su estructura carbonada en flavonoides, cumarinas, taninos y ácidos fenólicos (Stamogiannou et al., 2021). Los compuestos fenólicos generalmente se refieren a compuestos producidos por la sustitución de átomos de hidrógeno en el anillo de benceno de hidrocarburos aromáticos con grupos hidroxilo, y se pueden dividir en monofenoles y polifenoles, según el número de grupos hidroxilo contenidos en sus moléculas. Químicamente, según el número y los elementos estructurales de

los grupos fenólicos, los polifenoles se pueden dividir en cuatro categorías: flavonoides, estilbenos, lignanos y ácidos fenólicos (Manach et al., 2004).

Los compuestos fenólicos se encuentran predominantemente en el reino vegetal y se presentan tanto en formas solubles como insolubles. Se producen principalmente en el retículo endoplásmico de las células vegetales y en otras regiones intracelulares. Los compuestos fenólicos solubles se presentan tanto en forma libre como esterificada y se encuentran en las vacuolas de la planta. Sin embargo, los compuestos fenólicos insolubles unidos se encuentran en la matriz de la pared celular y se unen covalentemente a macromoléculas insolubles como la celulosa, arabinoxilano y la pectina, entre otras (Leah et al., 2021; Shahidi y Yeo, 2016).

La estructura molecular de los compuestos fenólicos presenta un anillo aromático que lleva uno o más grupos hidroxilo y puede ser una molécula simple o polimerizada. Estos compuestos ejercen importantes propiedades antioxidantes asociadas principalmente con la presencia de grupos hidroxilo en su estructura molecular (Lima et al., 2019). De hecho, los compuestos fenólicos constituyen uno de los principales metabolitos secundarios y compuestos bioactivos de la planta, que han recibido un interés creciente por sus diversas propiedades biológicas como antioxidantes, antiinflamatorios, antibacterianos, efectos anticancerígenos, antiobesidad, cardioprotectores, vasodilatadores y otros alivios de trastornos metabólicos (Cai et al., 2018; Gowd et al., 2019; Rodríguez-Pérez et al., 2019).

Se acepta que el contenido de fenólicos en las frutillas no sólo se ve afectado por las diferencias genéticas, las condiciones ambientales previas a la cosecha, sino también por el grado de madurez en la cosecha (Zadernowski, Naczki y Nesterowicz, 2005).

2.4 Antocianinas

Las antocianinas (del griego anthos = flor y kianos = azul) responsables del color azul, púrpura y rojo de muchos tejidos vegetales (Williams y Grayer, 2004) son los pigmentos solubles en agua más importantes de las plantas vasculares. Son

inocuos y de fácil incorporación en medios acuosos, lo que los hace interesantes para su uso como colorantes naturales (Pazmiño-Durán, Giusti, Wrolstad, & Glória, 2001). Se distribuyen ampliamente en la dieta humana a través de cultivos, frijoles, verduras y vinos tintos (Harborne y Grayer 1988). Además, están presentes en los pétalos de las flores para atraer a los polinizadores y en los frutos y semillas como atrayentes para los dispersores de semillas (Willson y Whelen, 1990), lo que sugiere que ingerimos cantidades considerables de antocianinas de las dietas diarias basadas en plantas (Takanori, Fumihiko y Toshihiko, 1999).

Las antocianinas pueden absorberse en la circulación sanguínea en forma intacta o degradada y administrarse a casi todo el tejido para ejercer diversas actividades biológicas (Li et al., 2019) debido a que son potentes antioxidantes y captadores efectivos de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno (Kähkönen y Heinonen, 2003; Kähkönen, Hopi, y Heinonen, 2001). Reducen el riesgo de diabetes y actividad anticancerígena, previenen enfermedades neuronales y cardiovasculares (Yousuf, Gul, Wani y Singh, 2016) y enfermedades crónicas (Alvarez-Suarez et al., 2014; Wu et al., 2014). Se utilizan cada vez más en lugar de sus contrapartes sintéticas debido al atractivo color y su no toxicidad (Cassidy, 2018).

2.4.1 Estructura

Las antocianinas pertenecen a la clase extendida de compuestos fenólicos denominados colectivamente flavonoides (Williams y Grayer, 2004), que se clasifican típicamente en flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles y antocianinas, según la estructura y conformación del anillo de oxígeno heterocíclico (anillo C) de la molécula básica (Wang, Provan y Helliwell, 2000).

Las antocianidinas son las estructuras básicas de las antocianinas (o agliconas) que consisten en un anillo aromático [A] unido a un anillo heterocíclico [C] que contiene oxígeno, que también está unido por un enlace carbono-carbono a un tercer anillo aromático [B] (Konczak y Zhang, 2004). Cuando las antocianidinas se encuentran en su forma de glucósido (unidas a un resto de azúcar), se las

conoce como antocianinas (Castañeda-Ovando et al., 2009). La estructura básica de una antocianina incluye dos anillos de benceno unidos por una cadena lineal de tres carbonos (C2-C4), representada como el sistema C6-C3-C6 (Lee, Park, Choi y Jung, 2013).

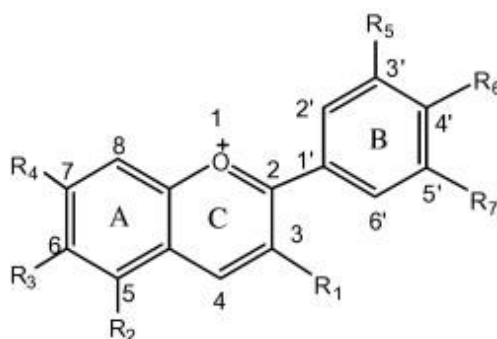


Figura 1. Identificación estructural de antocianidinas (agliconas) (Castañeda-Ovando et al., 2009).

Las antocianinas son glucósidos de derivados polihidroxi y polimetoxi de sales catiónicas de 2-fenilbenzopirilio (Yi, Fischer, Krewer y Akoh, 2005) y se derivan en 18 antocianidinas mediante la adición de restos de azúcar (Dongnan et al., 2016). Se diferencian entre sí por el número y posición de los grupos hidroxilo y/o metilo y por la naturaleza, número, posición y acilación de los azúcares presentes en su estructura.

Se han aislado e identificado más de 700 antocianinas en varias especies de plantas (Brooks y Celli, 2019) y 23 antocianidinas, de las cuales sólo seis se encuentran frecuentemente distribuidas en la naturaleza y en los alimentos: cianidina (50%), delphinidina, pelargonidina y peonidina (12%) y petunidina y malvidina (7%) (Castañeda-Ovando et al., 2009).

Las antocianinas en solución acuosa se hidrolizan primero para formar aglicona y luego se transforman en chalcona, y finalmente se descomponen en 2,4,6-trihidroxibenzaldehído y ácido p-hidroxilbenzoico o sus derivados (Sadilova, Carle y Stintzing, 2007). Tienen estructuras flavonoides típicas, actúan como

poderosos captadores de radicales libres contra oxidantes redundantes como el oxígeno reactivo y las especies de nitrógeno (Leong, Burritt, Hocquel, Penberthy y Oey, 2017). Se ha demostrado que la actividad biológica de las antocianinas está muy relacionada con sus estructuras químicas (por ejemplo, tipo de aglicona, tipo y número de glicosilación y presencia de grupos acilantes) (Heim, Tagliaferro y Bobilya, 2002; Jing et al., 2008).

2.4.2 Capacidad antioxidante

La alta capacidad antioxidante de las antocianinas se debe a la donación del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo fenólico (OH), que se beneficia de la remediación de la deficiencia de electrones en el flavonoide mediante la conjugación de electrones π (Lu, Qiang, Li, Zhang, y Zhang, 2014), lo que da lugar a una excelente capacidad de captación de radicales libres de la antocianina. Hasta la fecha, existen dos mecanismos principales para describir la actividad antioxidante *in vitro* de las antocianinas: mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) y mecanismo de transferencia de un solo electrón (SET) (Huang, Ou, y Prior, 2005; Leopoldini, Marino, Russo, y Toscano, 2004).

Las antocianinas pueden mostrar actividad antioxidante directa en relación con especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante los dos mecanismos mencionados. Con respecto al mecanismo HAT, el antioxidante dona un átomo de hidrógeno (protón y electrón) al radical libre, convirtiéndolo así en un producto más estable. Esta reacción convierte el antioxidante en un radical en sí mismo, pero uno que es mucho menos reactivo que el radical libre inicial y, por lo tanto, el proceso de oxidación se inhibe en general. En el mecanismo SET, el radical libre se estabiliza mediante la aceptación de un electrón del antioxidante, convirtiéndose la propia molécula antioxidante en un catión intermedio de radicales (Liang y Kitts, 2014). La minimización de la interacción entre las especies de ROS y otros compuestos como iones metálicos o lípidos puede prevenir una mayor oxidación y la formación de compuestos nocivos (Ghiselli, Serafini, Natella y Scaccini, 2000).

2.4.3 Degradación

Las antocianinas son muy inestables y fácilmente susceptibles de degradación (Bursać et al., 2015). Entre los factores que causan degradación están temperatura, luz, pH, disolventes, oxígeno, interacciones no covalentes con otras antocianinas (autoasociación) o compuestos incoloros (copigmentación intermolecular), coordinación con iones metálicos y reacciones covalentes con otros compuestos presentes en el medio (Fanzone et al., 2015). Cuando se produce la degradación de una antocianina, también se pueden producir compuestos poliméricos (Scalzo et al., 2016). A continuación, se describen los factores que influyen en la degradación de antocianinas.

2.4.3.1 pH

La estabilidad de las antocianinas durante el procesamiento depende particularmente del pH del medio. La base de carbinol es inestable, por lo que la oxidación de las antocianinas es proporcional al porcentaje de esta forma, que se potencia con los tratamientos térmicos (Chichester y McFeeters, 1970).

Las antocianinas existen en equilibrio de cuatro especies moleculares; el catión de flavilio básico coloreado y tres estructuras secundarias; se forman las bases quinoidales, la pseudobase carbinol y la pseudobase chalcona. A pH 2 o inferior, predomina la forma de catión de flavilio, pero a medida que el pH se eleva a 7, la pseudobase de chalcona incolora comienza a dominar. La formación de chalcona también se ve favorecida por temperaturas elevadas y la exposición prolongada puede aumentar la degradación entre los anillos B y C, dando como resultado la destrucción del cromóforo de antocianina (Strack y Wray, 1993, Clifford, 2000). Un aumento de la hidroxilación aumenta su inestabilidad, mientras que un aumento de la glucosilación confiere una mayor estabilidad (Schwartz, Von Elbe, y Giusti, 2008).

Se cree que la inusual estabilidad del pH del color de las antocianinas de col lombarda (Figura 2) se debe a la presencia de estos grupos acilo que "impiden la hidrólisis de la forma catiónica del flavilio rojo a la base carbinol incolora, lo que permite la formación preferencial de las bases quinoidales azules" (Bridle y

Timberlake, 1997). La glicosilación en las posiciones 3 y 5 desplaza el color hacia el azul y la estabilidad del color también puede verse influenciada por la pigmentación intramolecular (Maulien-Aubert, Dangles, y Amiot, 2001). En condiciones alcalinas, los compuestos fenólicos se oxidan a quinonas que interactúan con las cadenas laterales de las proteínas a través de enlaces covalentes (Ozda, Capanoglu y Altay, 2013). Las quinonas pueden interactuar de manera irreversible con los grupos sulfhidrilo y amino de las proteínas para formar enlaces covalentes (C-N o C-S) a través de los anillos fenólicos (Xiaonan et al., 2018).

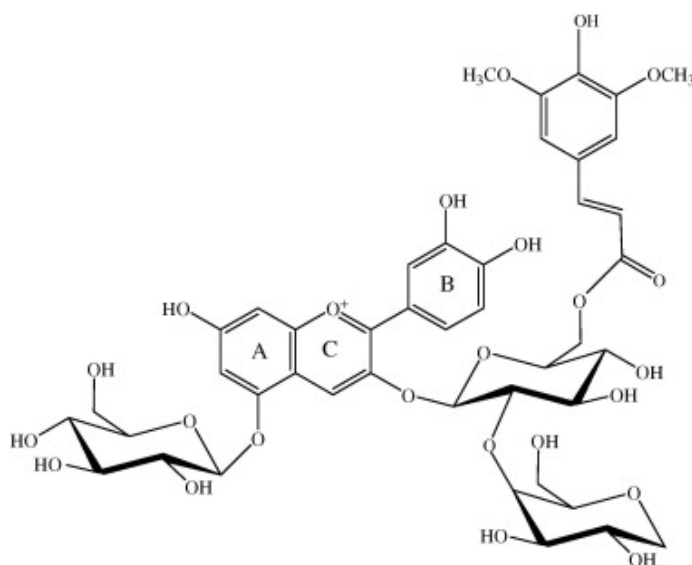


Figura 2. Estructura de la antocianina cianidina-3-(sinapil)diglucósido-5-glucósido presente en col roja.

2.4.3.2 Enzimas

La antocianasa, fenoloxidasas y peroxidasas son las principales enzimas que influyen en la estabilidad de las antocianinas (Markakis, 1982) y la presencia en el fruto de enzimas capaces de dividir el enlace glucosídico en las antocianinas produce agliconas menos estables, lo que hace que los pigmentos sean más susceptibles a la oxidación (Chichester y McFeeters, 1970; Harborne, 1977). Sin embargo, al seleccionar el pH y la temperatura óptimos se podría inhibir la

degradación enzimática y aumentar la extracción de antocianinas (Mok y Hettiarachchy, 1991; Pifferi y Vassari, 1983).

2.4.3.3 Procesamiento

Las antocianinas se degradan fácilmente a compuestos incoloros o de color marrón durante el procesamiento y almacenamiento, lo que da como resultado la pérdida de funcionalidad y calidad de los productos. La estabilidad de las antocianinas depende de la temperatura, luz, enzimas, iones metálicos, azúcares, ácido ascórbico, oxígeno y la presencia de otros compuestos fenólicos (Nayak, Berrios, Powers y Tang, 2011).

2.4.3.4 Color

El trabajo de Jeffrey Harborne y el de muchos otros han demostrado claramente cómo las antocianinas con la misma estructura cromofórica pueden dar lugar a muchos colores diferentes (Goodwin, 1988; Harborne, 1993). La co-pigmentación, comúnmente iniciada por flavonas, flavonoles y glucósidos, estabiliza las formas estructurales coloreadas de las antocianinas y, en consecuencia, mejora la coloración final (Gómez-Míguez, González-Manzano, Escribano-Bailón, Heredia y Santos-Buelga, 2006).

2.4.4 Antocianinas como colorantes

Las antocianinas pueden ser alternativas potenciales a los colorantes sintéticos, por su color brillante, naturaleza soluble en agua y posibles beneficios para la salud, como antioxidantes, antitumorales, antidiabéticos y disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares (Giusti y Wrolstad, 2003; Leong, Show, Lim, Ooi, y Ling, 2018). Las antocianinas son adecuadas para ser utilizadas como compuestos colorantes naturales debido a sus atractivos colores rojo y púrpura brillantes y a su solubilidad en agua, que permite su fácil incorporación en sistemas alimentarios acuosos (Rodríguez-Saona, Giusti y Wrolstad, 2008; Rodríguez-Saona, Glusti, y Wrolstad, 1999). No obstante, su uso puede plantear problemas de inestabilidad cromática cuando se encuentran fuera de su entorno

natural, ya que se ven afectados por factores como pH, temperatura, luz y oxígeno o interacciones con otros componentes coexistentes, entre otros (Santos-Buelga y González-Paramás, 2019). Este efecto se explica químicamente por el apilamiento de los grupos acilo con el anillo de pirilio del catión flavilio, que reduce la susceptibilidad del ataque nucleófilo del agua sobre las moléculas de antocianina hidrófilas y la formación de una pseudobase incolora y formas de calcona de color amarillo claro (Sasaki, Nishizaki, Ozeki y Miyahara, 2014; Santos-Buelga y González-Paramás, 2019).

Los tres cromóforos principales, pelargonidina, cianidina y delphinidina, se presentan generalmente solos u ocasionalmente como mezclas y, esencialmente, todas las flores rosadas, escarlatas y rojo anaranjado contienen pelargonidina, todas las flores carmesí y magenta contienen cianidina y todas las flores malva y azules contienen delphinidina. Las antocianinas son hidrófilas y generalmente están presentes en las vacuolas de las células vegetales (Gillian y Cooper, 2001).

Las antocianinas naturales tienen poderosas capacidades colorantes y a valores de pH ácido sólo se requieren pequeñas concentraciones de estos compuestos para obtener los colores rojo, rosa y morado deseados en los productos alimenticios (Mateus y Freitas, 2009). En condiciones ácidas, el color de las antocianinas mono y no aciladas se determina en gran medida por sustitución en el anillo B de la aglicona (Jackman y Smith, 1996).

En los sistemas conjugados, las antocianinas son específicamente importantes porque son responsables de algunos colores rojos en la naturaleza, como antocianinas monoméricas, oligoméricas y poliméricas. El uso de extractos naturales de estos pigmentos como aditivos alimentarios tiene algunas limitaciones, debido a la variación de color provocada por cambios de pH, exposición a la luz y oxígeno (Bridle y Timberlake, 1997, Markakis, 1982).

Existen algunas limitaciones para el uso de antocianinas como colorantes alimentarios. Es bien conocida la influencia del pH en su color, así como el efecto blanqueador de la adición de sulfito. En soluciones acuosas, las antocianinas

comunes existen como una mezcla de varias estructuras en equilibrio químico: catión flavilio (rojo), anhidrobase quinonoidal (azul), pseudobase de carbinol (incolora) y chalcona (incolora o amarillo claro). A pH inferiores a 2, las antocianinas existen básicamente en forma catiónica; a medida que aumenta el pH, se produce una desprotonación rápida para producir formas quinonoides. En medios acuosos, la hidratación del catión flavylum da la forma hemiacetal en equilibrio con una chalcona. A temperatura ambiente y en medios ligeramente ácidos, el equilibrio entre las formas carbinol y chalcona es muy lento y se requieren horas para que se alcance. El aumento de temperatura desplaza los equilibrios hacia las formas de calcona. El equilibrio de hidratación se establece más rápidamente para los 3,5-diglucósidos de antocianina que para los 3-glucósidos correspondientes. Las cantidades relativas de todas estas formas estructurales varían tanto con el pH como con la estructura de la antocianina (Heredia, Francia-Aricha, Rivas-Gonzalo, Vicario y Santos-Buelga, 1998). En general, las antocianinas muestran su mayor intensidad de color en la forma de iones flavilio (Harborne y Williams, 1995).

2.4.4.1 Influencia del pH en el color

Se sabe que las antocianinas se presentan en diferentes formas químicas que difieren en color según el pH de la solución (Figura 3) (Strack, Wray, Dey y Harborne, 1989). A pH 1, el catión flavylum (de color rojo) es la especie predominante (estructura I). Entre valores de pH de 2 y 4, predomina la especie quinoidea azul (estructuras II-IV). A valores de pH de 5 y 6, se forman dos especies incoloras, que tienen pseudobase de carbinol (estructura V) y estructuras de chalcona (estructura VI), respectivamente. A valores de pH más altos (≥ 7), las moléculas de antocianina se degradan rápidamente.

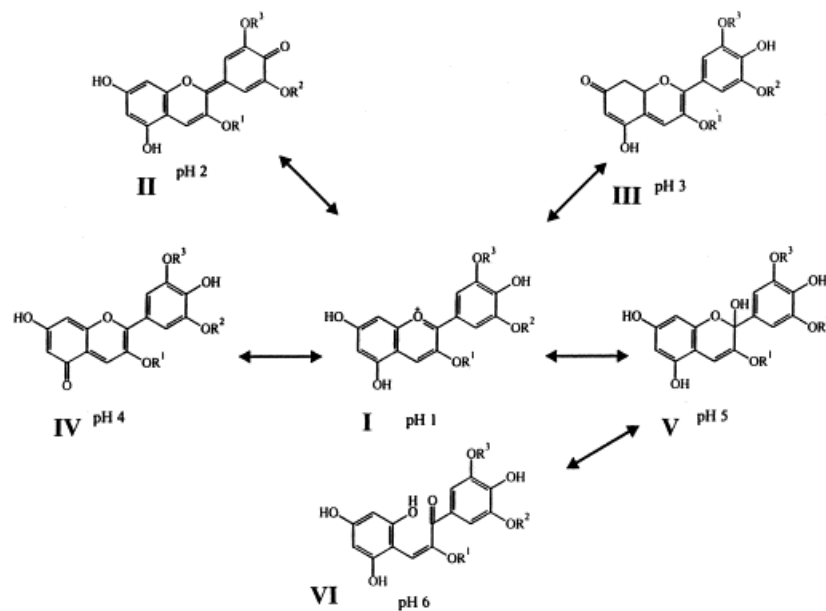


Figura 3. Distribución de equilibrio de una antocianina general en función del pH de la solución acuosa (Brouillard y Harborne 1988).

Mazza y Miniati (1993) informaron que el aumento de la sustitución de hidroxilo en el anillo B da como resultado un cambio del máximo de absorción visible (λ_{max}) a longitudes de onda más largas (cambio bathocrómico) para producir un tono más azul (Figura 4).

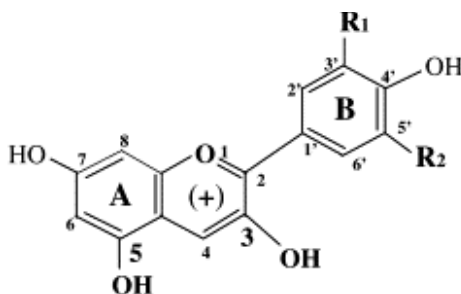


Figura 4. Antocianinas más comunes en la naturaleza. Los sustituyentes R1 y R2 son H y H en pelargonidina, con absorción máxima a 494 nm (naranja), OH y H en cianidina (506 nm; rojo-naranja), OMe y H en peonidina (506 nm; rojo-naranja), OH y OH en delphinidina (508 nm; rojo), OMe y OH en petunidina (508 nm; rojo) y OMe y OMe en Malvidina (510 nm; rojo-azulado) (Giusti y Wrolstad, 2003).

2.4.5 Extracción

Las antocianinas en diferentes materiales vegetales se extraen generalmente a través del método convencional, que se basa en la extracción sólido-líquido, donde se agitan soluciones acidificadas de diferentes solventes (etanol, metanol y acetona) y materia prima (Cai et al., 2016; Patil, Madhusudhan, Ravindra, y Raghavarao, 2009). La extracción de un colorante natural de antocianinas se puede llevar a cabo utilizando el método tradicional de solvente orgánico, pero la extracción tradicional con solvente consume mucho tiempo y requiere cantidades relativamente grandes de solventes, como etanol y metanol (Rouskova, Heyberger, Triska, y Krticka, 2011). El consumo de enormes disolventes no se ajusta a los requisitos de protección ecológica y ambiental en las fábricas modernas (Zhang, Wang, Luo, L.F. & King, 2014).

Un procedimiento de extracción eficiente debe maximizar la recuperación de antocianinas con una cantidad mínima de adyuvantes y una degradación o alteración mínima de su estado natural. Varios procedimientos de extracción empleados para la extracción de antocianina son eficientes, pero los extractos no son seguros para el consumo humano debido a los posibles efectos tóxicos de los disolventes residuales. Los disolventes como el etanol, el metanol y la acetona se utilizan generalmente para la extracción de colores naturales. Sin embargo, algunos de estos disolventes son tóxicos para la salud (como el metanol/acetona). Además, la presencia de disolventes incluso relativamente más seguros (como el alcohol) en el extracto de color natural puede limitar su aplicación como colorante alimentario (Patil et al., 2009). Además, los disolventes convencionales utilizados en este proceso no son selectivos. Así, los extractos obtenidos mediante disolventes convencionales contienen grandes cantidades de contaminantes como azúcar, alcoholes de azúcar, ácidos orgánicos, aminoácidos y proteínas (Chandrasekhar, Madhusudhan y Raghavarao, 2012).

2.3. Literatura citada

Alarcón-Poblete, E., González-Villagra, J., Magnum de Oliveira, S. F., Nunes-Nesi, A., Inostroza-Blancheteau, C., Alberdi, M. & Reyes-Díaz, M. (2020).

- Metabolic responses of *Vaccinium corymbosum* L. cultivars to Al³⁺ toxicity and gypsum amendment. *Environmental and Experimental Botany*, 176, 104119, <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104119>.
- Albertsson, P.Å. (1986). Partition of Cell Particles and Macromolecules: Separation and Purification of Biomolecules, Cell Organelles, Membranes, and Cells in Aqueous Polymer Two-Phase systems and Their Use in Biochemical Analysis and Biotechnology (third ed.), Wiley, New York.
- Alvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F., Tulipani, S., Casoli, T., Di Stefano, G., Gonzalez-Paramas, A.M., Santos-Buelga C., Busco F., Quiles J.L., Cordero M.D., Bompadre S., Mezzetti B. & Battino M., (2014). One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25, 289-294. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.11.002>
- Basu, A., Rhone, M. & Lyons, T.J. (2010). Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition Reviews*, 68 (3), 168-177.
- Bianchi, T., Guerrero, L., Gratacós-Cubarsí, M., Claret, A., Argyris, J., Garcia-Mas, J. & Hortós, M. (2016). Textural properties of different melon (*Cucumis melo* L.) fruit types: sensory and physical-chemical evaluation. *Scientia Horticulturae*, 201, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.028>
- Bridle, P. & Timberlake, C.F. (1997). Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry*, 58 (1–2), 103-109. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00222-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00222-1)
- Brooks, M.S. & Celli, G.B. (2019). Anthocyanins from Natural Sources: Exploiting Targeted Delivery for Improved Health. *Royal Society of Chemistry*.
- Brouillard, R. & Harborne in, J.B. (1988). The Flavonoids: Advances in Research since 1980, *Academic Press*, New York, 525.

- Brownmiller, C., Howard, L.R. & Prior, R.L. (2009). Processing and storage effects on procyanidin composition and concentration of processed blueberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1896-1902.
- Bursać, D., Predrag, P., Dragović-Uzelac, V., Vahčić, N., Skendrović, M. & Branka L. (2015). Influences of organically and conventionally grown strawberry cultivars on anthocyanins content and color in purees and low-sugar jams. *Food Chemistry*, 181, 94-100.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.063>
- Cai, R., Yuan, Y., Cui, L., Wang, Z. & Yue, T. (2018). Cyclodextrin-assisted extraction of phenolic compounds: Current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 19-27.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.015>
- Cai, Z., Qu, Z., Lan, Y., Zhao, S., Ma, X., Wan, Q., Jing, P. & Li, P. (2016). Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. *Food Chemistry*, 197, 266-272.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.110>
- Cassidy, A. (2018). Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 76-82.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.05.002>
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A. & Galán-Vidal C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 4, 859-871.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>
- Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M.C. & Raghavarao, K.S.M.S. (2012). Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 4, 615-623.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.07.004>
- Chen, H.J., Cao, S.F., Fang, X.J., Mu, H.L., Yang, H.L., Wang, X., Xu, Q.Q. & Gao, H.Y. (2015). Changes in fruit firmness, cell wall composition and cell

wall degrading enzymes in postharvest blueberries during storage. *Scientia Horticulturae*, 188, 44-48.

Chichester, C. & McFeeters, R. (1970). Pigment degeneration during processing and storage. In *The biochemistry of fruit and their products* (Vol. II). London: *Academic Press*.

Cho, M.J., Howard, L.R., Prior, R.L. & Clark, J.R. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1771-1782.

Clifford, M.N. (2000). Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1063-1072.

da Rocha, P.P., Barbosa, M.A., Rodrigues, d.L.L., Moreira, M.d.C.R., Mendes, d.S.L.H. & Hespanhol, d.S.M.C. (2011) Phase diagram and thermodynamic modeling of PEO + organic salts +H₂O and PPO + organic salts +H₂O aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, 305, 1-8.

Dai, Z.W., Vivin, P., Robert, T., Milin, S., Li, S.H. & Genard, M. (2009). Model-based analysis of sugar accumulation in response to source-sink ratio and water supply in grape (*Vitis vinifera*) berries. *Functional Plant Biology*, 36, 527-540.

Dongnan Li, Xianjun Meng & Bin Li. (2016). Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 47, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.09.005>

Famiani, F., Cultrera, N.G.M, Battistelli, A., Casulli, V., Proietti, P., Standardi, A., Chen, Z.-H., Leegood, R.C. & Walker, R.P. (2005). Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its potential role in the catabolism of organic acids in the flesh of soft fruit during ripening. *Journal of Experimental Botany*, 56, 2959-2969.

- Fanzone, M., González-Manzano, S., Pérez-Alonso, J., Escribano-Bailón, M.T., Jofré, V., Assof, M. & Santos-Buelga, C. (2015). Evaluation of dihydroquercetin-3-O-glucoside from Malbec grapes as copigment of malvidin-3-O-glucoside. *Food Chemistry*, 175, 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.123>
- Freire, M.G., Cláudio, A.F.M., Araújo, J.M.M., Coutinho, J.A.P., Marrucho, M.I., Canongia-Lopes, J.N. & Rebelo, L.P.N. (2012). Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. *Chemical Society Reviews*., 41, 4966-4995.
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Soto-Hernández, R. M., Guerra-Ramírez, D., Zuleta-Prada, H., Martínez-Damián, M. T., & Ramírez-Valencia, Y. D. (2021). Separation of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) betaxanthins, betacyanins, and soluble phenols through multistage aqueous two-phase systems. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 1791–1804. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02676-1>
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. & Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 1106-1114. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00394-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00394-4)
- Gillian A. y Cooper-Driver. (2001). Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry*, 56, 3, 229-236. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00455-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00455-6)
- Giusti, M. & Wrolstad, R. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their application in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14 (3), 217-225. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00221-8)
- Gómez-Míguez, M., González-Manzano, S., Escribano-Bailón, M.T., Heredia, F.J. & Santos-Buelga, C. (2006). Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (15), 5422-5429.

- Gough, R.E. (1994). The Highbush Blueberry and Its Management. *Food Products Press*, Haworth Press, Inc., Binghamton, NY.
- Gowd, V., Karim, N., Shishir, M.R.I., Xie, L. & Chen, W. (2019). Dietary polyphenols to combat the metabolic diseases via altering gut microbiota. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 81-93. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.005>
- Goodwin, T.W. (1988). Plant pigments. *Academic Press*, London.
- Häkkinen, S.H. & Törrönen, A.R. (2000). Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: Influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 33, 517-524. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00086-7)
- Han, J., Yu, C., Wang, Y., Xie, X., Yan, Y., Yin, G. & Guan, W. (2010). Liquid–liquid equilibria of ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and sodium citrate/tartrate/acetate aqueous two-phase systems at 298.15K: Experiment and correlation. *Fluid Phase Equilibria*, 295, 1, 98-103, <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2010.03.044>
- Hancock, J., Callow, P., Serce, S., Hanson, E. & Beaudry, R. (2008). Effect of cultivar, controlled atmosphere storage, and fruit ripeness on the long-term storage of highbush blueberries. *HortTechnology*, 18, 199-205.
- Harborne, J.B. (1977). Introduction to ecological biochemistry. *Academic Press, London*.
- Harborne, J.B. (1993). Biochemistry of plant pollination. Introduction to Ecological Biochemistry. (4th Edition), *Academic Press, London*, 36–70.
- Harborne, J.B. & Williams, C.A. (1995). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 12 (6), 639-657.
- Harborne, J.B. & Grayer, R.J. (1988). The Flavonoids (Harborne, JB, Ed.), 1-20, *Chapman y Hall, Londres*.

- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. & Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (10), 572-584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Heredia, F.J., Francia-Aricha, E.M., Rivas-Gonzalo, J.C., Vicario I.M. & Santos-Buelga C. (1998). Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes—I. pH effect. *Food Chemistry*, 63 (4), 491-498. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00051-X).
- Hidalgo, G. I. & Almajano, M. (2017). Red fruits: Extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: A review. *Antioxidants*, 6 (1), 7, <https://doi.org/10.3390/antiox6010007>
- Hongyu, D., Shujuan, J., Xin, Z., Baodong, W., Shunchang, C., Fan, Z., Siyao, W. & Qian, Z. (2021). Postharvest effects of sodium nitroprusside treatment on membrane fatty acids of blueberry (*vaccinium corymbosum*, cv. Bluecrop) fruit. *Scientia Horticulturae*, 288, 110307, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110307>.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 21, 1841-1856.
- Jackman, R.L. & Smith, J.L. (1996). Anthocyanins and betalains, in: G.A.F. Hendry, J.D. Houghton (Eds.). *Natural Food Colorants*, 2nd ed., Blackie A&P, Great Britain, Chapter 8.
- Jiménez-Velázquez, P., Valle-Guadarrama, S., Alia-Tejacal, I., Salinas-Moreno, Y., García-Cruz, L., Pérez-López, A., & Guerra-Ramírez, D. (2020). Separation of bioactive compounds from epicarp of ‘Hass’ avocado fruit through aqueous two-phase systems. *Food and Bioproducts Processing*, 123, 238–250. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.07.004>
- Jing, P., Bomser, J.A., Schwartz, S.J., He, J., Magnuson, B.A. & Giusti, M.M.n. (2008). Structure-function relationships of anthocyanins from various

- anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (20), 9391-9398.
- Kader, A. (2002). Postharvest biology and technology: an overview. A.A. Kader (Ed.), *Postharvest Technology of Horticultural Crops*, Publication 3311, University of California Agriculture and Natural Resources, 39-47.
- Kähkönen, M.P. & Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (3), 628-633.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I. & Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4076-4082.
- Kazan, A., Sevimli-Gur, C., Yesil-Celiktas, O. & Dunford, N.T. (2016). In vitro tumor suppression properties of blueberry extracts in liquid and encapsulated forms. *European Food Research and Technology*, 243 (6), 1-7.
- Konczak, I. & Zhang, W. (2004). Anthocyanins-more than nature's colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004 (5), 239-240.
- Kraujalytė V., Venskutonis P., Pukalskas A., Česonienė L. & Daubaras R. (2015). Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chemistry*, 188, 583-590. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.031>
- Leah Paranavitana, Won Young Oh, JuDong Yeo & Fereidoon Shahidi. (2021). Determination of soluble and insoluble-bound phenolic compounds in dehulled, whole, and hulls of green and black lentils using electrospray ionization (ESI)-MS/MS and their inhibition in DNA strand scission. *Food Chemistry*, 361. 130083. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130083>
- Lee, M.J., Park, J.S., Choi, D.S. & Jung, M.Y. (2013). Characterization and quantitation of anthocyanins in purple-fleshed sweet potatoes cultivated in

- Korea by HPLC-DAD and HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (12), 3148-3158.
- Leong, H.Y., Show, P.L., Lim, M.H., Ooi, C.W. & Ling, T.C. (2018). Natural red pigments from plants and their health benefits: a review. *Food Reviews International*, 34, 463-482.
- Leong, S.Y., Burritt, D.J., Hocquel, A., Penberthy, A. & Oey, I. (2017). The relationship between the anthocyanin and vitamin C contents of red-fleshed sweet cherries and the ability of fruit digests to reduce hydrogen peroxide-induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 227, 404-412. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.110>
- Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N. & Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds H-atom versus electron transfer. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108, 4916-4922.
- Li, X., Guo, J., Jiang, X., Sun, J., Tian, L., Jiao, R, Tang, Y., Bai, W. (2019). Cyanidin-3-O-glucoside protects against cadmium-induced dysfunction of sex hormone secretion via the regulation of hypothalamus-pituitary-gonadal axis in male pubertal mice. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.033>
- Li-Yang, Kailing-Cai, Hangyin-Huang, Yihui-Zhang, Yu-Zong, Shijia-Wang, Jialu-Shi, Xueping-Li, Fanglei-Liao, Mei-Lu & Weidong-Guo. (2019). Comparative analysis of anatomy, gene expression of *Vaccinium corymbosum* cyclins and cyclin dependent kinases during the flower bud and fruit ontogeny. *Scientia Horticulturae*, 251, 252-259. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.028>
- Liang, N. & Kitts, D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*. Basel Switz., 19, 19180-19208.
- Lima, M.C., Paiva de Sousa C., Fernandez-Prada C., Harel J., Dubreuil J.D. & de Souza E.L. (2019). A review of the current evidence of fruit phenolic

- compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis*, 130, 259-270. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.025>
- Lu, L., Qiang, M., Li, F., Zhang, H. & Zhang, S. (2014). Theoretical investigation on the antioxidative activity of anthocyanidins: a DFT/B3LYP study. *Dyes and Pigments*, 103, 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.12.015>
- Luby, J.J., Ballington, J.R., Draper, A.D., Pliska, K. & Austin, M.E. (1999). Blueberries and cranberries (*Vaccinium*). In *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops*; Moore, J.N., Ballington, J.R., Eds.; ISHS: Wageningen, The Netherlands, 391–456.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79, 727-747.
- Markakis, P. (1982). Stability of anthocyanins in food. P. Markakis (Ed.), *Anthocyanins as food colors*, Academic Press Inc., London, UK, 163-180.
- Mateus, N. & Freitas, V. (2009). Anthocyanins as Food Colorants. *Anthocyanins - Biosynthesis, Functions and Applications*. In C. Winefield, K. Davies, & K. Gould (Eds.). New York, NY: Springer New York. <http://doi.org.conricyt.remotexs.co/10.1007/978-0-387-77335-3>.
- Maulien-Aubert, C., Dangles, O. & Amiot, M.J. (2001). Colour stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intramolecular and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 249, 170-176.
- Mazza, G. y Miniati, E. (1993). Introduction: Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains, CRC Press, *Boca Raton*, FL, Chapter 1.
- Mok, C. & Hettiarachchy, N.S. (1991). Heat stability of sunflower-hull anthocyanin pigment. *Journal of Food Science*, 56, 553-556.
- Nayak, B., Berrios, J., Powers, J.R. & Tang, J. (2011). Thermal degradation of anthocyanins from purple potato (Cv. Purple Majesty) and impact on

antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 11040-11049

- Oprea E., Ruta L., Nicolau I., Popa C., Neagoe A. & Farcasanu I. (2014). *Vaccinium corymbosum* L. (blueberry) extracts exhibit protective action against cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Food Chemistry*, 152, 516-521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.020>
- Ozdal, T., Capanoglu, E. & Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51, 954-970. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>
- Patil, G., Madhusudhan, M.C., Ravindra Babu, B. & Raghavarao, K.S.M.S. (2009). Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48, 1, 364-369. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2008.05.006>
- Pazmiño-Durán, A.E., Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. & Glória, B.A. (2001). Anthocyanins from *oxalis triangularis* as potential food Colorants. *Food Chemistry*, 75 (2), 211-216. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00201-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00201-1)
- Pifferi, P.G. & Vassari, A. (1983). The anthocyanins of sunflower: II. A study of the extraction process. *International Journal of Food Science & Technology*, 18, 629-633.
- Qian Zhou, Chao Ma, Shunchang Cheng, Baodong Wei, Xiuying Liu & Shujuan Ji. (2014). Changes in antioxidative metabolism accompanying pitting development in stored blueberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 88, 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.10.003>
- Raja, S., Murty, V.R., Thivaharan, V., Rajasekar, V. & Ramesh, V. (2011). Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – a review. *Science and Technology*, 1, 7–16. <https://doi.org/10.5923/j.scit.20110101.02>

- Rendeiro, C., Vauzour, D., Kean, R.J., Butler, L.T., Rattray, M., Spencer, J.P. & Williams, C.M. (2012). Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal bdnf mrna expression in young rats. *Psychopharmacology*, 223 (3), 319-330.
- Reque, P.M., Steffens, R.S., Silva, A.M.D.A., Jablonski, A., Flôres, S.H., Rios de A.O., et al. (2014). Characterization of blueberry fruits (*Vaccinium* spp.) and derived products. *Food Science and Technology*, 34 (4), 773-779, <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6470>
- Retamales, J.B., Palma, M.J., Morales, Y.A., Lobos, G.A., Moggia, C.E. & Mena, C.A. (2014). Blueberry production in Chile: current status and future developments. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36 (1), 58-67.
- Ribera, A., Reyes-Díaz, M., Alberdi, M., Zuñiga, G. & Mora M. (2010). Antioxidant compounds in skin and pulp of fruits change among genotypes and maturity stages in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in southern Chile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10, 509-536.
- Rodríguez-Pérez, C., Segura-Carretero, A. & del Mar Contreras, M. (2019). Phenolic compounds as natural and multifunctional anti-obesity agents: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59 (8), 1212-1229, <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1399859>
- Rodríguez-Salazar, N., Valle-Guadarrama, S., (2020). Separation of phenolic compounds from roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces with aqueous two-phase extraction based on sodium citrate and polyethylene glycol or acetone. *Separation Science and Technology*, 55(13), 2313-2324. <https://doi.org/10.1080/01496395.2019.1634730>
- Rodriguez-Saona, L.E., Giusti, M.M. & Wrolstad, R.E. (1999). Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *Journal of Food Science*, 64 (3), 451-456.

- Rodriguez-Saona, L.E., Giusti, M.M. & Wrolstad, R.E. (2008). Expanding the potato industry: Exotic-colored fleshed tubers. *ACS Symposium Series*, 983, 114-130, <https://doi.org/10.1021/bk-2008-0983.ch009>
- Rosa, P.A.J., Ferreira, I.F., Azevedo, A.M. & Aires-Barros, M.R. (2010). Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2296–2305. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.034>
- Rouskova, M., Heyberger, A., Triska, J. & Krticka, M. (2011). Extraction of phytosterols from tall oil soap using selected organic solvents. *Chemical Papers*, 65, 805-812.
- Sadeghi, R. & Maali, M. (2016). Toward an understanding of aqueous biphasic formation in polymerepolymer aqueous systems. *Polymer*, 83, 1-11.
- Sadilova, E., Carle, R. & Stintzing, F.C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 1461-1471.
- Santos-Buelga, C. & González-Paramás, A.M. (2019). In Melton, L., Shahidi, F., & Varelis, P. (Eds.), *Encyclopedia of Food Chemistry*, 1, 10–21.
- Sasaki, N., Nishizaki, Y., Ozeki, Y. & Miyahara, T. (2014). The role of acyl-glucose in anthocyanin modifications. *Molecules*, 19 (11), 18747-18766.
- Scalzo, R.L., Fibiani, M., Francese, G., D'Alessandro, A., Rotino, G.L., Conte, P. & Mennella, G. (2016). Cooking influence on physico-chemical fruit characteristics of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Food Chemistry*, 194, 835-842. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.063>
- Schwartz, S.J., Von Elbe, J.H. & Giusti, M. (2008). Colorants. S. Damodaran, K.L. Parkin, O.R. Fennema (Eds.), *Fennema's Food Chemistry* (4th ed), CRC Press, Boca Raton, FL, 571-638.
- Shahidi, F. & Yeo, J.D. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21, 216.

- Stamogiannou, I., Van Camp, J., Smagghe, G., Van de Walle, D., Dewettinck, K. & Raes, K. (2021). Impact of phenolic compound as activators or inhibitors on the enzymatic hydrolysis of cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 174-180. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.052>
- Strack, D. & Wray, V. (1993). Anthocyanins. *Methods in Plant Biochemistry, Plant Phenolics*, 1, Academic Press, London. 325-356.
- Strack, D., Wray V., Dey in P.M. & Harborne J.B. (1989). Methods in Plant Chemistry, Vol. 1, *Plant Phenolics*, Academic Press, San Diego, CA, Ch. 9, 329.
- Takanori, T., Fumihiko, H. & Toshihiko, O., (1999). Absorption and metabolism of cyanidin 3-O- β -D-glucoside in rats. *FEBS Letters*, 449, 2–3, 179-182. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00407-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00407-X)
- Tomaz, J., Mathias, R., Ramos, M., Rodrigues de Lemos, L., Barbosa, A. & Dias G. (2021). Extraction of estrogen hormones from water samples using an aqueous two-phase system: A new approach for sample preparation in the analysis of emerging contaminants. *Microchemical Journal*, 166, 106231. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106231>.
- Ventura Sónia, P.M., Sousa Sílvia, G., Freire Mara, G., Serafim Luísa, S., Lima Álvaro, S. & Coutinho João, A.P. (2011). Design of ionic liquids for lipase purification. *Journal of Chromatography B.*, 879, 26, 2679-2687. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.022>.
- Wang, H., Provan, G.J. & Helliwell, K. (2000). Tea flavonoids: Their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 11 (4–5), 152-160. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00061-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00061-3)
- Wang, S.Y., Chen, C.T., Sciarappa, W., Wang, C.Y. & Camp, M.J. (2008). Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5788-5794.

- Williams, C.A. & Grayer, R.J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural product reports*, 21, 539-573.
- Willson, M.F. & Whelen, C.J. (1990). The evolution of fruit color in fleshy-fruited plants. *The American Naturalist*, 136, 790-809.
- Woodruff, R.E., Dewey, D.H. & Sell, H.M. (1960). Chemical changes of Jersey and Rubel blueberry fruit associated with ripening and deterioration. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 75, 387-401.
- Wu, T., Tang, Q., Yu, Z., Gao, Z., Hu, H. & Chen, W. (2014). Inhibitory effects of sweet cherry anthocyanins on the obesity development in C57BL/6 mice International. *Journal of Food Science and Nutrition*, 65, 351-359.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E. & Prior, R.L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (11), 4069-4075.
- Xiaonan, S., Hongbo, S., Baokun, Q., Min, Y., Yang, L. & Lianzhou, J. (2018). Functional and conformational changes to soy proteins accompanying anthocyanins: Focus on covalent and non-covalent interactions. *Food Chemistry*, 245, 871-878. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.090>
- Yang, L.T., Qi, Y.P., Jiang, H.X. & Chen, L.S. (2013). Roles of organic acid anion secretion in aluminium tolerance of higher plants. *BioMed Research International*, 173682. <https://doi.org/10.1155/2013/173682>
- Yi, W., Fischer, J., Krewer, G. & Akoh, C.C. (2005). Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7320-7329.
- Yousuf, B., Gul, K., Wani, A.A. & Singh, P. (2016). Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56 (13), 2223 – 2230.

- Zadernowski, R., Naczek, M. & Nesterowicz, J. (2005). Phenolic acid profiles in some small berries. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2118-2124.
- Zhang, B., Wang, L., Luo, L.F. & King, M.W. (2014). Natural dye extracted from Chinese gall - the application of color and antibacterial activity to wool fabric. *Journal of Cleaner Production*, 80, 204-210. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.05.100>
- Zhang, X., Long, Y., Huang, J. & Xia, J. (2019). Molecular mechanism for coping with Al toxicity in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (7), 1551. <https://doi.org/10.3390/ijms20071551>
- Zhijian T., Fenfang L. & Xuelei X. (2012). Isolation and purification of aloe anthraquinones based on an ionic liquid/salt aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*, 98, 150-157, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.06.021>
- Zhong, S., Sandhu, A., Edirisinghe, I. & Burton-Freeman, B. (2017). Characterization of wild blueberry polyphenols bioavailability and kinetic profile in plasma over 24-h period in human subjects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61 (12), 1-13, <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700405>

3. COMPUESTOS BIOACTIVOS Y POTENCIAL PIGMENTANTE DE EXTRACTOS DE *Vaccinium corymbosum* L. FRACCIONADOS CON SISTEMAS ACUOSOS BIFÁSICOS

3.1. Resumen

Las bayas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) se han popularizado en los últimos años debido a su elevado contenido de compuestos bioactivos que otorgan beneficios a la salud humana por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, cardioprotectoras y neuroprotectoras, y que al adicionarlos en un alimento lo pudiera convertir en alimento funcional. Los sistemas acuosos bifásicos (ABS) se han posicionado como un método para la separación de fitoquímicos por su bajo costo, nobleza con el medio ambiente y fácil operación continua. No obstante, este tipo de sistemas se basan en procesos de sedimentación pasiva y requieren tiempos prolongados de separación. El objetivo fue obtener compuestos bioactivos a partir de jugo de arándano mediante sistemas acuosos bifásicos con el uso de sedimentación pasiva y centrifugación para así obtener un pigmento y evaluar su potencial pigmentante con y sin liofilizar en un medio líquido en condiciones de degradación durante 15 d. Los ABS se formaron con polietilenglicol 4000 y citrato de sodio, usando como disolvente jugo de arándano, posteriormente se cuantificaron fenoles, flavonoides, antocianinas, azúcares y actividad antioxidante en los extractos obtenidos. Se seleccionó un medio líquido donde se incorporaron los extractos con y sin liofilizar para cuantificar antocianinas y ángulo de tono ($^{\circ}\text{h}$) en condiciones de degradación. Los tratamientos apoyados de la centrifugación concentraron mayor contenido de antocianinas (0.172 mg g^{-1}) respecto a la sedimentación pasiva (0.131 mg g^{-1}). El pigmento con liofilización se mantuvo alrededor de 25° ($^{\circ}\text{h}$) hasta el día 13 donde el ángulo de tono sobrepasó los 45° .

Palabras clave: *Vaccinium corymbosum* L., compuestos bioactivos, pigmentos naturales, sedimentación pasiva.

BIOACTIVE COMPOUNDS AND PIGMENTING POTENTIAL OF *Vaccinium corymbosum* L. EXTRACTS FRACTIONATED WITH AQUEOUS BIPHASIC SYSTEMS

3.2 Abstract

Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) have become popular in recent years for their high content of bioactive compounds that provide benefits to human health due to their antioxidant, anti-inflammatory, cardioprotective, and neuroprotective properties, and that when they are added to a food this could turn into functional food. Aqueous biphasic systems (ABS) have been positioned as a method for the separation of phytochemicals due to their low cost, environmental friendliness, and easy continuous operation. However, these types of systems are based on passive sedimentation processes and require prolonged separation times. This research aimed to obtain bioactive compounds from blueberry juice through aqueous biphasic systems with the support of passive sedimentation and centrifugation, in order to obtain a pigment and evaluate its pigmenting potential with and without lyophilization in a liquid medium under degradation conditions for 15 d. The ABS were formed with polyethyleneglycol 4000 and sodium citrate, using blueberry juice as solvent. Subsequently, phenols, flavonoids, anthocyanins, sugars, and antioxidant activity were quantified in the extracts obtained. A liquid medium was selected where the extracts with and without lyophilized were incorporated to quantify anthocyanins and tone angle (°h) under degradation conditions. Treatments supported by centrifugation concentrated higher anthocyanin content (0.172 mg g^{-1}) compared to passive sedimentation (0.131 mg g^{-1}). The pigment based on lyophilization was kept around 25° (°h) up to day 13, where the tone angle exceeded 45° .

Key words: *Vaccinium corymbosum* L., bioactive compounds, natural pigments, passive sedimentation.

3.2. Introducción

El color es una propiedad esencial de los alimentos y bebidas que influye en las expectativas del consumidor sobre la identidad, el sabor, la calidad general de un producto (Galaffu, Bortlik y Michel, 2015), la seguridad anticipada, la calidad sensorial, la preferencia y la selección de productos alimenticio (Cardello, 1996; Clydesdale, 1993; Fernández-Vázquez et al., 2011; Tuorila et al., 2008). En pocas palabras, es la primera cualidad visual que los consumidores evalúan y es fundamental para la aceptación del producto (Nevado, Cabanillas y Salcedo, 1995).

Actualmente, los colorantes sintéticos se obtienen a partir del petróleo, utilizando energía convencional, que ahora se considera nociva para el medio ambiente y que no es renovable (Pensri et al., 2021). Es importante la investigación entorno a los pigmentos de origen vegetal, en el sentido que el estudio de la obtención, estabilización e identificación de estos fitoquímicos es una oportunidad de desarrollar alternativas a los colorantes sintéticos.

Las antocianinas pertenecen a los compuestos fenólicos y son responsables de la pigmentación de diferentes partes de las plantas como flores, frutos, hojas, tallos, raíces y órganos de almacenamiento (Alcalde-Eon, Escribano-Bailon, Santos-Buelga, & Rivas-Gonzalo, 2006). La estabilización de las antocianinas sigue siendo un gran desafío y constituye un tema importante para la industria de colorantes alimentarios (Cortez, Luna-Vital, Margulis y González de Mejía, 2016). En comparación con los colorantes artificiales, las antocianinas enfrentan algunos desafíos en la industria alimentaria, como las enzimas de degradación, las condiciones de pH, la exposición a la luz y las altas temperaturas, que impactan negativamente en el rendimiento del color (Celli y Brooks, 2017). En tal sentido, la extracción y aislamiento de los pigmentos es un proceso importante y crítico debido a su alta susceptibilidad a la degradación (Azeredo, 2009).

Durante mucho tiempo, la extracción de antocianinas se ha realizado con el uso de disolventes orgánicos como el metanol, pero actualmente se investigan otros métodos de extracción amigables con el medio ambiente como es el caso de los Sistemas Acuoso Bifásicos (ABS), que constituyen un método de extracción

líquido-líquido donde sus dos fases están formadas principalmente por agua (Deng et al., 2011). Ésta extracción líquido-líquido tiene superioridad sobre la extracción habitual con disolventes orgánicos en términos de retención de la bioactividad del producto y salud ambiental (Nosaibah y Rahmat, 2021), por lo que representa una superioridad muy impresionante en comparación con muchas otras técnicas de extracción en términos de evitar la contaminación ambiental (Tian et al., 2021).

Este método basado en sistemas acuosos bifásicos se basa en mezclas de dos polímeros, un polímero y una sal o un solvente orgánico y una sal (Rodríguez-Salazar y Valle-Guadarrama, 2020). El procedimiento requiere normalmente de tiempos largos de sedimentación pasiva, lo que puede constituir una desventaja en la separación de compuestos como antocianinas, por su eventual afectación por factores como presencia de luz, pH, alta temperatura (Bursać et al., 2015). Al respecto, se ha reportado que el uso de centrifugación puede acelerar el proceso de separación de fases (García-Cruz et al., 2021) y reducir el tiempo de exposición a condiciones no adecuadas. En tal sentido, el objetivo del trabajo fue obtener compuestos bioactivos a partir de jugo de arándano mediante sistemas acuosos bifásicos con el uso de sedimentación pasiva y centrifugación para así obtener un pigmento y evaluar su potencial pigmentante.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1 Sistemas acuosos bifásicos

Se eligió un sistema basado en citrato trisódico (Na_3Cit) y polietilenglicol 4000 (PEG 4000). Se utilizó el diagrama binodal de fases correspondiente a este sistema descrito por Carranza-Gómez (2018) y mostrado en la Figura 5, donde los puntos A y B corresponden a mezclas con composición (Na_3Cit , PEG 4000) de (2.4455, 38.3314%) y (35.8495, 1.1922%), respectivamente, cuya unión forma, por un lado, la curva binodal, que separa la región de sistemas monofásicos de la región de sistemas bifásicos y, por otro, la línea de operación principal, sobre la cual están localizados los estados C(30.282, 7.3825%), D(24.715, 13.5725%), E(19.1475, 19.762%), E'(17.73, 21.33%), F(13.551,

25.952%) y G(8.013, 32.142%), que corresponden a mezclas que forman dos fases inmiscibles, una superior, de composición mayoritariamente polimérica y otra inferior, de composición mayoritariamente salina.

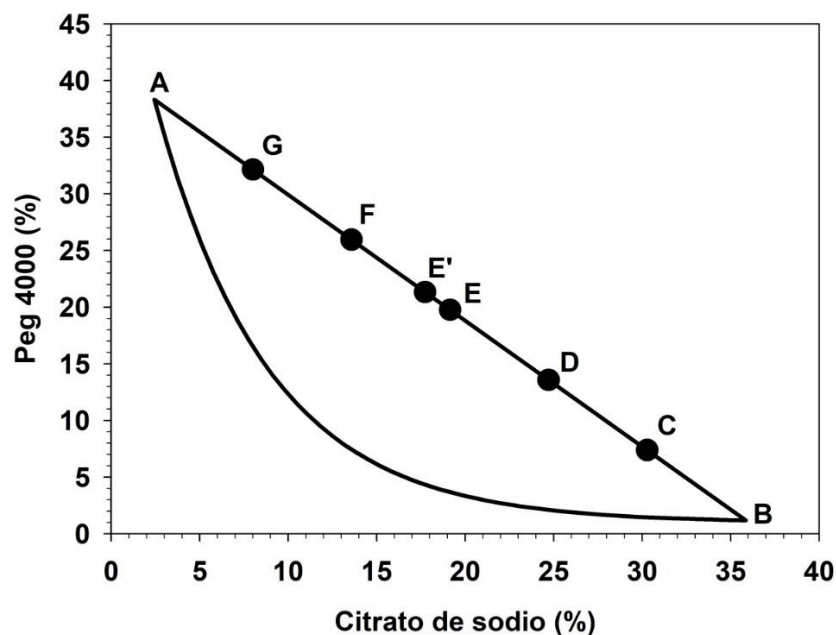


Figura 5. Diagrama binodal de fases de la mezcla formada por citrato trisódico (Na_3Cit) y polietilenglicol 4000 (PEG 4000). Fuente: Carranza-Gomez (2018).

De acuerdo con Carranza-Gomez (2018), la condición E' constituye un estado característico donde se tiene una relación de volúmenes 50:50 entre las fases superior e inferior de los sistemas, por lo cual se eligió como mezcla base para atender la separación de compuestos bioactivos de frutos de arándano.

3.3.2 Separación de compuestos bioactivos

3.3.2.1. Material vegetal

Se utilizaron bayas de arándano (*Vaccinium corymbosum*) en madurez de consumo conservadas en refrigeración comercial. Con ayuda de un procesador de alimentos marca Nutribullet®, los arándanos fueron molidos hasta obtener un puré, que posteriormente se filtró pasándolo a través de dos lienzos de tela tipo

organza con la finalidad de atrapar las partículas sólidas y así obtener un jugo traslucido (JT).

3.3.2.2. Sistemas acuosos bifásicos (ABS)

Se prepararon mezclas de 20 g con Na₃Cit y PEG 4000 en concentraciones de 17.73 y 21.33% (estado E'), respectivamente, y usando jugo como disolvente. Las mezclas se agitaron en equipo Vortemp 56 (ThermoFisher Scientific, USA) durante 10 min a 10000 rpm y se evaluaron manejos con sedimentación pasiva de 15 (R15C) y 30 (R30C) min, seguidos de centrifugación (Frontier™ 5718R, Ohaus, Alemania) a 4500 rpm (2940 rfc) durante 15 min para acelerar la formación de fases. Adicionalmente se evaluó un manejo con sedimentación pasiva de 24 h sin centrifugación (R24H). Las mezclas se mantuvieron a temperatura ambiente (23°C) y protegidas de la luz durante la separación. Las fases formadas con R15C, R30C y R24H se separaron y recuperaron en viales de vidrio, tras lo cual se les ajustó el pH a 3.0 usando ácido acético y se almacenaron en oscuridad a -10 °C hasta su análisis. Cada separación se realizó por triplicado. Las fases superiores obtenidas mediante ABS se denominaron "Extractos".

Para evaluar el efecto de los manejos de sedimentación pasiva con y sin centrifugación sobre el potencial de separación de compuestos bioactivos mediante ABS, las fases superior e inferior de los sistemas de separación se sometieron a evaluación de contenidos de fenoles solubles totales (Singleton y Rossi, 1965), flavonoides totales (Kubola y Siriamornpun, 2011), antocianinas totales (Lee et al., 2005) y azúcares totales. Asimismo, las fases se sometieron a evaluación de actividad antioxidante con el ensayo FRAP (Benzie y Strain, 1996).

3.3.3. Evaluación de composiciones

3.3.3.1. Azúcares totales (AT)

En tubos de vidrio se mezclaron 300 µL de los extractos diluidos previamente en agua destilada, con 300 µL de fenol al 5% y 1.5 mL de ácido sulfúrico

concentrado. Se dejaron reaccionar durante 20 min y pasado ese tiempo se transfirieron 200 μL de las reacciones a pozos de microplacas para medir la absorbancia a 490 nm en espectrofotómetro (Synergy TM HTX, BioTek Instruments, Inc., USA). La cuantificación se apoyó con una curva estándar de glucosa y los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de glucosa por gramo de muestra en base húmeda ($\text{mgEG g}_{\text{bh}}^{-1}$).

3.3.3.2. Flavonoides totales (F)

Se realizó una curva estándar con 29 mg de catequina aforados a 1 mL con metanol al 80% para calcular los flavonoides totales. En tubos Falcon® se mezclaron 0.5 mL de extracto, blanco o las disoluciones de la curva con 2.5 mL de agua destilada y 0.15 mL de NaNO_2 al 5%. Las mezclas se dejaron reaccionar durante 6 min y se les adicionaron 300 μL de AlCl_3 al 10%. Después de un reposo de 5 min se agregó 1 mL de NaOH al 5% y se agitó en vortéx durante 3 min a 3000 rpm. Se midió absorbancia en espectrofotómetro (SynergyTM HTX, BioTek Instruments, Inc., USA) a 510 nm en 200 μL que se colocaron en pozos de una microplaca. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de catequina por gramo de base húmeda ($\text{mgEC g}_{\text{bh}}^{-1}$).

3.3.3.3. Fenoles solubles totales (FST)

Se construyó con una curva estándar de ácido gálico para determinar el contenido de fenoles solubles totales (FST). En cada pozo de una microplaca se mezclaron 25 μL de las diluciones de ácido gálico, extracto diluido con agua destilada o el blanco, con 125 μL de H_2O destilada, 20 μL de disolución de Folin-Ciocalteu, 30 μL de Na_2CO_3 al 20%. Cada mezcla se dejó reaccionar durante 30 min en oscuridad y luego se sometió a evaluación de absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro (Synergy TM HTX, BioTek Instruments, Inc., USA). El contenido fenólico se expresó como miligramos de fenoles equivalentes a ácido gálico por gramo de muestra en base húmeda ($\text{mgEAG g}_{\text{bh}}^{-1}$).

3.3.3.4. Antocianinas totales (ANT)

Se prepararon dos soluciones buffer, una de cloruro de potasio (KCl) con pH 1 y otra de acetato de sodio con pH 4.5. En 1 mL de cada buffer se agregaron 25 µL de la fase superior y en 0.5 mL de cada buffer se adicionaron 0.5 mL de la fase inferior. Posteriormente, las mezclas se agitaron en vórtex durante 15 min a 100 rpm y se centrifugaron por 15 min a 2500 rpm. En cada pozo de una microplaca se colocaron alícuotas de 100 µL de cada uno de los sobrenadantes para medir la absorbancia a 518 y 700 nm. Se calculó la concentración de antocianinas con la Ecuación (1) y los resultados se expresaron como equivalentes de antocianinas (mg EA/mL), donde A es absorbancia obtenida mediante la Ecuación (2), PM es peso molecular (449.2 g mol⁻¹ para cianidina 3-glucósido), FD es factor de dilución, ε es coeficiente de extinción molar de Cianidina 3-glucósido (26900 L mol⁻¹ cm⁻¹), la constante 0.38 corresponde a la longitud de la trayectoria (cm) y la constante 10³ es el factor de conversión de gramos a miligramos.

$$\text{Equivalentes de antocianinas} = \frac{(A * PM * FD * 10^3)}{(\epsilon * 0.38)} \quad (1)$$

$$A = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4.5} \quad (2)$$

3.3.3.5. Actividad antioxidante con ensayo FRAP

En cada pozo de una microplaca se colocan 20 µL de extracto diluido en metanol al 80%, 180 µL de la disolución FRAP y 60 µL de agua destilada. Después de 10 min se midió absorbancia a 595 nm. También se preparó una curva de calibración de Trolox®, que permitió calcular los resultados expresados en micromoles equivalentes de Trolox® por gramo de muestra en base húmeda (mMolET g_{bh}⁻¹).

3.3.3.6. Eficiencia de separación

Para cada sistema de separación se calculó la relación de volúmenes (V_r, adimensional) (Ecuación 3), V_{sup} indica el volumen de la fase superior (mL) y V_{inf} el volumen de la fase inferior del sistema.

$$V_r = \frac{V_{\text{sup}}}{V_{\text{inf}}} \quad (3)$$

Se calculó el coeficiente de partición (k , adimensional) (Ecuación 4), bajo la consideración de que este parámetro describe la relación de la concentración de un compuesto en la fase superior (C_{sup}) a la concentración en la fase inferior (C_{inf}). En general, el coeficiente de partición indica el número de veces que un compuesto resulta concentrado en la fase superior en relación a la fase inferior.

$$K = \frac{C_{\text{sup}}}{C_{\text{inf}}} \quad (4)$$

3.3.4. Extracción convencional con metanol

Para disponer de una referencia de la eficacia de la extracción de antocianinas mediante ABS, se realizó una extracción metanólica convencional líquido-líquido (EM), donde se adicionaron alícuotas de 5 g de jugo (JT) a 100 mL de metanol al 80% (p/v) ajustado a pH 3.0 con ácido acético. Las mezclas se mantuvieron en agitación constante durante 2 h a 40 °C y se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 min. En cada caso se recuperó el sobrenadante y el residuo se sometió a una segunda extracción similar. Los sobrenadantes de esta extracción se juntaron y se sometieron a evaluación de concentración de antocianinas con el método señalado por Lee et al. (2005).

3.3.5. Evaluación del potencial pigmentante

3.3.5.1. Matriz alimenticia

Considerando que la composición de la fase superior de los ABS es básicamente polimérica, se consultó la norma general para los aditivos en los alimentos del Codex Alimentarius (Cuadro 1) para considerar los alimentos en donde se puede adicionar polietilenglicol y la dosis máxima permitida. Con esta base, se seleccionó una bebida para deportistas (color blanco traslucido) marca Gatorade® como medio líquido modelo, el cual presentó pH de 3.0 proveyendo el medio ácido para la estabilidad de las antocianinas.

Cuadro 1. Uso permitido de polietilenglicol en condiciones especificadas para ciertas categorías de alimentos o determinados productos alimenticios CODEX Alimentarius (FAO/OMS, 1995).

Producto / alimento	Dosis máxima permitida (mg kg ⁻¹)
Goma de mascar	20,000.0
Edulcorantes de mesa, incluidos los que contienen edulcorantes de gran intensidad	10,000.0
Complementos alimenticios	70,000.0
Bebidas a base de agua aromatizada, incluidas las bebidas para deportistas, bebidas energéticas o bebidas electrolíticas y bebidas con partículas añadidas.	1,000.0

3.3.5.2. Preparación de pigmentos

Los Extractos se prepararon en dos presentaciones: con y sin liofilizar y se evaluaron como pigmentos de un medio líquido. Para la primera presentación los Extractos pasaron a denominarse como pigmento líquido. En la segunda presentación los Extractos se liofilizaron en un equipo LABCONCO 18L, Model 7755040, obteniendo así el pigmento liofilizado.

3.3.5.3. Curvas de saturación de tono

Para evaluar el comportamiento del ángulo de tono (Hue) en el medio líquido con la adición de pigmento líquido y liofilizado, se construyeron curvas de tonalidad. En 10 g de medio líquido se incorporó gradualmente pigmento líquido o liofilizado hasta completar 1 g. Después de cada adición se midieron los valores de a^* y b^* con un colorímetro HunterLab (MiniScan XE® Plus, Hunter Associates Laboratory Inc., Reston VA, USA), con lo cual se evaluó el ángulo de tono o matiz (Hue, h°) con la Ecuación (5), donde la constante 57.296 corresponde a la conversión de radianes a grados. Los datos se expresaron en grados, cuyo rango de variación fue de 0 a 360°, donde 0° corresponde al rojo, 90° al amarillo, 180° al verde y 270° al azul (Zielinska y Michalska, 2016). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

$$h^\circ = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \times 57.296 \quad (5)$$

3.3.5.4. Comportamiento del pigmento en el medio líquido

Se expusieron los medios líquidos pigmentados a condiciones conservativas y deteriorativas para evaluar el comportamiento del ángulo de tono y el contenido de antocianinas durante un periodo de 15 d con las siguientes especificaciones:

- Condición conservativa: temperatura de refrigeración (4.5 °C) y oscuridad.
- Condición deteriorativa: temperatura ambiente (23°C) y exposición a la luz.

Cada 24 h se realizó la medición de valores de a^* y b^* con un colorímetro HunterLab (MiniScan XE® Plus, Hunter Associates Laboratory Inc., Reston VA, USA), lo que permitió calcular la tonalidad (Hue) con la Ecuación (6) presentada anteriormente. También, se cuantificó el contenido de antocianinas con la metodología descrita por Lee et al. (2005) y se midió el pH con un potenciómetro (ConduTronic modelo pH120, USA). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

3.3.6. Análisis de datos

Durante la fase de separación, los datos de concentración de compuestos bioactivos en los sistemas de separación se sometieron a análisis de varianza complementado con rutinas de comparación de medias de tratamiento realizadas con el estadístico de Tukey y nivel de significancia de 0.05. Los factores de variación fueron las fases (superior e inferior) y las condiciones de separación (R15C, R24C y R24H). Durante la fase de evaluación de pigmentación, se consideró como factor de variación a la condición de almacenamiento del medio líquido. Asimismo, los datos de cinética de cambio de ángulo de tono y de concentración de antocianinas se sometieron a análisis de regresión. Todo el análisis estadístico se llevó a cabo en el software Minitab 17. Todas las rutinas experimentales se realizaron por triplicado.

3.4. Resultados y discusión

3.4.1 Diagrama de fases

Las mezclas de citrato de sodio y polietilenglicol 4000 preparadas con apoyo del diagrama de fases descrito por Carranza-Gomez (2018) permitieron formar sistemas bifásicos (Figura 5). La formación y composición de fases en este tipo de sistemas se atribuye a un fenómeno de exclusión salina o *salting-out* (Sadeghi y Jahani, 2012), donde ocurre una disminución de solubilidad del componente polimérico a medida que la concentración de sal aumenta.

Para la construcción del diagrama de fases, Carranza-Gomez (2018) usó agua desionizada como disolvente. Sin embargo, en el presente trabajo se usó de jugo de arándano como disolvente de Na₃Cit y PEG 4000 con la composición correspondiente al estado E' de 17.73 y 21.33%, respectivamente, y se encontró que la formación de sistemas bifásicos se mantuvo en los tres tratamientos R15C, R30C y R24H, con la aparición de una fase superior, cuya composición fue principalmente polimérica, y una fase inferior, donde se tuvo composición principalmente salina. En el desarrollo de los sistemas, se logró un límite interfacial claro desde la condición de reposo de 15 min (R15C). Al respecto, Xi-Lian et al. (2013) definieron que el tiempo desde que se detiene el mezclado de un ABS hasta la aparición de un límite interfacial claro entre las dos fases se toma como tiempo de separación de fases.

Cuadro 2. pH de las fases obtenidas en sistemas acuosos bifásicos.

Manejos	Fase	pH
R15C	Superior	6.84 (0.01)
	Inferior	6.18 (0.01)
R30C	Superior	6.83 (0.01)
	Inferior	6.17 (0.02)
R24H	Superior	6.57 (0.02)
	Inferior	6.26 (0.02)

El pH de las fases formadas osciló en valores cercanos a la neutralidad (Cuadro 2). En tal sentido, en virtud de que la estabilidad de las antocianinas se reduce significativamente con pH superior a 5.0, el uso de sedimentación pasiva en un periodo de tiempo reducido, seguida de centrifugación, permitió reducir el tiempo de exposición de las biomoléculas a una condición deteriorativa.

3.4.2. Separación de compuestos bioactivos

Los sistemas acuosos bifásicos se sometieron a cuantificación de compuestos y se analizó el efecto que provoca las fases y los manejos de sedimentación sobre su concentración. Con base en el ANOVA (Cuadro 3) se infirió que efecto de estos factores de variación en la concentración de antocianinas, fenoles solubles totales, flavonoides y de azúcares totales, así como en actividad antioxidante entre las fases superior e inferior.

Cuadro 3. Valores percentiles de la distribución de Fisher ($\alpha = 0.05$) correspondientes al ANOVA de la separación de compuestos bioactivos mediante sistemas acuosos bifásicos

Valor F	GL	ANT	FT	F	FRAP	AT
R ²		99.15%	96.83%	99.23%	99.99%	99.21%
Entre fases	1	1370.68*	311.72*	1410.25*	89101.36*	1267.29*
Tiempo de reposo	2	8.10*	13.32*	37.74*	108.46*	22.90*

*Al menos un nivel dentro del factor de variación produjo un efecto diferente en relación con el resto ($\alpha = 0.05$). ANT: antocianinas totales, FT: fenoles totales, F: flavonoides totales, FRAP: Actividad antioxidante con ensayo FRAP, AT: Azúcares totales.

La mayor concentración de antocianinas se obtuvo en la fase superior de los sistemas (Cuadro 4) y, de hecho, la concentración de estos compuestos en las fases inferiores fue prácticamente nula, lo cual sugirió mayor compatibilidad de estos compuestos con la composición de la fase superior. Las mayores concentraciones de antocianinas en las fases superiores se encontraron en el tratamiento R30C y las menores en el tratamiento R24H, lo cual se explicó con

base a un mayor tiempo de exposición a una condición degradativa del material de este último, lo cual confirmó que el uso de centrifugación es una alternativa que favorece la presencia de estos compuestos en los extractos. En tanto, el resultado obtenido en R15C fue estadísticamente similar a R30C.

Cuadro 4. Concentración de compuestos bioactivos en los extractos de arándano obtenidos mediante ABS.

Manejo	ANT	FST	F	FRAP	AT
Fase superior					
R15C	0.159 a (0.006)	0.286 b (0.007)	0.275 a (0.013)	703.375 b (7.26)	5.294 d (0.16)
R30C	0.172 a (0.009)	0.301 b (0.019)	0.177 b (0.018)	777.145 a (10.23)	4.716 d (0.12)
R24H	0.131 b (0.018)	0.519 a (0.104)	0.175 b (0.017)	785.220 a (2.45)	9.207 c (0.33)
Fase inferior					
R15C	0 c (0)	0.007 c (0.001)	0.005 c (0.001)	16.904 c (0.92)	17.115 a (0.88)
R30C	0 c (0)	0.010 c (0.004)	0.006 c (0.002)	13.589 c (0.07)	14.268 b (0.58)
R24H	0 c (0)	0.006 c (0.000)	0.001 c (0.001)	17.851 c (1.10)	13.162 b (0.51)

Comparación de medias de Tukey con confianza de 95% donde las medias que no comparten una letra dentro de columnas son significativamente diferentes. ANT: antocianinas (mg EA/g fase). FST: fenoles totales (mg EAG g_{bh}⁻¹). F: flavonoides (mgEC g_{bh}⁻¹). FRAP: actividad antioxidante con ensayo FRAP (mMolET g_{bh}⁻¹). AT: azúcares totales (mg EG g_{bh}⁻¹)

Las antocianinas son componentes importantes del jugo de arándanos debido a su papel en la producción del color del jugo y su actividad antioxidante porque se ha demostrado que tienen un papel importante en la prevención de enfermedades neuronales y cardiovasculares, cáncer y diabetes (Patras, Brunton, O'Donnell y Tiwari, 2010). La literatura señala que las antocianinas presentes en el arándano son galactósidos, glucósidos y arabinósidos de las antocianidinas delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, y sus

concentraciones varían mucho entre genotipos (Scalzo, Miller, Edwards, Meekings y Alspach, 2009; Wang, Chen, Camp y Ehlenfeldt, 2012).

En forma similar al caso de las antocianinas, los fenoles solubles tuvieron mayor compatibilidad con la fase superior; sin embargo, el uso de reposo de 24 h causó mayor concentración de estos compuestos en esa fase, lo que sugirió que un tiempo de separación prolongado es un factor importante para favorecer la separación de estos compuestos. Sin embargo, el tiempo de sedimentación no afectó la concentración de fenoles en la fase salina y la centrifugación disminuyó el contenido total de fenoles en la fase polimérica.

La concentración de los flavonoides (Cuadro 4) presentó agrupamiento en la fase superior de los tratamientos R24C y R30C sin diferencia significativa entre ellos, por lo que R15C difiere de ese grupo representando la mayor concentración de flavonoides ($\text{mg EC g}_{\text{bh}}^{-1}$). Al respecto, según Junfeng, Wenjun, Binbin, Yongchao y Zhixia, (2019) los flavonoles y las proantocianidinas se biosintetizan principalmente en la etapa inicial del desarrollo, mientras que las antocianinas se acumulan principalmente en las etapas tardías del desarrollo del fruto.

En cuanto a la actividad antioxidante con ensayo FRAP, se infirió que entre los tres tratamientos de la fase inferior no hubo diferencia y ya que la mayor concentración de los compuestos bioactivos se encuentra en la fase superior, la actividad antioxidante en la fase superior también fue mayor en R24H y R30C. Las altas actividades antioxidantes de las frutas se atribuyen en gran medida a compuestos fenólicos como las antocianinas y otros compuestos flavonoides (Shiow Hangjun, Mary y Mark, 2012), lo que sustenta que como R24H y R30H tuvieron las concentraciones más altas de fenoles solubles y antocianinas, respectivamente, la actividad antioxidante fue mayor en esos tratamientos. Las actividades antioxidantes de los compuestos fenólicos se deben principalmente a sus propiedades redox que pueden desempeñar un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres, apagando el oxígeno singlete y

triplete o descomponiendo el peróxido (Larson, 1988). Los valores previamente informados de actividad antioxidante obtenida con el ensayo FRAP en jugos de arándanos ha estado en el rango de 3.6–4.7 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$ (Seeram et al., 2008).

En cuanto al comportamiento de los azúcares totales, las mayores concentraciones se encontraron en la fase inferior, siendo el R15C el que maximiza la extracción de azúcares, lo que favorece a los extractos de la fase superior, ya que es conveniente que la concentración de azúcares en la fase superior sea mínima, lo cual se consiguió en mayor grado con los tratamientos R15C y R30C.

La modificación de las condiciones de manejo de los sistemas acuosos bifásicos afectó de manera significativa ($p \leq 0.05$) los parámetros de separación de compuestos bioactivos. Las concentraciones de antocianinas, fenoles solubles totales flavonoides resultaron con valores significativamente mayores en la fase superior de los sistemas, lo que causó que allí se tuviera la mayor actividad antioxidante. En contraste, los azúcares se encontraron con la mayor concentración en la fase inferior, lo que confirmó que los sistemas acuosos bifásicos pueden separar compuestos bioactivos atendiendo la reducción del contenido de azúcares. Al respecto, en forma paralela a la disminución de solubilidad del polímero causada por un efecto de exclusión salina o *salting-out*, ocurrió un fenómeno similar de reducción de solubilidad de los compuestos bioactivos, lo que causó la migración de éstos hacia la fase superior, cuya composición fue principalmente polimérica, a diferencia de la inferior, donde se tuvo composición principalmente salina.

La mayor separación de antocianinas en la fase superior (0.172 mg EA/g muestra) se obtuvo R30C y en esta condición también se presentó la mejor separación azúcares, los cuales se concentraron principalmente en la fase inferior. Asimismo, la actividad antioxidante de la fase superior de los sistemas tuvo los mayores valores, lo que indicó que las condiciones favorecieron en

mayor medida la migración de los compuestos bioactivos hacia esa fase en relación con la fase inferior. Por otro lado, la relación de volúmenes en R15C fue de 1.14, en R30C fue de 0.9 y en R24H fue de 3.67. A este respecto, el comportamiento observado en los tratamientos apoyados con centrifugación fue congruente con lo descrito por Carranza-Gomez (2018) en el sentido que el sistema basado en 17.73% de Na₃Cit y 21.33% de PEG 4000 causa una separación con volúmenes de fase similares. Sin embargo, la mayor relación de volúmenes encontrada en R24H sugirió que con mayor tiempo puede ocurrir una transición a otro, donde cambia la interacción del agua con las moléculas disueltas.

El coeficiente de determinación para las antocianinas en R15C, R30C y R24C fue indeterminado, debido a la ausencia de estas en la fase inferior. Los fenoles solubles presentaron coeficientes de determinación de 40.86, 30.10 y 86.50, para los flavonoides totales resultaron 55, 29.50 y 175 y para los azúcares 0.31, 0.33 y 0.70 respectivamente. Confirmando con base en los coeficientes de determinación mayores a 1 que los compuestos bioactivos se concentraron en la fase superior y para los azúcares al ser menor a 1 se confirmó que la mayor concentración ocurrió en la fase inferior.

3.4.3 Extracción metanólica de antocianinas

La extracción con metanol se comparó con los manejos de sedimentación pasiva en la extracción de antocianinas a partir del jugo de arándano. Al respecto, el análisis de varianza (Cuadro 5) indicó que hubo diferencia significativa entre los tratamientos, por lo que se procedió con la comparación de medias con el estadístico de Tukey ($p < 0.05$).

Cuadro 5. Valores percentiles de la distribución de Fisher (F0.05) correspondientes al ANOVA de separación de antocianinas en jugo de arándano.

Valor F	EM	EMS	ABS 30	ABS 15	ABS 24
13.01*	0.190	0.149	0.172	0.159	0.131
	a	bc	ab	bc	c

Al menos un nivel dentro del factor de variación produjo un efecto diferente en relación con el resto ($\alpha = 0.05$). Antocianinas (mgEA/mL). Comparación de medias de Tukey con confianza de 95%. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

La concentración de antocianinas obtenida mediante la separación metanólica, fue similar a la obtenida con el tratamiento R30C, en tanto que fue significativamente mayor a lo obtenido con el tratamiento R24H. Al respecto, existen reportes previos que han sugerido que la extracción de antocianinas y otros polifenoles puede realizarse usando agua con rendimientos similares a los métodos con solventes orgánicos (Chemat et al., 2015; Ongkowijoyo, Luna y Gonzalez, 2018). En lo que corresponde al menor valor del tratamiento R24H, los resultados confirmaron que el uso de reposo largo puede causar degradación de los compuestos, por la exposición a un pH no adecuado, ya que este parámetro podría alterar la carga y las propiedades de la superficie del soluto, afectando así la partición de los compuestos objetivo (Tan, Li y Xing, 2010).

3.4.3. Curvas de tonalidad adquirida por el medio líquido

Se evaluó el potencial pigmentante de los extractos obtenidos en un medio líquido, donde el ángulo de tono disminuyó (Figura 6), dando una apariencia más roja, con la adición de extracto líquido o liofilizado. El color de las antocianinas está influenciado por el grado de acilación aromática, pH, co-pigmentación con otros compuestos fenólicos, complejación de metales y puede variar de naranja, rojo, rosa y morado a azul (Yoshida et al., 2009). En este caso, las coloraciones se tornaron rojas.

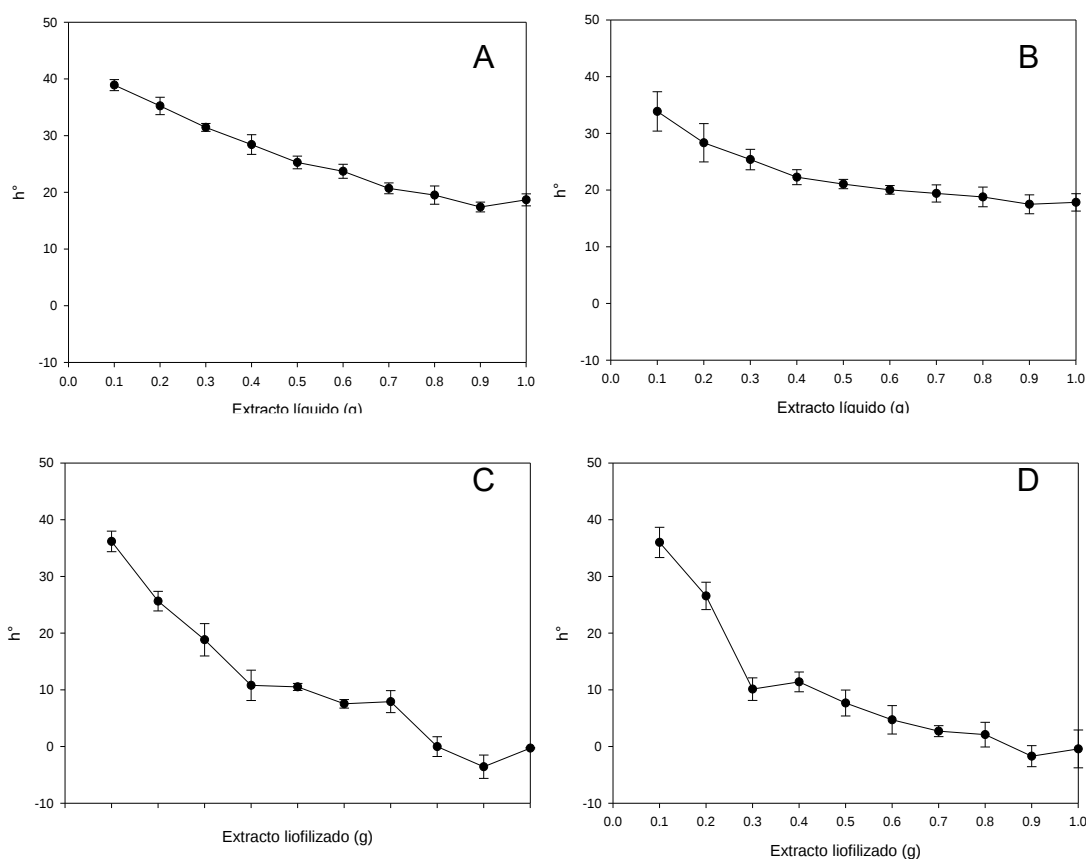


Figura 6. Curvas de tonalidad adquirida por el medio líquido con los pigmentos obtenidos con R15C (A), R30C (B), R15C (C) y R30C (D).

En la primera adición de material, fue claro que el pigmento líquido R15C tuvo un ángulo de tono similar a que proveyó el pigmento líquido R30C. En ambos casos, se observó una tendencia lineal hasta los 0.4 g de extracto adicionado y después el comportamiento se hizo logarítmico. Sin embargo, con extracto liofilizado el ángulo de tono disminuyó hasta valores cercanos a rojo absoluto y ello se logró con menores cantidades de materia pigmentante. El fenómeno de co-pigmentación ocurre cuando el pigmento (antocianinas) y el co-pigmento (sustancia incolora) forman complejos no covalentes. Se observa como un cambio bathocrómico y efecto hipercrómico, que estabiliza y modula el color de las antocianinas, contribuyendo a un color más intenso (Asen, Stewart y Norris, 1972; Trouillas et al., 2016). En el Cuadro 6 se presentan modelados para

predecir la tendencia del ángulo de saturación cuando se agrega cierta cantidad de pigmento.

Cuadro 6. Modelado de las tendencias en las curvas de saturación de tono del medio líquido con los pigmentos obtenidos con ABS.

	Ecuación
Pigmento líquido (R15C)	
Polinómica de segundo grado	$y = 21.43x^2 - 47.289x + 43.685$
R ²	99.46%.
Pigmento líquido (R30C)	
tendencia logarítmica	$y = -7.145\ln(x) + 16.786$
R ²	98.63%
Pigmento liofilizado (R15C)	
tendencia es logarítmica	$y = -16.7\ln(x) - 1.8798$
R ²	96.98%
Pigmento liofilizado (R30C)	
tendencia logarítmica	$y = -16.28\ln(x) - 2.9796$
R ²	95.13%

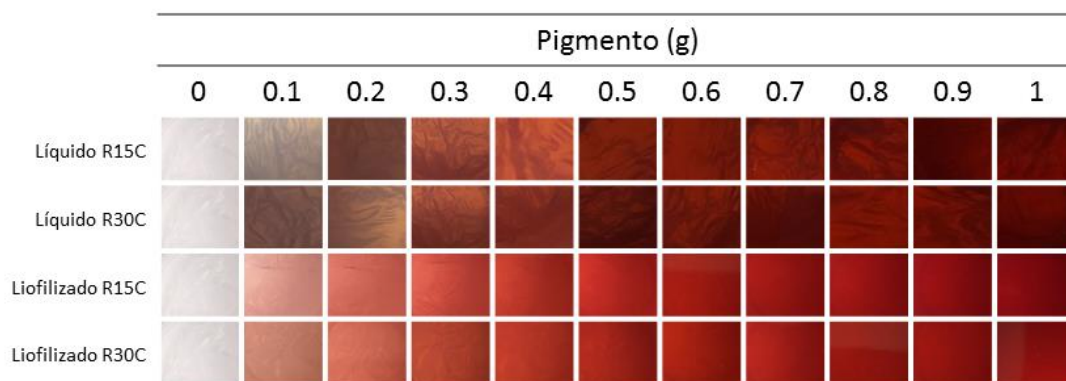


Figura 7. Curvas de tonalidad adquirida para los extractos obtenidos a partir de *Vaccinium corymbosum* adicionados en bebida para deportistas.

En la Figura 7 se muestra la coloración que adquirió la bebida conforme se adicionaron ciertos gramos de pigmento. Las curvas de saturación tornaron de color rosado el medio líquido hasta que el pigmento incremento a 0.3 g. A partir de allí, se comenzó a percibir una coloración más fuerte en los pigmentos liofilizados. La incorporación de los pigmentos al medio líquido fue sencilla y no

se requirió de agitación mecánica, ni se percibieron partículas suspendidas. Asimismo, el color se tornó a simple vista más intenso a partir de los 0.7 g para el pigmento líquido y 0.6 g para el liofilizado. Fue notable que los tratamientos liofilizados causaron un aspecto de enrojecimiento progresivo en comparación de los extractos líquidos, que presentaron tonalidades oscuras que después disminuyen su intensidad.

3.4.4. Comportamiento de los extractos

3.4.4.1. Cantidades de material pigmentante

Con base en el CODEX Alimentarius (FAO/OMS, 1995), la dosis máxima permitida de polietilenglicol en bebidas para deportistas es de 1000 mg kg⁻¹. Con esta base se hicieron los cálculos para conocer la cantidad máxima permitida de cada extracto en 10 g de bebida Gatorade®. Los tratamientos se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Descripción de los tratamientos para evaluar el potencial pigmentante en un medio líquido

Condición	Tratamiento	(g) de pigmento adicionado en medio líquido
Conservativa	T1	0.5 g de extracto líquido R15C
	T2	0.6 g líquido R30C
	T3	0.3 g liofilizado R15C
	T4	0.3 g liofilizado R30C
Deteriorativa	T5	0.5 g líquido R15C
	T6	0.6 g líquido R30C
	T7	0.3 g liofilizado R15C
	T8	0.3 g liofilizado R30C

3.4.4.2. Estabilidad de pigmentos

La Figura 8 A corresponde al pigmento líquido obtenido con R15C, donde el ángulo de tono descendió durante los primeros 4 d, cuando el pigmento se encontraba en conservación. A partir del día 5 comenzó a aumentar el valor del ángulo de tono y el comportamiento se observó hasta el día 12. El ángulo de tono

en condiciones deteriorativas se mantuvo un tanto estable los primeros 5 d y fue en el día 8 cuando comenzó a tener un comportamiento similar al pigmento en condición de conservación, ambos tuvieron una caída del ángulo Hue con valores alrededor de los 18°.

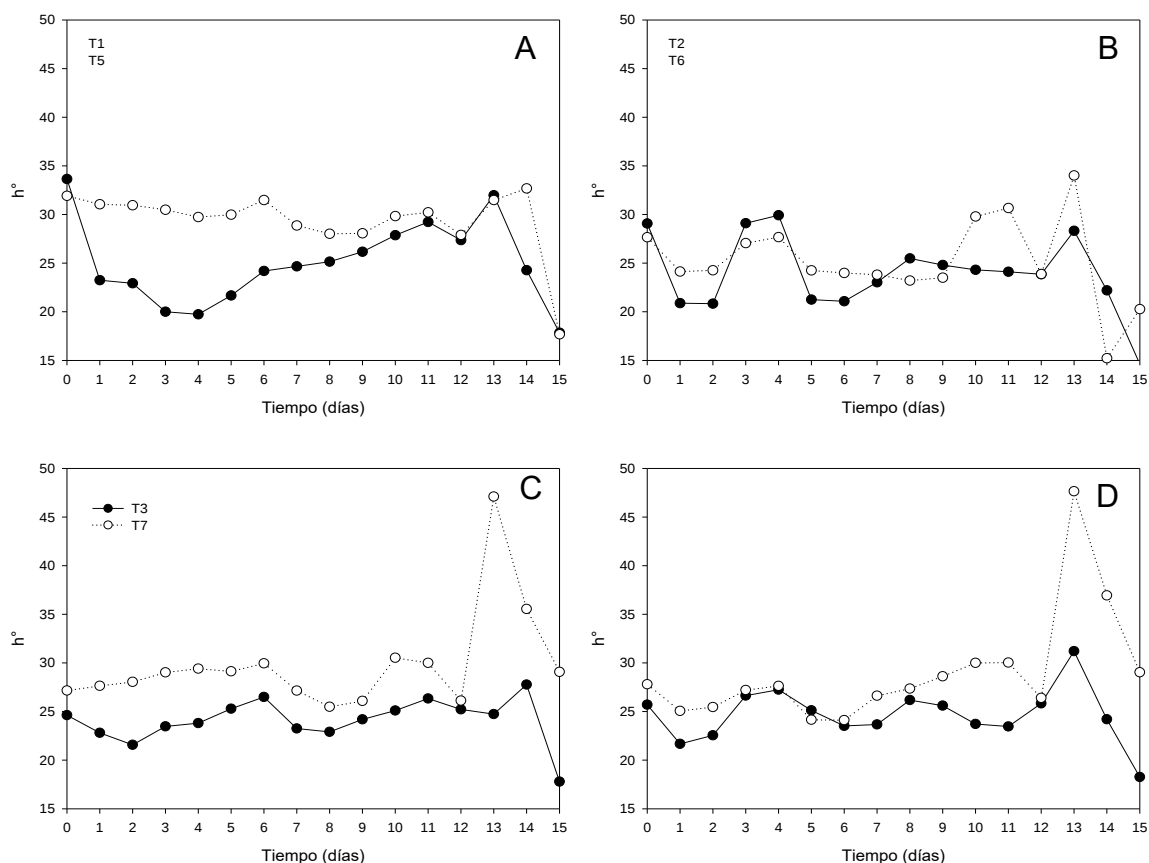


Figura 8. Variación del ángulo de tono en medio líquido pigmentado con los extractos líquidos y liofilizados en condiciones conservativas y deteriorativa. Los círculos cerrados corresponden a condición conservativa y los abiertos a condición deteriorativa. A: extracto líquido obtenido con R15C. B: extracto líquido obtenido con R30C. C: extracto liofilizado obtenido con R15C. D: extracto liofilizado obtenido con R30C.

El comportamiento del ángulo de tono para el medio líquido pigmentado con extracto líquido R30C en condición conservativa y de deterioro (Figura 8B) fue similar en los primeros 7 d. Se observó que la condición deteriorativa afectó el comportamiento del pigmento, ya que el valor del ángulo de tono aumentó y

disminuyó un par de veces durante el resto de los días. Los pigmentos liofilizados (Figura 8 C y D) tuvieron un comportamiento similar entre ellos y entre las condiciones de almacenamiento. El ángulo de tono del líquido pigmentado con estos materiales no tuvo cambios repentinos hasta el día 13, en donde se presentó un aumento por arriba de los 45°, para posteriormente bajar a menos de 20° en conservación y menos de 30° para el deterioro.

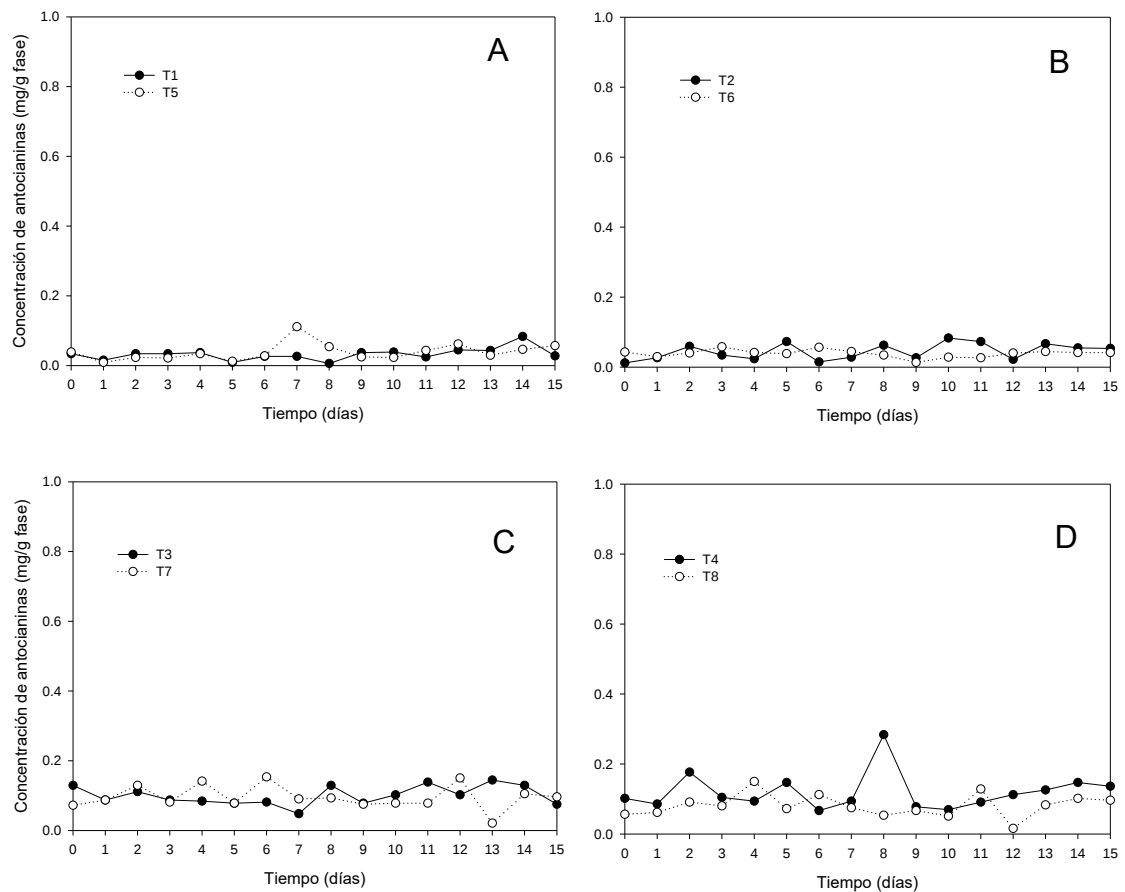


Figura 9. Comparación de la concentración de antocianinas para cada pigmento en conservación y deterioro. Los círculos cerrados corresponden a condición conservativa y los abiertos a condición deteriorativa. A: extracto líquido obtenido con R15C. B: extracto líquido obtenido con R30C. C: extracto liofilizado obtenido con R15C. D: extracto liofilizado obtenido con R30C.

3.4.4.3. Comportamiento de antocianinas en el medio líquido

En la Figura 9 A la concentración de las antocianinas obtenidas mediante R15C y adicionadas como pigmento líquido en la bebida fue similar del día 1 al 6. Después, la concentración aumentó en condiciones de deterioro en el día siete y y tuvieron otra alza para el día 12. En tanto, cuando el tratamiento se expuso a condiciones conservativas, la concentración aumentó hasta el día 14.

La concentración de antocianinas (Figura 9B) pareció inestable en ambas condiciones ambientales y se mantuvo oscilando durante los 15 días cuando se usó extracto líquido obtenido con el tratamiento R30C. Sin embargo, las concentraciones más altas se registraron cuando el material pigmentado se mantuvo en condiciones conservativas. El extracto liofilizado (Figura 9C) presentó un declive en la concentración de antocianinas en condición conservativa desde el día 0 al 7, para posteriormente presentar mayores concentraciones, las cuales no pudieron estabilizarse, marcando un comportamiento de aumento y declive. En la Figura 9D, la concentración de antocianinas entre los tratamientos osciló entre concentraciones medias y bajas de día 1 al 7. En las condiciones conservativas se presentó la mayor cuantificación en el día 8 y descendió al otro día; sin embargo, para el resto de los días la concentración fue aumentando más que en la condición deteriorativa.

Según Patras et al. (2010) han sugerido que la degradación de antocianinas está relacionada principalmente con la apertura de su anillo de pirilio y la formación de chalcona. La estabilidad de las antocianinas disminuye con el aumento del número de grupos hidroxilo en el anillo B de la antocianidina y aumenta con el aumento del grado de metilación (Zhao et al., 2017). Las antocianinas son de gran importancia para la ciencia y la tecnología de los alimentos, ya que el color atractivo de los alimentos es un parámetro de calidad importante que afecta las preferencias de los clientes (Klisurova et al., 2019).

3.4.4.4. pH

El pH se mantuvo con valor de 3 desde el momento que la acidificaron de los Extractos y así se mantuvo durante los 15 días de exposición de los medios líquidos pigmentados mantenidos en condiciones de deterioro. El pH juega un papel importante durante la pigmentación, lo que se puede explicar mediante la co-pigmentación, que consiste en interacciones hidrofóbicas (apilamiento $\pi - \pi$) entre los núcleos polarizables planos de las formas coloreadas de las antocianinas y otras moléculas (es decir, copigmentos). Los complejos de co-pigmentación adoptan una configuración tipo sándwich, que protege al cromóforo de flavilio del ataque nucleofílico del agua, reduciendo así la formación de formas incoloras de hemiacetal y calcona. El resultado final es que las soluciones de antocianinas muestran un color más intenso de lo que teóricamente podría esperarse según el valor de pH del medio (Goto y Kondo, 1991).

3.5. Conclusiones

El uso de sistemas acuosos bifásicos permitió separa fenoles solubles, flavonoides y antocianinas de jugo de arándano, reduciendo significativamente el contenido de azúcares. El uso de sedimentación pasiva por un periodo de 15 min seguida de centrifugación por 30 min permite la formación de sistemas bifásicos, sin embargo, el uso de sedimentación pasiva por 30 min, seguida del mismo tratamiento de centrifugación incrementa la cantidad de compuestos bioactivos separados. La sedimentación pasiva por 24 h, como único procedimiento en el uso de sistemas acuosos bifásicos causa reducción significativa del contenido de antocianinas. El uso de extractos obtenidos con sistemas acuosos bifásicos con 15 o 30 min de sedimentación pasiva, seguidos de centrifugación y liofilización favorece el potencial pigmentante de medios líquidos, en relación al uso de extractos líquidos. Se demostró que los extractos obtenidos con ABS son adecuados para pigmentar medios líquidos

3.6. Literatura citada

- Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M.T., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C. (2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing - A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta*, 563 (1-2), 238-254. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.028>
- Azeredo, H.M.C. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44 (12), 2365-2376, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x>
- Asen, S., Stewart, R.N. & Norris, K.H. (1972). Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, 11 (3), 1139-1144.
- Benzie, I. F. F. & Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Cardello, A.V. (1996). The role of the human senses in food acceptance. H.L. Meiselman, H.J.H. McFie (Eds.), *Food Choice, Acceptance and Consumption*, Blackie A&P, an imprint of Chapman & Hall, London, 1-82.
- Carranza-Gomez, M. (2018). Antocianinas, potencial pigmentante y compuestos fenólicos de frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) separados mediante extracción acuosa en dos fases. *Tesis de licenciatura. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. México.*
- Celli, G.B. & Brooks, M.L. (2017). Impact of extraction and processing conditions on betalains and comparison of properties with anthocyanins — A current review. *Food Research International*, 100, 501-509. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.034>
- Chemat, F., Fabiano-Tixier, A.S., Vian, M.A., Allaf, T. & Vorobiev, E. (2015). Solvent-free extraction of food and natural products. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 157-168, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.021>
- Clydesdale, F.M. (1993). Color as a factor in food choice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 83-101.

- Cortez, R., Luna-Vital, D.A., Margulis, D., Gonzalez de Mejia, E. (2016). Natural pigments: Stabilization methods of anthocyanins for food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16 (1), 180-198.
- Bursać Kovačević D., Putnik P., Dragović-Uzelac V., Vahčić N., Skendrović Babojelić M. & Levaj B. (2015). Influences of organically and conventionally grown strawberry cultivars on anthocyanins content and color in purees and low-sugar jams. *Food Chemistry*, 181, 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.063>
- Deng, N., Li, M., Zhao, L.J., Lu, C.F., de Rooy, S.L. & Warner, I.M. (2011). Highly efficient extraction of phenolic compounds by use of magnetic room temperature ionic liquids for environmental remediation. *Journal of Hazardous Materials*, 192, 1350-1357.
- Fernández-Vázquez, R., Stinco, C.M., Meléndez-Martínez, A.J., Heredia, F.J. & Vicario, I.M. (2011). Visual and instrumental evaluation of orange juice color: a consumers' preference study. *Journal of Sensory Studies*, 26, 436-444.
- FAO/OMS. 1995. CODEX Alimentarius. Norma general para los aditivos alimentarios. *Codex stan 192-1995 Adoptado en 1995*. Revisión 1997, 1999, 2001, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019.
- Galaffu, N., Bortlik, K., & Michel, M. (2015). 5 – An industry perspective on natural food colour stability. In M. J. Scotter (Ed.), *Colour additives for foods and beverages*, 91–130. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-011-8.00005-2>
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Soto-Hernández, R. M., Guerra-Ramírez, D., Zuleta-Prada, H., Martínez-Damián, M. T., & Ramírez-Valencia, Y. D. (2021). Separation of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) betaxanthins, betacyanins, and soluble phenols through multistage aqueous two-phase systems. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 1791–1804. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02676-1>
- Goto, T. & Kondo, T. (1991). Structure and molecular stacking of anthocyanins—flower color variation. *Angewandte Chemie International English Edition*, 30, 17-33.

- Junfeng Yang, Wenjun Shi, Binbin Li, Yongchao Bai & Zhixia Hou. (2019). Preharvest and postharvest UV radiation affected flavonoid metabolism and antioxidant capacity differently in developing blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry*, 301, 125248, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125248>.
- Klisurova, D., Petrova, I., Ognyanov, M., Georgiev, Y., Kratchanova, M. & Denev, P. (2019). Co-pigmentation of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) anthocyanins with phenolic co-pigments and herbal extracts. *Food Chemistry*, 279, 162-170, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.125>
- Kubola, J. & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, 127, 1138-1145. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.115>
- Larson, R.A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969-978
- Lee, J. Durst, R. W. & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88, 1269-1278.
- Nevado, J.B., Cabanillas, C.G. & Salcedo, A.C. (1995). Simultaneous spectrophotometric determination of three food dyes by using the first derivative of ratio spectra. *Talanta*, 42 (12), 2043-2051. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(95\)01695-3](https://doi.org/10.1016/0039-9140(95)01695-3)
- Nosaibah E. & Rahmat S. (2021). Carbohydrate-based aqueous biphasic systems for biomolecules extraction. *Separation and Purification Technology*, 277, 119460. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.119460>.
- Ongkowijoyo, P., Luna-Vital, D.A. & Gonzalez de Mejia, E. (2018). Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. *Food Chemistry*, 250, 113-126, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.055>

- Patras, A., Brunton, N.P., O'Donnell, C. & Tiwari, B. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21 (1), 3-11.
- Pensri Charoensit, Fangjan Sawasdipol, Natthawadee Tibkawin, Nungruthai Suphrom & Nantaka Khorana, (2021). Development of natural pigments from *Tectona grandis* (teak) leaves: Agricultural waste material from teak plantations. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 19, 100365. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100365>
- Rodríguez-Salazar, N. & Valle-Guadarrama, S. (2020). Separation of phenolic compounds from roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces with aqueous two-phase extraction based on sodium citrate and polyethylene glycol or acetone. *Separation Science and Technology*, 55 (13), 2313-2324. <https://doi.org/10.1080/01496395.2019.1634730>
- Sadeghi, R. & Jahani, F. (2012). Salting-in and salting-Out of water-soluble polymers in aqueous salt solutions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116, 5234–5241. <https://doi.org/10.1021/jp300665b>
- Scalzo, J., Miller, S., Edwards, C., Meekings, J. & Alspach, P. (2009). Variation in phytochemical composition and fruit traits of blueberry cultivars and advanced breeding selections in New Zealand. *Acta Horticulturae*, 810, 823-830.
- Seeram, N.P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S.M., Feng, L., Dreher, M., et al. (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1415-1422.
- Shiow, Y.W., Hangjun, C., Mary, J. C. & Mark, K.E. (2012). Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). *Food Chemistry*, 132, 2, 855-864. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.050>
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.

- Tan, Z., Li, F. & Xing, J. (2010). Separation and purification of aloe anthraquinones using PEG/salt aqueous two-phase system. *Separation Science and Technology*, 46, 1503-1510.
- Tian Yao, Hongmei Li, Yuanhang Ren, Meilin Feng, Yichen Hu, Huiling Yan, Lianxin Peng (2021). Extraction and recovery of phenolic compounds from aqueous solution by thermo-separating magnetic ionic liquid aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*, 120034. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.120034>.
- Trouillas, P., Sancho-García, J.C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M. & Dangles, O. (2016). Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment. *Chemical Reviews*, 116 (9), 4937-4982.
- Tuorila, H., Parkkinen, K. & Tolonen, K. (2008). Aistit ammattikäyttöön [The professional use of senses]. *WSOY Oppimateriaalit Oy*, Helsinki.
- Xi-Lian Wei, Xiu-Hong Wang, A-Li Ping, Pan-Pan Du, De-Zhi Sun, Qing-Fu Zhang & Jie Liu. (2013). Formation and characteristics of aqueous two-phase systems formed by a cationic surfactant and a series of ionic liquids. *Journal of Chromatography B*, 939, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.09.006>
- Wang, S.Y., Chen, H., Camp, M.J. & Ehlenfeldt, M.K. (2012). Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). *Food Chemistry*, 132 (2), 855-864. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.050>
- Yoshida, K., Mori, M. & Kondo, T. (2009). Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Natural Product Reports*, 26, 884-915.
- Zhao, C.L., Yu, Y.Q., Chen, Z.J., Wen, G.S., Wei, F.G., Zheng, Q., Wang, C. & Xiao, X.L. (2017). Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chemistry*, 214, 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.073>

Zielinska, M. & Michalska, A. (2016). Microwave-assisted drying of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits: drying kinetics, polyphenols, anthocyanins, antioxidant capacity, colour and texture. *Food Chemistry*, 212, 671-680. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.003>

4. CONCLUSIONES GENERALES

El jugo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) demostró compatibilidad como disolvente en el sistema acuoso bifásico formado por polietilenglicol 4000 y citrato de sodio. Los compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas presentaron afinidad con la fase polimérica en altas concentraciones respecto a la fase salina.

La concentración de antocianinas del jugo de arándano disminuyó cuando la sedimentación se prolongó durante 24 h, lo cual sugirió que estos compuestos se ven afectados por el pH de la fase superior. La centrifugación no sólo evitó la exposición prolongada de las biomoléculas al medio, sino que también redujo el tiempo del proceso de separación mediante sistemas acuosos bifásicos, lo que es de gran importancia si se piensa en un escalamiento a nivel industrial.

La mayor condición para la separación de los pigmentos de interés resultó ser el tratamiento R30C, que consistió en el uso de sedimentación pasiva de 30 min y posterior centrifugación de 15 min, ya que se cuantificó mayor concentración de antocianinas y la menor concentración de azúcares en la fase superior.

El tratamiento con sedimentación pasiva de 24 h (R24C) concentró la mayor cantidad de fenoles solubles totales y, por tanto, la mayor actividad antioxidante, con lo cual se aceptó que los flavonoides no fueron los únicos compuestos fenólicos presentes en el jugo de arándano.

La bebida seleccionada como medio líquido resultó compatible con los requerimientos de pH del pigmento. El pigmento liofilizado otorgó ángulos de tono más bajos que el líquido y con menor cantidad de pigmento durante 12 d.

El contenido de antocianinas tuvo un comportamiento parecido en condiciones de degradación y conservación para los pigmentos líquidos obtenidos con sedimentación pasiva de 15 (R15C) y 30 min (R30C), seguidos de centrifugación por 15 min.

Los compuestos bioactivos característicos del arándano presentaron potencial pigmentante dentro del ángulo de tono del color rojo. Su uso como pigmento natural tiene potencial para colorear medios líquidos.