



**Universidad de Valladolid**



**ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES**

**Grado en Ingeniería Química**

**Extracción de antioxidantes y pigmentos de  
las flores de azafrán por técnicas asistidas  
por microondas**

**Autor:**

**Terreros Calvo, Sara**

**Tutor:**

**Mato Chain, Rafael Bartolomé  
Álvarez Martín, Ana  
Departamento de Ingeniería  
Química y Tecnología del Medio  
Ambiente**

**Valladolid, Julio y 2018.**



## RESUMEN

La especia del azafrán se obtiene de los estigmas de la flor de esta planta, generando así abundantes biorresiduos. Esta flor posee antocianinas y polifenoles que despiertan un interés comercial en la obtención de antioxidantes y pigmentos naturales. Este proyecto ha estudiado la influencia de la adición de un pretratamiento con microondas a una extracción convencional y el valor del extracto como colorante. Se ha optimizado la extracción convencional y posteriormente se ha aplicado el pretratamiento a la extracción convencional óptima hasta optimizar también este proceso. Los resultados se evaluaron comparando la riqueza, eficiencia y tiempo de extracción de ambos compuestos mediante espectrofotometría. Se han caracterizado las antocianinas y polifenoles mediante HPLC y ORAC y se ha medido el color con espectrofotometría. Los resultados han mostrado una disminución del tiempo de extracción y un alto contenido en una antocianina concluyendo así su utilización como colorante natural del pigmento obtenido.

**Palabras clave:** Antioxidantes, Antocianinas, Colorantes naturales, Microondas, Polifenoles.

## ABSTRACT

The saffron spice is obtained from the stigmas of the flower of this plant, thus generating abundant bio-waste. This flower has anthocyanins and polyphenols that arouse commercial interest in obtaining antioxidants and natural dyes. This project has studied the influence of the addition of a microwave pretreatment to a conventional extraction and the value of the extract as a dye. Conventional extraction has been optimized and then the pretreatment has been applied to the optimal conventional extraction until this process is also optimized. The results were evaluated by comparing the richness, yield and extraction time of both compounds by spectrophotometry. The anthocyanins and polyphenols were characterized by HPLC and ORAC and the colour was measured with spectrophotometry. The results have shown a decrease in extraction time and a high anthocyanin content thus concluding its use as a natural colorant of the obtained pigment.

**Keywords:** Antioxidants, Anthocyanins, Natural dyes, Microwave, Polyphenols.



# ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN .....	13
1.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	15
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
2.1 MATERIA PRIMA.....	21
2.2 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES Y ANTOCIANINAS.....	22
2.2.1 EXTRACCIÓN CONVENCIONAL .....	22
2.2.2 EXTRACCIÓN CON PRETRATAMIENTO ASISTIDO POR MICROONDAS .....	25
2.2.3 ANALISIS CINÉTICO .....	28
2.3 CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO.....	29
2.3.1 RESIDUO SECO .....	29
2.3.2 DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS TOTALES .....	30
2.3.3 DETERMINACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS .....	32
2.3.4 ANÁLISIS DE COLOR.....	34
2.3.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	36
2.3.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIFENOLES Y LAS ANTOCIANINAS .....	37
2.4 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.....	38
2.4.1 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD .....	38
2.4.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.....	38
2.4.3 DETERMINACIÓN DE EXTRACTIVOS Y GRASAS .....	39
2.4.4 DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES .....	41
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	43
3.1 RESULTADOS CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA .....	45
3.1.1 CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS FLORES DE AZAFRÁN.....	45
3.1.2 CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN LAS FLORES DEL AZAFRÁN .....	45

3.1.3 CONTENIDO DE EXTRACTIVOS Y GRASAS EN LAS FLORES DEL AZAFRÁN	46
3.1.4 RESULTADOS CENIZAS TOTALES	47
3.2 RESULTADOS CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO	47
3.2.1 RESULTADOS RESIDUO SECO	47
3.2.2 RESULTADOS TPC Y AC DE LAS EXTRACCIONES CONVENCIONALES	48
3.2.3 RESULTADOS TPC Y AC DE LAS EXTRACCIONES CON PRETRATAMIENTO ASISTIDO POR MICROONDAS	54
3.2.4 RESULTADOS MEDIDA DE COLOR	65
3.2.5 RESULTADOS CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	68
3.2.6 RESULTADOS CARACTERIZACIÓN DE ANTOCIANINAS Y POLIFENOLES	69
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	73
4. CONCLUSIONES	75
CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA	77
5. BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXOS	85
ANEXO 1	87

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPARATIVA DE EXTRACCIONES CONVENCIONALES EXISTENTES EN LA BIBLIOGRAFÍA.....	16
TABLA 2. PROPIEDADES DE LOS EXPERIMENTOS CONVENCIONALES .....	24
TABLA 3. PROPIEDADES EXPERIMENTO CONVENCIONAL PARA COMPROBAR SOLUBILIDAD DEL DISOLVENTE.....	24
TABLA 4. PROPIEDADES EXTRACCIONES CONVENCIONALES CON MEDIDA DE PH .....	25
TABLA 5. VARIABLES DE OPERACIÓN PARA EL PRETRATAMIENTO.....	25
TABLA 6. CONCENTRACIONES PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LA RECTA DE ÁCIDO GÁLICO.....	31
TABLA 7. GRADIENTE DE ELUYENTES .....	37
TABLA 8. CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS FLORES DEL AZAFRÁN. ....	45
TABLA 9. CANTIDAD DE PROTEÍNAS PRESENTE EN LAS DIFERENTES MATERIAS PRIMAS .....	45
TABLA 10. CANTIDAD DE EXTRACTIVOS PRESENTE EN LA MATERIA PRIMA .....	46
TABLA 11. PORCENTAJE DE GRASAS PRESENTE EN LA MATERIA PRIMA.....	46
TABLA 12. CANTIDAD DE CENIZAS POR GRAMO DE FLOR SECA.....	47
TABLA 13. RESIDUO SECO DE LAS EXTRACCIONES CONVENCIONALES.....	47
TABLA 14.RESIDUO SECO DE LAS EXTRACCIONES CON PRETRATAMIENTO .....	48
TABLA 15. RESULTADOS DE RIQUEZA Y RENDIMIENTO DE ANTOCIANINAS Y POLIFENOLES TOTALES DE LOS EXPERIMENTOS CONVENCIONALES.....	49
TABLA 16. RESULTADOS TPC DE LA CINÉTICA DE EXTRACCIÓN ÓPTIMA.....	52
TABLA 17. RESULTADOS AC EXTRACCIÓN CONVENCIONAL ÓPTIMA .....	53
TABLA 18. RESULTADOS PRETRATAMIENTO MICROONDAS.....	55
TABLA 19. RESULTADOS EXTRACCIÓN CON CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRETRATAMIENTO .....	63
TABLA 20. COMPARACIÓN VELOCIDADES INICIALES DE EXTRACCIÓN DE EXTRACCIÓN CONMICROONDAS Y EXTRACCIÓN CONVENCIONAL ÓPTIMA .....	65
TABLA 21. VALORES DE CONTROL DE LOS PARÁMETROS DE COLOR .....	66
TABLA 22. VALORES DE LAS COORDENADAS DE COLOR DE LAS EXTRACCIONES CON PRETRATAMIENTO Y COMPARATIVA CON EL CONTROL .....	66
TABLA 23. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO .....	68
TABLA 24. LONGITUDES DE ONDA PARA LA DETERMINACIÓN DE COORDENADAS XYZ.....	87





## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. EFICIENCIA DE EXTRACCIONES CONVENCIONALES.....	50
FIGURA 2. VARIACIÓN DEL PH CON EL TIEMPO DE LAS EXTRACCIONES CONVENCIONALES .....	51
FIGURA 3. RESULTADOS GRÁFICOS TPC EXTRACCIÓN ÓPTIMA .....	52
FIGURA 4.RESULTADOS GRÁFICOS AC EXTRACCIÓN CONVENCIONAL ÓPTIMA.....	54
FIGURA 5. COMPARACIÓN DE LA CINÉTICA DE LAS EXTRACCIONES DE TPC CONVENCIONALES Y LAS EXTRACCIONES CON PRETRATAMIENTO. ....	64
FIGURA 6.COMPARACIÓN DE LA CINÉTICA DE LAS EXTRACCIONES DE AC CONVENCIONALES Y LAS EXTRACCIONES CON PRETRATAMIENTO. ....	64
FIGURA 7. PUNTOS DE ANÁLISIS DE COLOR SEPARADOS POR TEMPERATURAS FINALES DEL PRETRATAMIENTO .....	68



## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1. MATERIA PRIMA, FLORES DE AZAFRÁN.....	21
ILUSTRACIÓN 2. EQUIPO DE EXTRACCIÓN .....	23
ILUSTRACIÓN 3. Q-TUBE CON VÁLVULA DE SEGURIDAD .....	27
ILUSTRACIÓN 4. RECTA DE CALIBRADO DE ÁCIDO GÁLICO .....	31
ILUSTRACIÓN 5. EQUIPO DE EXTRACCIÓN SOXHLET .....	40
ILUSTRACIÓN 6. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA EXTRACCIÓN DE TPC.....	57
ILUSTRACIÓN 7. RESULTADOS ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS .....	60
ILUSTRACIÓN 8. CONDICIONES ÓPTIMAS DEL PRETRATAMIENTO DE MICROONDAS .....	63
ILUSTRACIÓN 9. ESFERA CIELAB (SANT'ANNA ET AL., 2013) .....	67
ILUSTRACIÓN 10. ESPECTRO DE UNA LA ESPECIE FENÓLICA MÁS ABUNDANTE EN EL EXTRACTO.....	70
ILUSTRACIÓN 11. ESPECTRO DE ANTOCIANINA MÁS ABUNDANTE EN EL EXTRACTO .....	71



## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ec. 1.....	28
Ec. 2.....	28
Ec. 3.....	29
Ec. 4.....	29
Ec. 5.....	29
Ec. 6.....	30
Ec. 7.....	32
Ec. 8.....	32
Ec. 9.....	33
Ec. 10.....	33
Ec. 11.....	33
Ec. 12.....	34
Ec. 13.....	35
Ec. 14.....	35
Ec. 15.....	35
Ec. 16.....	35
Ec. 17.....	35
Ec. 18.....	35
Ec. 19.....	35
Ec. 20.....	35
Ec. 21.....	36
Ec. 22.....	38
Ec. 23.....	39
Ec. 24.....	52
Ec. 25.....	53



# CAPÍTULO 1.

# INTRODUCCIÓN





### 1.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La actual preocupación de la sociedad por el abuso del uso de conservantes químicos está aumentando notoriamente la demanda de productos naturales que cubran las mismas necesidades. Los conservantes naturales son ricos en antioxidantes y entre las fuentes naturales con las que se están trabajando en la actualidad para la extracción de estos compuestos se encuentran la granada o el orujo de la uva (Álvarez et al., 2017; Kaur et al., 2006). La flor del azafrán tiene una composición química rica en compuestos fenólicos y antocianinas, al igual que la uva y la granada, por lo que se podría considerar igualmente una fuente rica en antioxidantes (Jafar et al., 2016). Estos compuestos crean un gran interés en cuanto a sus beneficios anticancerígenos, antioxidantes y antivíricos en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética (Sólyom et al., 2014).

El azafrán es una especia muy valorada obtenida de los estigmas de las flores de la planta *Crocus Sativus* L. Su gran valor es debido a que el proceso de obtención de dichos estigmas es manual, sólo se puede realizar entre los meses de octubre y noviembre y hay que llevar a cabo la recolecta a primeras horas de la mañana cuando la flor está aún cerrada (Almodóvar et al., 2018). El mayor productor mundial de esta especia es Irán mientras que los países europeos bañados por el mediterráneo también tienen una gran importancia en dicha industria debido a sus climas (Zeka et al., 2015).

La producción de la especia del azafrán acarrea la generación de una gran cantidad de biorresiduos. Esto es debido a que únicamente es necesaria la utilización de los estigmas de la flor del azafrán, siendo más o menos un 90% de la planta lo que se desecha. Se estima que por cada kilogramo del producto deseado se crean 63 kilogramos de biorresiduos (Serrano-Díaz et al., 2013). Es importante por ello encontrar un uso para dichos biorresiduos creados en la producción de la especia, ayudando por tanto a la sostenibilidad del proceso.

Hasta la fecha se han utilizado los biorresiduos para la producción de compost y abonos (Lotfi et al., 2015). Sin embargo, como se ha citado anteriormente, los análisis fitoquímicos realizados a las partes de la flor, han revelado su interesante composición por su contenido en compuestos antioxidantes como los polifenoles y

las antocianinas. Esta composición permite la utilización del extracto obtenido de los biorresiduos como antioxidantes naturales (Mahdavee Khazaei et al., 2014).

El alto contenido en antocianinas de las flores de azafrán, un 86.4% en base seca del peso de la flor (Mahdavee Khazaei et al., 2014) hace que éstas tengan un color violáceo, lo que hace pensar que de ellas se puedan obtener pigmentos naturales de estas tonalidades, los cuales tendrían propiedades beneficiosas, como las citadas anteriormente, en el campo de la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica. Esta característica permitiría obtener un producto con un gran valor final debido a que, en la naturaleza, los colores cian y violetas son difíciles de encontrar lo que complica la obtención de colorantes naturales de estos colores (Araújo et al., 2018).

Actualmente, la mayoría de procesos de extracción que se describen en la bibliografía son extracciones convencionales que requieren largos tiempos de extracción para obtener una riqueza baja del producto, y es por ello que se busca la optimización de los procesos con el fin de aumentar dicha riqueza y disminuir los tiempos de extracción. La siguiente tabla hace referencia a los métodos convencionales que se encuentran en la bibliografía realizando una comparativa entre los disolventes utilizados, las relaciones S:L empleadas, los tiempos de extracción, la temperatura de extracción y la riqueza de los productos obtenidos.

Tabla 1. Comparativa de extracciones convencionales existentes en la bibliografía

Materia prima	Disolvente	Ratio S:L	T <sup>a</sup> ext. (°C)	t. ext. (h)	Riq. <sup>(1)</sup> TPC (g/g RS)	Riq. <sup>(2)</sup> AC (g/g RS)	Referencia
<b>flores liofilizadas y trituradas</b>	Agua-HCl (100:1 v/v)	0,03	T <sup>a</sup> amb.	1	13,57	14,92	(Serrano-Díaz et al., 2014)
<b>flores liofilizadas y trituradas</b>	Etanol	0,1	T <sup>a</sup> amb.	1	4,6	1,25	(Serrano-Díaz et al., 2014)
<b>flores liofilizadas y trituradas</b>	Etanol-HCl (100:1 v/v)	0,1	T <sup>a</sup> amb.	1	5,28	3,67	(Serrano-Díaz et al., 2014)

<b>flores liofilizadas y trituradas</b>	Diclorometano	0,2	T <sup>a</sup> amb.	1	5,22	0,27	(Serrano-Díaz et al., 2014)
<b>flores liofilizadas y trituradas</b>	Hexano	0,2	T <sup>a</sup> amb.	1	2,2	2,08	(Serrano-Díaz et al., 2014)
<b>flores secas</b>	Etanol-Agua acidificado 50%v	0,07	25°C	24	-	-	(Jafari et al., 2016)
<b>flores secas</b>	Etanol-Agua 50% acidificado con HCl 2N hasta pH=2	0,05	25°C	24	-	-	(Ahmad, Ashraf, Gani, & Gani, 2018)
<b>flores secas</b>	acetonitrilo:agua: TFA (50:47:3 v/v/v)	0,04	T <sup>a</sup> amb.	1	66,1	-	(Serrano-Díaz et al., 2013)

(1). Riq TPC: riqueza de los compuestos fenólicos totales encontrados en el extracto.

(2). Riq AC: riqueza de las antocianinas encontradas en el extracto.

Observando los resultados obtenidos en los procedimientos existentes en la bibliografía mostrados en la Tabla 1, se aprecia que, para tiempos de extracción cortos se obtienen riquezas bajas. Es por ello que en este trabajo se ha propuesto la utilización de un pretratamiento térmico asistido por microondas con el fin de optimizar el tiempo de extracción y alcanzar riquezas de producto más elevadas. Estudios realizados sobre extracciones de polifenoles y antocianinas en diferentes materias primas, como la uva (Álvarez et al., 2017) o el alperujo de la aceituna (Marie & Building, 2007), han permitido observar como la aplicación de este pretratamiento mejoraba las propiedades de riqueza, eficiencia y tiempo de extracción, del producto final. Es por ello que mediante este pretratamiento se pretende conseguir resultados similares. El pretratamiento debe provocar una ruptura de la materia sólida de las flores, lo cual debe facilitar la extracción de los compuestos fenólicos y las antocianinas aumentando así el rendimiento de la extracción y reduciendo los tiempos de extracción empleados.

Es por ello que el objetivo principal de este proyecto ha sido la aplicación de un pretratamiento asistido por microondas corto, para evitar la posible degradación de

antocianinas y polifenoles, a una extracción convencional, con el fin de obtener un producto final que contenga una elevada riqueza de ambos compuestos para su uso como antioxidantes o colorantes naturales. Para ello se ha realizado un estudio de optimización de las extracciones convencionales basadas en datos bibliográficos teniendo en cuenta las diferentes variables de operación como son la relación S:L, la temperatura y el tiempo de extracción; seguido de un estudio de optimización de las extracciones a las cuales se les ha aplicado el pretratamiento para poder elevar la riqueza del producto y poder disminuir el tiempo de extracción. Además, a fin de conseguir un colorante natural se ha realizado un posterior análisis de color de los pigmentos obtenidos y una caracterización de las especies presentes en el extracto.

# CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS



## 2.1 MATERIA PRIMA

La materia prima utilizada para la ejecución de los diferentes trabajos experimentales que han constituido este proyecto han sido las flores del azafrán. Dichas flores fueron recolectadas de una plantación de azafrán localizada en la comunidad de Castilla y León, España, durante los meses de octubre y noviembre de 2017.

Tras la recolecta, se retiró manualmente la parte más preciada de la flor, los estigmas, de los cuales se obtiene la tan cotizada especia del azafrán. Finalizado dicho proceso, se nos suministraron las flores, en el mismo mes de noviembre, y estas se almacenaron en diferentes bolsas de plástico que fueron congeladas a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización en los experimentos.

Para el proceso experimental, no se distinguió entre las diferentes partes de la flor, por lo que las extracciones se realizaron con la flor en su totalidad (estambres, pétalos y sépalos). Para la realización de la extracción, la materia prima fue descongelada previamente durante media hora, tiempo suficiente para que se produjera la descongelación total de las flores. En la siguiente imagen podemos observar la materia prima utilizada.



Ilustración 1. Materia prima, flores de azafrán

## 2.2 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES Y ANTOCIANINAS

Las extracciones de polifenoles y antocianinas se han llevado a cabo de dos maneras diferentes. En primer lugar, se han realizado extracciones convencionales, basadas en los diferentes datos bibliográficos ya existentes, modificando las variables de operación para determinar las condiciones óptimas. Posteriormente, se han realizado extracciones, las cuales incluían un pretratamiento térmico asistido por microondas, seguido por la extracción convencional con las condiciones obtenidas en las primeras extracciones. En el apartado de resultados se realiza un estudio comparativo de los resultados obtenidos con ambos métodos.

### 2.2.1 EXTRACCIÓN CONVENCIONAL

Las diferentes extracciones convencionales se han realizado utilizando dos tipos de disolvente, por un lado, una mezcla de etanol-agua (50:50 v/v) y, por otro lado, una mezcla de etanol-agua (60:40 v/v), ambas acidificadas con ácido clorhídrico hasta conseguir un disolvente con pH de 2. Los diferentes experimentos se han realizado cambiando las relaciones S:L, la temperatura de extracción y el tiempo de extracción.

El proceso de extracción se ha desarrollado siguiendo una serie de pasos. En primer lugar, se ha preparado un baño con agua a la temperatura a la que se ha llevado posteriormente la extracción. Mientras el baño alcanzaba la temperatura de extracción deseada, se han pesado las flores en un matraz, en el cual se ha añadido también una barra imantada con el fin de poder agitar la mezcla de materia prima y disolvente posteriormente y poder homogeneizar el extracto. A continuación, se ha añadido el disolvente, para conseguir las relaciones S:L deseadas. Una vez añadido el disolvente se ha barrido el aire contenido en matraz con una corriente de nitrógeno con el fin de evitar la oxidación de los productos fenólicos obtenidos. Se ha cerrado el matraz con un tapón y se ha puesto en agitación durante 5 minutos, tiempo en el cual se extraen los polifenoles no ligados que se encuentran en la materia prima. Transcurrido este tiempo se ha tomado la primera muestra del extracto, se ha vuelto a barrer con nitrógeno el interior del matraz y se ha cerrado. Antes de introducir el matraz al baño para comenzar el proceso de extracción, éste se ha envuelto en papel



de aluminio para evitar la incidencia de la luz en el extracto. Una vez cubierto se ha introducido en el baño y se ha puesto en agitación para homogeneizar la mezcla durante la extracción.

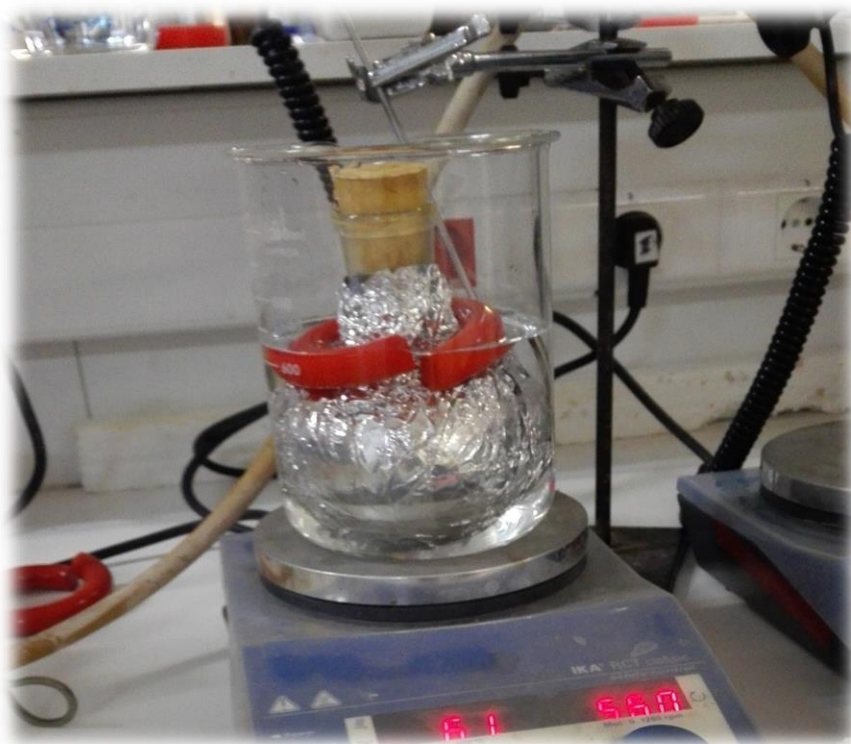


Ilustración 2. Equipo de extracción

El matraz ha permanecido en el baño todo el tiempo de extracción, y durante ésta se han tomado muestras del extracto que han permitido conocer la cinética de la extracción.

Una vez finalizada la extracción se ha separado el extracto, y éste junto a las muestras tomadas durante la extracción se ha centrifugado, a fin de eliminar las posibles partículas sólidas que quedaban en suspensión. El extracto se ha guardado en botellas de plástico ámbar y, junto con las muestras, se ha guardado en el congelador para su posterior análisis.

Los experimentos realizados han sido los siguientes:

Tabla 2. Propiedades de los experimentos convencionales

Ext.	DISOLVENTE	MASA FLORES (g)	V. DISOLVENTE (ml)	RATIO S:L	t. EXTRACCIÓN (h)	Tª EXTRACCIÓN (°C)
C.1	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50 v/v)	4,17	80	0,05	24	30
C.2	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50 v/v)	5,76	80	0,07	24	30
C.3	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50 v/v)	12,24	40	0,31	2	30
C.3'	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50 v/v)	30,17	100	0,30	3	30
C.4	EtOH-H <sub>2</sub> O (60:40 v/v)	16,49	80	0,21	2	66
C.5	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50 v/v)	24,30	126	0,19	24	30
C.7	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50 v/v)	10,06	100	0,10	24	30
C.8	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50 v/v)	30,16	60	0,50	3	30
C.9	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50 v/v)	30,23	40	0,76	3	30
C.10	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50 v/v)	27,53	30	0,92	3	30

Para comprobar si en la extracción había una limitación por la solubilidad del disolvente se realizó un experimento en el que se añadieron cantidades adicionales de disolvente a lo largo de la extracción, 52 ml a las 3 horas y 92 ml a las 6 horas. Estas adiciones se realizaron para aumentar la capacidad de disolución de la mezcla. El procedimiento seguido fue el mismo que se ha descrito anteriormente. El experimento se llevó a cabo en las siguientes condiciones.

Tabla 3. Propiedades experimento convencional para comprobar solubilidad del disolvente

	DISOLVENTE	MASA FLORES (g)	V. DISOLVENTE (ml)	RATIO S:L	t. EXTRACCIÓN (h)	Tª EXTRACCIÓN (°C)
C.6	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50 v/v)	10,01	50	0,20	3	30
			102	0,10	6	30
			194	0,05	24	30

Tras las extracciones realizadas también se han llevado a cabo tres extracciones con diferentes relaciones S:L, para comprobar por qué en un tiempo infinito, no se conseguían las mismas riquezas y si era debido a la influencia del pH en la extracción. Las condiciones de los experimentos son las mostradas a continuación.

Tabla 4. Propiedades extracciones convencionales con medida de pH

	DISOLVENTE	MASA FLORES (g)	V. DISOLVENTE (ml)	RATIO S:L	t. EXTRACCIÓN (h)	Tª EXTRACCIÓN (°C)
C. PH1	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50 v/v)	17,90	60	0,30	3	30
C. PH2	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50 v/v)	9,23	90	0,10	3	30
C. PH3	EtOH-H <sub>2</sub> O (50:50 v/v)	18,23	90	0,20	3	30

### 2.2.2 EXTRACCIÓN CON PRETRATAMIENTO ASISTIDO POR MICROONDAS

Los experimentos sometidos al pretratamiento térmico asistido por microondas se han realizado combinando diferentes relaciones S:L de la mezcla a la que se le aporta el pretratamiento y diferentes aportes de energía, hasta encontrar, al igual que en las extracciones convencionales, unas condiciones óptimas.

Las variables del pretratamiento que se han combinado entre sí para la realización de los experimentos son las siguientes.

Tabla 5. Variables de operación para el pretratamiento

S:L (g/ml)	Tª alcanzada (°C)
0,3	60
	80
	108
	120
0,5	60
	80
	108
	120
0,7	60
	80
	108
	120

El microondas utilizado para la realización del pretratamiento ha sido una unidad CEM Discover. Dicha unidad emite una potencia de 300W y en operación en matraz abierto opera a presión atmosférica, por lo que no permite operar a temperaturas

superiores a la de ebullición del disolvente. Por este motivo, los experimentos que han requerido una temperatura mayor de 100°C se han realizado presurizados.

El procedimiento experimental, tanto para los experimentos que se realizan presurizados como para los que no, es el mismo, sólo se diferencian en el recipiente en el que se llevan a cabo y en el pretratamiento en el microondas.

Para llevar a cabo el proceso, se ha procedido igual que en la extracción convencional. En primer lugar, se ha preparado un baño con agua a la temperatura óptima obtenida de los experimentos convencionales, donde se ha introducido el recipiente tras el pretratamiento para realizar la extracción. Mientras el baño alcanza la temperatura se ha realizado el pretratamiento. Para ello se han pesado 18 ó 30 gramos de flores, según se haya trabajado con una relación S:L de 0,3, 0,5 ó 0,7, y se han introducido en un recipiente. Para los experimentos que no se han realizado presurizados se ha utilizado un matraz de balón, y para los presurizados una celda OianCap Q-Tube (OLabtech), que es un reactor de vidrio con válvula de seguridad que permite operar a una presión de 4,2 bar. A continuación, se ha añadido una barra imantada que ha permitido la agitación, y un volumen de disolvente de 60ml para las relaciones S:L de 0,3 y 0,5 y de 43 ml para conseguir la relación S:L de 0,7. Tras añadir el disolvente se ha homogeneizado la mezcla durante 5 minutos y se ha tomado la primera muestra. En ese momento se ha realizado el pretratamiento. Para ello se ha introducido el matraz o el Q-Tube en el microondas. En los experimentos llevados a cabo en el matraz se ha controlado la temperatura mediante una sonda de temperatura, mientras que los experimentos presurizados se han realizado cerrando el Q-Tube mediante tapón para presurización unido a un manómetro que ha permitido conocer la presión manométrica.

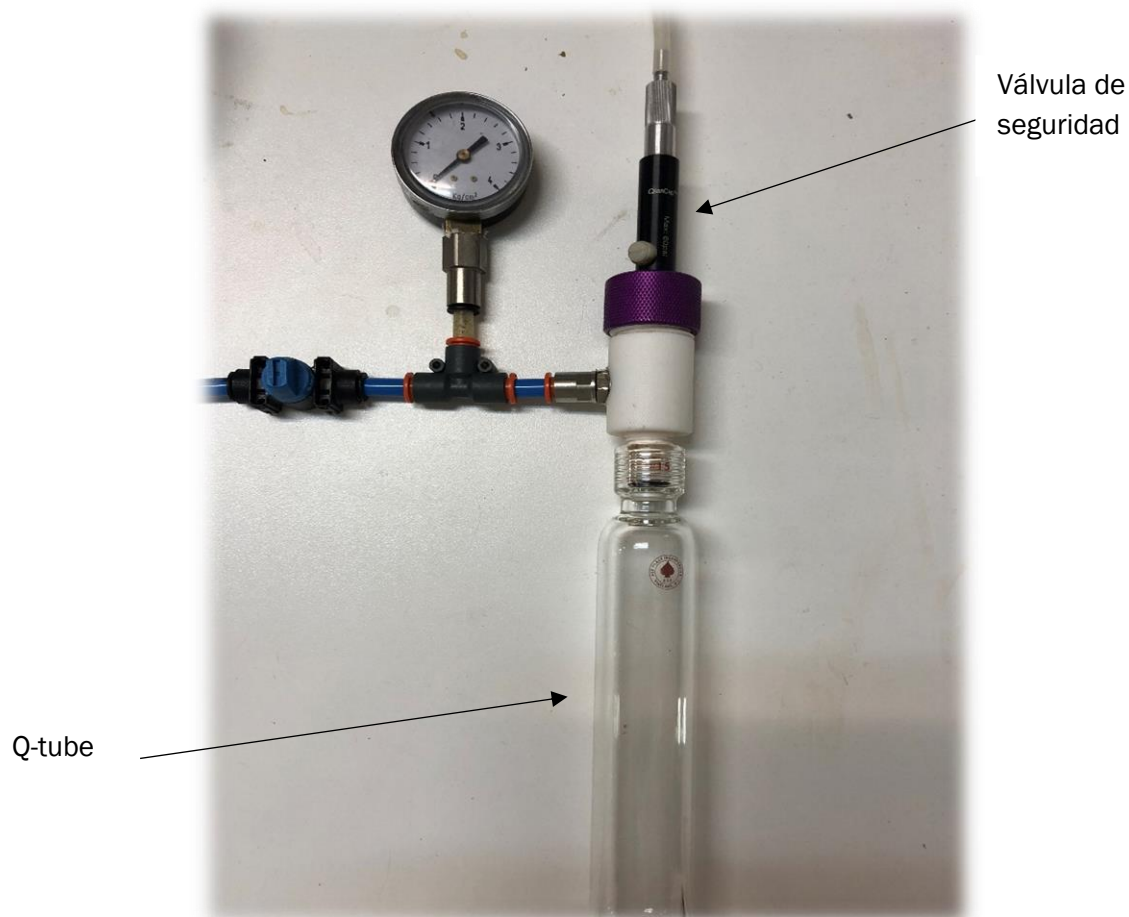


Ilustración 3. Q-Tube con válvula de seguridad

El aporte de energía se ha parado en el momento en el que se ha alcanzado la temperatura deseada. En los experimentos presurizados se ha buscado alcanzar una presión de 1.8 bares manométricos para alcanzar 108 °C y 4 bares para los 120°C. Una vez alcanzada la temperatura deseada se ha enfriado rápidamente el recipiente bajo un grifo de agua fría hasta alcanzar la temperatura ambiente, a fin de minimizar la posible degradación de los compuestos de interés. En ese momento se ha añadido disolvente nuevamente hasta alcanzar la relación S:L óptima de los experimentos convencionales para seguir con la extracción convencional. Se ha tomado una muestra para analizar los efectos del pretratamiento, se ha barrido el aire con nitrógeno del interior del recipiente y se ha cerrado. Finalmente se ha cubierto con papel de aluminio, al igual que en la extracción convencional, y se ha introducido en el baño, siguiendo a partir de este momento los mismos pasos que se han seguido en los experimentos de extracción convencional.

Las muestras tomadas en estos experimentos se han almacenado igualmente en un congelador hasta su análisis.

La energía absorbida en el pretratamiento se ha calculado teniendo en cuenta la energía absorbida por la materia prima y la absorbida por el disolvente, teniendo en cuenta la evaporación del disolvente cuando se ha trabajado a temperaturas mayores de las de ebullición(Sólyom et al., 2011).

### 2.2.3 ANALISIS CINÉTICO

Las muestras tomadas durante las extracciones, tanto las efectuadas con el pretratamiento como las convencionales, han permitido realizar un estudio de la cinética del rendimiento de la extracción para los polifenoles y las antocianinas. Las primeras muestras tomadas tras el tiempo de homogeneización han permitido conocer las concentraciones de los polifenoles y antocianinas no adheridas que se encontraban en la materia prima. Dicho estudio se ha ajustado con la siguiente ecuación.

$$C = C_0 + C_f \cdot (1 - e^{-kt}) \quad \text{Ec. 1}$$

Donde C es la concentración en mg/g<sub>seco</sub> en un tiempo t, C<sub>0</sub> es la concentración inicial de polifenoles o antocianinas liberadas inicialmente (t=0), C<sub>f</sub> es un factor pre-exponencial en mg/g<sub>seco</sub> que sumándolo a C<sub>0</sub> daría la concentración final de la extracción (t= ∞) y k es un ratio constante de extracción medido en min<sup>-1</sup>(Álvarez et al., 2017).

Para el estudio de la cinética se han calculado los valores de k, C<sub>0</sub> y C<sub>f</sub> realizando un ajuste mediante regresión para minimizar la desviación media relativa (ARD) la cual viene dada por la siguiente fórmula:

$$ARD = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{C_{exp} - C}{C_{exp}} \right| \quad \text{Ec. 2}$$

Para efectuar el análisis se han determinado la velocidad de extracción inicial (U<sub>0</sub>) y la concentración en un tiempo infinito (C<sub>∞</sub>) mediante las siguientes expresiones.

$$U_0 = \left. \frac{dC}{dt} \right|_{t=0} = k \cdot C_f \quad \text{Ec. 3}$$

$$C_\infty = \lim_{t \rightarrow \infty} C = C_0 + C_f \quad \text{Ec. 4}$$

## 2.3 CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO

En todos los experimentos, tanto en los convencionales como en los que se les ha aplicado el pretratamiento, se ha medido: 1) el residuo sólido que genera el extracto polifenólico, 2) el total de los compuestos fenólicos existentes en el extracto, 3) la cantidad de antocianinas y 4) la cantidad de antioxidantes totales. Además, se ha realizado un análisis del color de los pigmentos obtenidos y una caracterización de las AC y los TPC mediante cromatografía líquida de alta eficacia.

### 2.3.1 RESIDUO SECO

Para obtener el residuo seco (RS), se ha pesado un vial de cristal donde posteriormente se ha añadido 1 ml de muestra. El proceso se ha realizado para cada una de las muestras que se han tomado de cada uno de los experimentos. De este modo se ha podido observar, a parte del residuo final, la evolución durante la extracción del residuo seco, que representa la totalidad de compuestos extraídos en el disolvente, incluidos los polifenoles. A continuación, se ha introducido el vial con el mililitro en una estufa a 105°C durante 24 horas. Tras este tiempo de secado se ha introducido el vial en un desecador con gel de sílice hasta alcanzar la temperatura ambiente y se ha pesado nuevamente.

De este modo se ha obtenido el residuo seco que genera el extracto con la siguiente ecuación.

$$RS \left[ \frac{g \text{ extracto seco}}{ml \text{ extracto húmedo}} \right] = \frac{m_{v+rs} - m_v}{V_{muestra}} \quad \text{Ec. 5}$$

Donde  $m_{v+rs}$  es la masa del vial con el residuo tras el secado,  $m_v$  es la masa del vial y  $V_{muestra}$  es el volumen de la muestra que se ha añadido al vial.

El error cometido en la medida se ha calculado mediante la siguiente ecuación.

$$Error\ RS = \sum \left( \frac{\partial RS}{\partial x} \cdot \Delta x \right) \quad \text{Ec. 6}$$

Donde  $x$  son las diferentes variables de las que se ha tomado medida. Se ha despreciado el error cometido en la medida de volumen.

### 2.3.2 DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS TOTALES

Para la determinación de los compuestos fenólicos totales (TPC) se ha seguido el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Este método se basa en la reducción del reactivo de Folin que es una mezcla de óxidos de tungsteno y molibdeno. Los productos del óxido de metal absorben color en un máximo de 765 (Waterhouse, 2002) ya que debido a su reducción el reactivo de Folin torna de un color amarillo a un color azul intenso.

Las medidas de análisis se han realizado con un espectrofotómetro SHIMADZU modelo UV-2550 (UV-VIS) el cual proporciona diferentes medidas de absorbancia según la cantidad de compuestos fenólicos del extracto.

El procedimiento se ha llevado a cabo del siguiente modo (Cicco et al., 2009). En primer lugar, se prepararon las muestras a analizar. Para ello, primero se preparó un baño de agua a 40°C en el que después se han incubado las muestras. A continuación, se han tomado 40µl de cada una de las muestras y se han introducido en tubos de ensayo. Se ha preparado un tubo de ensayo utilizado como blanco en el que en vez añadir muestra se ha añadido disolvente. A continuación, se han añadido 3000 µl de agua a cada tubo y seguido se ha añadido 200 µl de reactivo de Folin a cada tubo. Se han agitado y se ha esperado un tiempo de 5 minutos. Tras este tiempo se han adicionado de una disolución de 600 µl de carbonato de sodio saturada un 20% y se ha vuelto agitar. Posteriormente se han introducido los tubos de ensayo en el baño de agua y se han dejado durante 30 minutos incubando.



Para poder cuantificar la cantidad de compuestos fenólicos totales se ha realizado una recta patrón de ácido gálico, que se ha determinado mediante disoluciones con un rango de concentraciones entre 0 y 900 ppm llevadas a cabo mediante el proceso anterior. La recta y las posteriores medidas se realizaron trabajando mediante espectrofotometría a 765nm.

Los resultados que se han obtenido se han expresado en miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de extracto.

Tabla 6. Concentraciones para la construcción de la recta de ácido gálico

MUESTRA	Concentración (mg/L)	Absorbancia (765nm)
BLANCO	0	0,001
P1	110,5	0,16
P2	221	0,317
P3	442	0,607
P4	663	0,894
P5	884	1,137

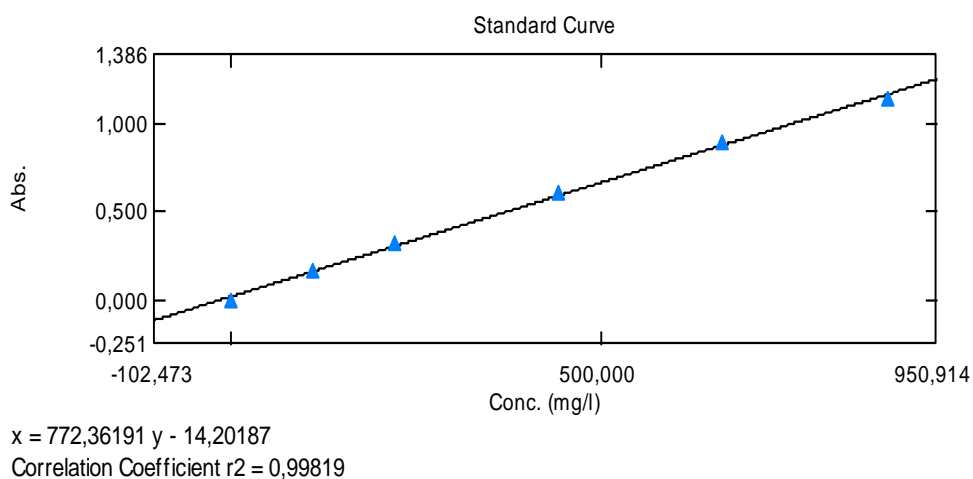


Ilustración 4. Recta de calibrado de ácido gálico

Una vez realizado el calibrado y transcurridos los 30 minutos de incubación se han medido las muestras, midiendo primero el blanco y posteriormente las muestras a analizar.

Con las concentraciones de compuestos fenólicos totales y los resultados obtenidos en la determinación del residuo sólido de cada muestra y los datos de

humedad se han calculado la riqueza del extracto ( $g_{GAE}/g_{RS}$ ), que permite conocer la concentración de polifenoles en el producto final que se podría comercializar, que corresponde al extracto seco, y la eficiencia de la extracción ( $mg_{GAE}/g_{flores\ secas}$ ), que indica la cantidad total de polifenoles que se consigue extraer referida a 1 gramo de flores secas. Las expresiones con las que se han calculado estas variables son las siguientes.

$$Eficiencia \left( \frac{mg_{GAE}}{g_{flores\ secas}} \right) = \frac{C \cdot V}{m_{flores} \cdot (100 - H)} \quad \text{Ec. 7}$$

$$Riqueza \left( \frac{g_{GAE}}{g_{RS}} \right) = \frac{C}{RS \cdot 1000} \quad \text{Ec. 8}$$

Donde C es la concentración en  $mg_{GAE}/L_{extracto}$  medida mediante espectrofotometría,  $m_{flores}$  es la masa inicial de la materia prima, V es la cantidad de disolvente, H es la humedad expresada en tanto por ciento y RS el residuo seco calculado en el apartado anterior.

### 2.3.3 DETERMINACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS

Para la determinación de las antocianinas (AC) se ha utilizado un método basado en el cambio de pH. Las antocianinas cambian de color con los cambios de pH de manera que cuando se encuentran en un pH cercano a 1 el ion oxonio se encuentra en su forma coloreada, mientras que cuando se encuentran en un pH de 4,5 el ion oxonio aparece de forma incolora. De este modo podemos determinar la cantidad de antocianinas mediante la diferencia de absorbancia de los pigmentos trabajando a diferentes pHs con una longitud de onda de 520 nm, basando los resultados en una base de cianidina-3-glucósido (AOAC official method, 2005).

Las medidas de absorbancia se han realizado con el espectrofotómetro SHIMADZU modelo UV-2550 (UV-VIS) trabajando con unas longitudes de onda de 520 nm y 700nm. Para el análisis se han utilizado dos disoluciones tampón: la primera una disolución 0,025 M de KCl con pH=1, y la segunda una disolución de acetato de sodio 0,4 M con pH=4,5, ambas disoluciones acidificadas con ácido clorhídrico.

El método de análisis se ha realizado siguiendo los siguientes pasos. En primer lugar, se han preparado las muestras, para ello se han utilizado dos tubos de ensayo por muestra. A cada tubo de ensayo se le ha añadido una pequeña cantidad de la muestra a analizar, normalmente 70 µl. La muestra contenida en el primer tubo de ensayo se ha diluido con la primera disolución tampón con pH=1 tornando así a un color rosado. La muestra contenida en el segundo tubo de ensayo se ha diluido con la segunda disolución tampón con pH=4,5, lo que ha vuelto incolora la disolución. Este procedimiento se ha seguido para todas las muestras. Una vez diluidas las muestras se ha medido la absorbancia de cada muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520nm y 700 nm, midiendo primero la disolución con pH=1 y seguido la disolución con pH=4,5.

Los resultados obtenidos han sido las absorbancias de cada muestra para cada longitud de onda y con estos datos se ha calculado la variación de la absorbancia de la muestra con la siguiente expresión.

$$A = [A_{520} - A_{700}]_{pH=1} - [A_{520} - A_{700}]_{pH=4,5} \quad \text{Ec. 9}$$

Mediante este valor se ha podido calcular la concentración de antocianinas ( $C_{AC}$ ), expresada en miligramos de equivalentes de cianidina-3-glucósido por litro con la siguiente expresión.

$$C_{AC} \left( \frac{mg_{CGE}}{L} \right) = \frac{A \cdot M_m \cdot DF \cdot 10^3}{\epsilon \cdot l} \quad \text{Ec. 10}$$

Donde  $M_m$  es el peso molecular (449,2 g/mol);  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar (26900 L / mol · cm); DF es el factor de dilución de la muestra en la disolución tampón y  $l$  es la trayectoria de la luz que atraviesa la muestra, en cm.

Una vez obtenida la concentración se ha calculado, al igual que para los TPC, la eficiencia de la extracción y la riqueza del producto obtenido, con el fin de conocer la cantidad de antocianinas extraídas por cada gramo de flor seca y la concentración de antocianinas presentes en el producto final, respectivamente.

$$Eficiencia \left( \frac{mg_{CGE}}{g_{flores\ secas}} \right) = \frac{C \cdot V}{m_{flores} \cdot (100 - H)} \quad \text{Ec. 11}$$

$$Riqueza \left( \frac{g_{CGE}}{g_{RS}} \right) = \frac{C}{RS \cdot 1000} \quad \text{Ec. 12}$$

Donde C es la concentración en  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{L}_{\text{extracto}}$  medida mediante espectrofotometría,  $m_{\text{flores}}$  es la masa inicial de la materia prima, V es la cantidad de disolvente, H es la humedad expresada en tanto por ciento y RS el residuo seco.

#### 2.3.4 ANÁLISIS DE COLOR

Para el análisis del color de los extractos se ha secado la muestra con el fin de obtener un pigmento. Para ello primero se ha retirado el etanol de la muestra mediante el uso del rotavapor, trabajando con una bomba de vacío y a una temperatura de  $80^{\circ}\text{C}$ . Tras la retirada del etanol, se ha almacenado la muestra en el congelador durante 24h y una vez congelada se ha introducido en la liofilizadora para secar la muestra. En la liofilizadora ha permanecido 48 horas y tras este tiempo se ha obtenido la muestra seca.

Para medir el color se han pesado 0,0025 gramos de muestra, los cuales se han disuelto en 5 mililitros de disolvente agua-etanol (50:50 v/v) acidificado con ácido clorhídrico hasta un pH de 2. Una vez disuelto se ha medido la transmitancia de cada muestra.

El método empleado para el análisis de color ha sido el de ordenada seleccionada, el cual consiste en la toma de 30 datos para cada valor triestímulo X, Y y Z (Albarado & Aguilera, 2001). Cada valor tomado viene recogido en la Tabla 24 incluida en el ANEXO 1. Para cada valor triestímulo se han sumado sus 30 valores y se han multiplicado por las siguientes constantes, características para el iluminante C y para el observador patrón  $2^{\circ}$  y así se han obtenido las coordenadas X, Y y Z.

$$X = 0,03269 \cdot \sum T_x \quad \text{Ec. 13}$$

$$Y = 0,03333 \cdot \sum T_y \quad \text{Ec. 14}$$

$$Z = 0,03938 \cdot \sum T_z \quad \text{Ec. 15}$$

Para convertir estas coordenadas al sistema de coordenadas CIE, L\*, a\* y b\*, se han utilizado las siguientes ecuaciones.

$$L^* = 116 \cdot \frac{Y^{\frac{1}{3}}}{100} - 16 \quad \text{Ec. 16}$$

$$a^* = 500 \cdot \left( \frac{X^{\frac{1}{3}}}{98,0681} - \frac{Y^{\frac{1}{3}}}{100} \right) \quad \text{Ec. 17}$$

$$b^* = 200 \cdot \left( \frac{Y^{\frac{1}{3}}}{100} - \frac{Z^{\frac{1}{3}}}{118,2313} \right) \quad \text{Ec. 18}$$

Ecuaciones características para iluminante C y observador patrón 2°.

El espacio de color también se mide según las variables C\*, h y L\*, de manera que con los datos obtenidos también se ha calculado C\* y h\* mediante las siguientes expresiones (Sant'Anna, Gurak, Ferreira Marczak, & Tessaro, 2013).

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ec. 19}$$

$$h = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) + 360^\circ \quad \text{Ec. 20}$$

Estas dos variables hacen referencia a la saturación y al tono respectivamente.

El análisis se ha basado en la comparación de una muestra de control con las muestras obtenidas de los pigmentos de las extracciones con pretratamiento. La muestra de control se ha creado con el pigmento obtenido de una de las extracciones

convencionales realizada con las variables óptimas de operación. Para la comparación de los colores obtenidos se ha utilizado la siguiente expresión.

$$\Delta E = ((\Delta L *)^2 + (\Delta a *)^2 + (\Delta b *)^2)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ec. 21}$$

### 2.3.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

El método ORAC permite medir la capacidad de absorbanza de los radicales de oxígeno, lo cual permite conocer la cantidad de antioxidantes que contiene una muestra. El método que se ha seguido para medir la capacidad antioxidante de las muestras se basa en la disminución de la señal fluorescente de la fluoresceína al mezclarse con especies de oxígeno activo, generadas por descomposición térmica. Al tener las muestras compuestos antioxidantes, estos hacen que la señal de la fluoresceína sea más estable, dependiendo la estabilidad de la capacidad antioxidante. Los datos de las señales obtenidas se comparan con un estándar, Trolox® y se expresan en micromoles de Trolox® equivalentes por mililitro de muestra.

Para llevar a cabo este método se han realizado diluciones de los pigmentos obtenidos en el secado de los extractos con disolvente etanol-agua (50:50 v/v) acidificado con ácido clorhídrico, diluyendo 0,05 g de pigmento en 5 ml de disolvente. En la realización del análisis se ha utilizado una placa de 96 pocillos. En esta placa se han ocupado 3 pocillos para la medida de un blanco, 15 para la medida de disoluciones estándar que han permitido el calibrado y 6 para cada muestra. Las disoluciones estándar empleadas contenían 200, 100, 50, 25 y 12,5 µl de Trolox, por lo que se han utilizado 3 pocillos para cada una. En cada pocillo se han introducido 150 µl de fluoresceína y 25 µl de la muestra correspondiente, blanco o disolución estándar. Se ha llevado la placa a incubación durante 30 minutos a 37 °C y posteriormente se han añadido 25 µl de AAPH en cada pocillo y se ha efectuado el análisis.

Los resultados obtenidos se han expresado en milimoles de trolox equivalentes por litro de disolución.

### 2.3.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIFENOLES Y LAS ANTOCIANINAS

Las mismas diluciones preparadas para el análisis ORAC y el análisis de color se utilizaron para la caracterización de los polifenoles y las antocianinas. Estas muestras se han analizado mediante un análisis de cromatografía líquida de alta eficacia.

El método consiste en la separación de los diferentes componentes mediante la adición de un módulo de separación Waters e2695 y un detector de matriz de fotodiodos Waters 2998 (DAD). Para el análisis se inyectaron 20 µl de muestra en un flujo de eluyente de 1 ml/min el cual pasó por una columna Teknokrima C18 (250x4,6 mm, 5 µm) que incluye una precolumna OptiGuard que trabaja a 35°C. Los eluyentes que se han utilizado para el análisis han sido (A) fosfato de amonio monobásico 50mM y pH=2,6, (B) una mezcla de 80% de acetonitrilo y 20% de eluyente A y (C) agua acidificada con ácido fosfórico hasta pH=1,5. Los gradientes de los eluyentes se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Gradiente de eluyentes

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)	Eluyente C (%)
0,0	100	0	0
2,0	100	0	0
5,0	92	8	0
17,0	0	14	86
22,0	0	18	82
29,5	0	21	79
55,0	0	33	67
70,0	0	50	50
75,0	0	50	50
78,0	20	80	0
81,0	20	80	0
86,0	100	0	0

Las señales de DAD obtenidas se han registrado a 280 y 520 nm así como los espectros del UV/VISIBLE.

## 2.4 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

### 2.4.1 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

La materia prima con la que se realizaron los experimentos eran flores que no habían sido sometidas a ningún proceso de secado. La bibliografía en la que se ha basado el proyecto realizaba las extracciones con materia prima seca, por ello se ha determinado la humedad de las flores para corregir las relaciones S:L con el factor de humedad.

Para determinar la humedad se han pesado aproximadamente 1,2 gramos de flores húmedas en un recipiente de 6 gramos de peso. Dicho recipiente junto con las flores se introdujo en una estufa a 105 °C durante 24 horas y tras este periodo de tiempo se sacó y se dejó enfriar en un desecador con gel de sílice hasta la temperatura ambiente. Una vez frío se pesó la muestra y se calculó el contenido de la humedad del siguiente modo.

$$H(\%) = \frac{(m_{v+fh} - m_{v+fs})}{(m_{v+fh} - m_v)} \quad \text{Ec. 22}$$

Donde  $m_{v+fh}$  es la masa del vial con las flores húmedas,  $m_{v+fs}$  es la masa del vial con las flores secas y  $m_v$  es la masa del vial.

### 2.4.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de proteínas se puede realizar mediante la medida de nitrógeno presente en la materia prima. El nitrógeno orgánico se define como el nitrógeno ligado orgánicamente en el estado de oxidación trinegativo. El nitrógeno orgánico se mide junto con el amoniacal y se denomina nitrógeno Kjeldahl, obteniendo el nitrógeno orgánico por diferencia de los resultados de medidas individuales del nitrógeno Kjeldahl y el amoniacal.

El proceso de determinación del nitrógeno Kjedah se ha realizado en dos tipos de muestra, una sometida previamente a un proceso de extracción Soxhlet y la otra antes de someter las flores a dicha extracción. En ambos casos se ha pesado una



pequeña cantidad de flores, y se ha añadido a un tubo de digestión, al cual se han adicionado posteriormente 25 ml de agua. A continuación, se han añadido 3 ml de ácido sulfúrico de 98% y una pastilla de catalizador. Dicho tubo se ha sometido a un proceso de digestión a 370°C durante 1 hora, proceso mediante el cual el nitrógeno se transforma en sulfato de amonio. Transcurrido este tiempo se dejan enfriar los tubos y posteriormente se ha sometido a destilación el digerido. El destilado se ha recogido en un Erlenmeyer con 100 ml de bórico indicador. Posteriormente, se ha valorado el destilado con ácido sulfúrico de normalidad 0,01N.

Una vez valorado el destilado la siguiente expresión ha permitido calcular la concentración de nitrógeno Kjeldahl expresada en % de Nitrógeno.

$$\text{Cantidad de Nitrogeno } \left( \frac{mg_N}{g_{\text{materia prima}}} \right) = \frac{(N \cdot V) \cdot 14000}{g_{\text{materia prima}}} \quad \text{Ec. 23}$$

Donde V es el volumen de ácido sulfúrico añadido en la valoración y N la normalidad del ácido.

Una vez calculada la cantidad de nitrógeno, ésta se ha multiplicado por un factor de 6,25, factor de conversión del porcentaje de nitrógeno al porcentaje total de proteínas que se encuentran en la muestra.

### 2.4.3 DETERMINACIÓN DE EXTRACTIVOS Y GRASAS

El método de extracción soxhlet ha permitido conocer la cantidad de extractivos y la cantidad de grasas presentes en la materia prima. Para conocerla cantidad de extractivos presentes en las flores se han realizado dos experimentos de extracción utilizando dos disolventes diferentes, en primer lugar, agua y posteriormente etanol. Por otro lado, para conocer la cantidad de grasas se ha utilizado hexano como disolvente.

Para la realización del método soxhlet para medir los extractivos se ha pesado un cartucho de celulosa en el que posteriormente se ha añadido una masa de flores hasta llenar el cartucho tres cuartos de su totalidad, y posteriormente se ha pesado

el cartucho con las flores. Una vez pesado se ha introducido en el equipo de extracción, el cual contenía el 100 ml de agua y se ha dejado extraer durante 7 horas. Tras este tiempo se ha introducido el cartucho en una estufa a 105°C durante 24 horas y se ha dejado secar el residuo de materia prima contenida en el cartucho. El extracto obtenido se ha almacenado para su posterior análisis. Una vez seco el cartucho se ha vuelto a pesar y se ha vuelto a someter a una extracción de 7 horas con un disolvente orgánico como el etanol para extraer los extractivos restantes y se ha repetido el proceso anterior.

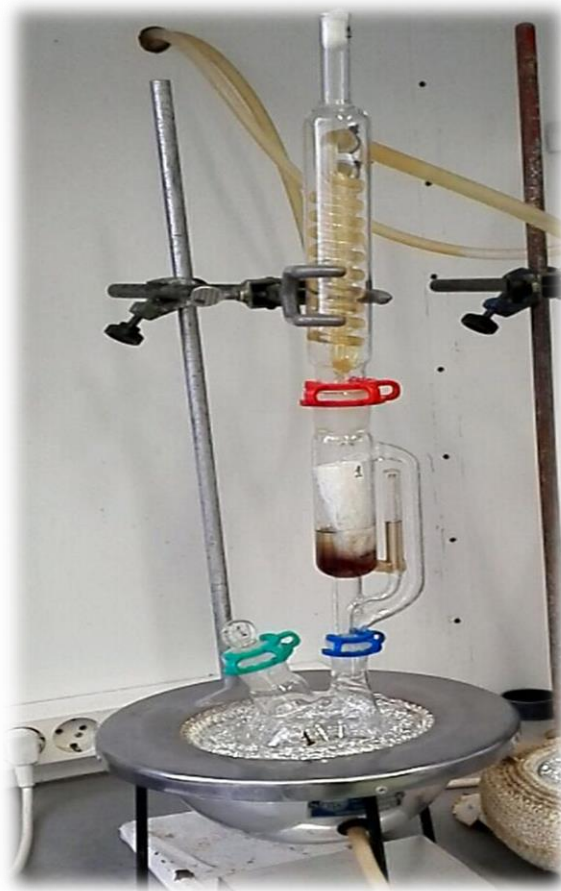


Ilustración 5. Equipo de extracción Soxhlet

Para la determinación de las grasas se ha llevado a cabo el mismo procedimiento que la primera extracción descrita anteriormente utilizando en este caso como disolvente 100 ml de hexano y flores liofilizadas como materia prima.

#### 2.4.4 DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES

El proceso para la obtención de las cenizas se ha llevado a cabo mediante una calcinación de la materia prima. Para realizar la calcinación previamente se han secado durante 24 horas las flores de azafrán en una estufa a 105°C. Se ha pesado una pequeña cantidad de flores secas en un crisol en el que se ha llevado a cabo la calcinación. A continuación, se ha calcinado la materia prima a 550°C en un horno mufla durante toda una noche y se han obtenido las cenizas.



# CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



### 3.1 RESULTADOS CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

#### 3.1.1 CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS FLORES DE AZAFRÁN

La determinación del contenido de humedad se ha llevado a cabo con el método experimental anteriormente citado y los resultados obtenidos han sido los siguientes.

Tabla 8. Contenido de humedad de las flores del azafrán.

$m_{\text{vial}} \text{ (g)}$	$m_{\text{vial+flores húmedas}} \text{ (g)}$	$m_{\text{vial+flores secas}} \text{ (g)}$	Humedad (%)
1,03	15,86	3,42	83,91

Como se puede observar más de un 80% de las flores están compuestas por agua.

#### 3.1.2 CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN LAS FLORES DEL AZAFRÁN

Como se ha citado anteriormente, se han realizado experimentos con materia prima sometida a las dos extracciones soxhlet y por otro lado experimentos con la misma materia prima con la que se han realizado los diferentes procesos de extracción de TPC y AC.

De cada experimento se han realizado 3 pruebas pesando 0,01, 0,02 y 0,03 gramos de materia prima para poder calcular la cantidad media de proteínas contenida en la materia prima. Los resultados obtenidos han sido los siguientes.

Tabla 9. Cantidad de proteínas presente en las diferentes materias primas

Materia prima antes de Soxhlet				
Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Promedio	SD
Proteínas ( $\text{mg}_{\text{prot}}/\text{g}$ )	Proteínas ( $\text{mg}_{\text{prot}}/\text{g}$ )	Proteínas ( $\text{mg}_{\text{prot}}/\text{g}$ )	( $\text{mg}_{\text{prot}}/\text{g}$ )	
174,17	140,00	172,72	162,30	19,32

Materia prima después de Soxhlet				
Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Promedio	SD
Proteínas	Proteínas	Proteínas	Promedio	
(mg <sub>prot</sub> /g)	(mg <sub>prot</sub> /g)	(mg <sub>prot</sub> /g)	(mg <sub>prot</sub> /g)	
187,27	205,96	189,00	194,08	10,33

### 3.1.3 CONTENIDO DE EXTRACTIVOS Y GRASAS EN LAS FLORES DEL AZAFRÁN

Para la determinación de los extractivos presentes en las flores de azafrán se han realizado dos extracciones mediante el método soxhlet seguidas, utilizando agua y etanol respectivamente. Mediante estas extracciones se ha podido determinar el porcentaje de flores que han quedado tras la extracción lo cual ha permitido conocer el porcentaje de extractivos presentes en la materia prima. El resultado tras las extracciones ha sido el siguiente.

Tabla 10. Cantidad de extractivos presente en la materia prima

disolvente	% materia prima restante	Extractivos (g/100g de flores)
agua	26,60	73,40
etanol	24,27	2,33

El total de los extractivos es de 75,73 gramos por cada 100 gramos de flores que corresponde a la suma de los extraídos en la primera extracción soxhlet y en la segunda.

Para la determinación de grasas igualmente se ha utilizado una extracción mediante el método soxhlet utilizando como disolvente hexano. En este caso los resultados obtenidos han sido los que se muestran a continuación.

Tabla 11. Porcentaje de grasas presente en la materia prima

disolvente	% materia prima restante	Grasas (g/100g flores)
hexano	98,18	1,82



### 3.1.4 RESULTADOS CENIZAS TOTALES

La calcinación de la materia prima se ha realizado según el método descrito en el capítulo 2. Una vez realizada la calcinación los resultados obtenidos han sido los siguientes.

Tabla 12. Cantidad de cenizas por gramo de flor seca

Cenizas (mg/g flores secas)	Error (mg/g flores secas)
36,28	3,46

## 3.2 RESULTADOS CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO

### 3.2.1 RESULTADOS RESIDUO SECO

El cálculo del residuo seco se ha llevado a cabo para todas las muestras siguiendo el método descrito en el capítulo 2.

Para las extracciones convencionales los resultados del residuo seco final han sido los siguientes.

Tabla 13. Residuo seco de las extracciones convencionales

	Relación S:L	RS (g/ml)	Error total		Relación S:L	RS (g/ml)	Error total
<b>C.1</b>	0,05	0,00853	0,0002	<b>C.7</b>	0,10	0,0147	0,0002
<b>C.2</b>	0,07	0,01193	0,0002	<b>C.8</b>	0,50	0,0540	0,0002
<b>C.3</b>	0,31	0,03520	0,0002	<b>C.9</b>	0,76	0,0694	0,0002
<b>C.3'</b>	0,30	0,03030	0,0002	<b>C.10</b>	0,92	0,0695	0,0002
<b>C.4</b>	0,21	0,02800	0,0002	<b>C.PH1</b>	0,30	0,0347	0,0002
<b>C.5</b>	0,19	0,0225	0,0002	<b>C.PH2</b>	0,10	0,0136	0,0002
<b>C.6</b>	0,05	0,0065	0,0002	<b>C.PH3</b>	0,20	0,0213	0,0002

Observamos como la cantidad de residuo seco varía con la relación S:L, cuanto mayor es dicha relación mayor es el residuo generado.

Para las extracciones con pretratamiento asistido por microondas los resultados finales del residuo seco son los siguientes.

Tabla 14. Residuo seco de las extracciones con pretratamiento

	Relación (S:L) <sub>pretrat.</sub>	Energía (KJ/ml)	RS (g/ml)	Error total	Relación S:L	Energía (KJ/ml)	RS (g/ml)	Error total	
<b>M.1</b>	0,5	0,35	0,0304	0,0002	<b>M.9</b>	0,7	0,38	0,0317	0,0002
<b>M.2</b>	0,5	0,34	0,0310	0,0002	<b>M.10</b>	0,5	0,51	0,0337	0,0002
<b>M.3</b>	0,5	0,44	0,0320	0,0002	<b>M.11</b>	0,3	0,26	0,0329	0,0002
<b>M.4</b>	0,5	0,32	0,0309	0,0002	<b>M.12</b>	0,7	0,17	0,0333	0,0002
<b>M.5</b>	0,7	0,32	0,0315	0,0002	<b>M.13</b>	0,7	0,36	0,0295	0,0002
<b>M.6</b>	0,3	0,26	0,0347	0,0002	<b>M.14</b>	0,3	0,35	0,0285	0,0002
<b>M.7</b>	0,5	0,31	0,0321	0,0002	<b>M.15</b>	0,7	0,43	0,0294	0,0002
<b>M.8</b>	0,3	0,37	0,0323	0,0002	<b>M.16</b>	0,5	0,55	0,0256	0,0002

En este caso se aprecia como no se producen apenas variaciones con las relaciones S:L debido a que tras el pretratamiento todas se realizan con la misma relación S:L, la óptima de la extracción convencional. Tampoco se puede afirmar que la energía absorbida implique variaciones en el residuo seco.

### 3.2.2 RESULTADOS TPC Y AC DE LAS EXTRACCIONES CONVENCIONALES

Los experimentos convencionales se han realizado siguiendo el método anteriormente citado. En estos experimentos se ha buscado un punto óptimo de extracción, que establece las condiciones a utilizar después del pretratamiento de microondas.

Tras la realización de los primeros experimentos con tiempos de extracción de 24 horas se ha apreciado que no existe un aumento significativo en la riqueza del extracto de manera que en los posteriores experimentos se ha reducido el tiempo de extracción a 3 horas, tiempo suficiente para obtener una concentración estable de polifenoles y antocianinas en el extracto.

El disolvente utilizado en la mayoría de los experimentos ha sido la mezcla de etanol-agua (50:50 v/v) acidificado a pH 2, ya que se ha observado que el extracto con mayor riqueza se obtenía con este disolvente. Se ha trabajado a una temperatura de 30 °C ya que al elevar la temperatura de extracción se ha obtenido una menor cantidad de polifenoles.

En la siguiente tabla podemos observar la riqueza y el rendimiento del extracto final de todos los experimentos convencionales realizados.

Tabla 15. Resultados de riqueza y rendimiento de antocianinas y polifenoles totales de los experimentos convencionales

Ext.	Ratio S:L	t ext. (h)	Tª ext. (°C)	Riqueza AC (g/g RS)	Riqueza TPC (g/g RS)	Rendimiento AC (mg/gseco)	Rendimiento TPC (mg/gseco)
C.1	0,05	24	30	7,82	47,69	7,80	47,60
C.2	0,07	24	30	6,96	38,25	7,04	38,67
C.3	0,31	2	30	9,43	44,42	6,74	31,76
C.3'	0,30	3	30	11,99	45,10	7,49	28,16
C.4	0,21	3	66	7,04	41,36	5,95	34,92
C.5	0,19	24	30	9,99	51,97	7,24	37,69
C.6	0,20;	24	30	9,25	44,73	6,98	33,76
	0,10;			9,24	43,77	5,54	33,83
	0,05			7,52	48,35	5,89	37,87
C.7	0,10	24	30	8,57	51,14	7,78	46,46
C.8	0,50	3	30	11,42	24,28	7,63	16,22
C.9	0,76	3	30	8,70	20,42	4,97	11,66
C.10	0,92	3	30	9,71	24,06	4,57	11,33
C. PH1	0,30	3	30	10,92	43,59	7,89	31,51
C. PH2	0,10	3	30	11,62	76,21	9,58	62,85
C. PH3	0,20	3	30	11,94	52,79	7,80	34,51

El experimento C.6 se ha realizado de manera que, como se ha citado en el aparatado de materiales y métodos, se comprobara capacidad de solubilidad del disolvente y se ha apreciado que la cantidad extraída no es problema de la solubilidad de disolvente ya que el aumento de la extracción no es significativo.

En los resultados mostrados en la Tabla 15 se observa como en las extracciones llevadas a cabo en un tiempo de 3 horas, la riqueza de los TPC y las AC aumenta según aumenta la extracción S:L. Según la transferencia de materia, si dejásemos tiempo suficiente las extracciones se debería llegar al mismo rendimiento en todas las relaciones S:L, pero se observa que esto no ocurre para los TPC. Sin embargo, para las antocianinas no se encuentra apenas diferencia. Como se observa en la Figura 1 se alcanzan rendimientos o eficiencias que permanecen constantes o apenas varían durante los últimos minutos de la extracción.

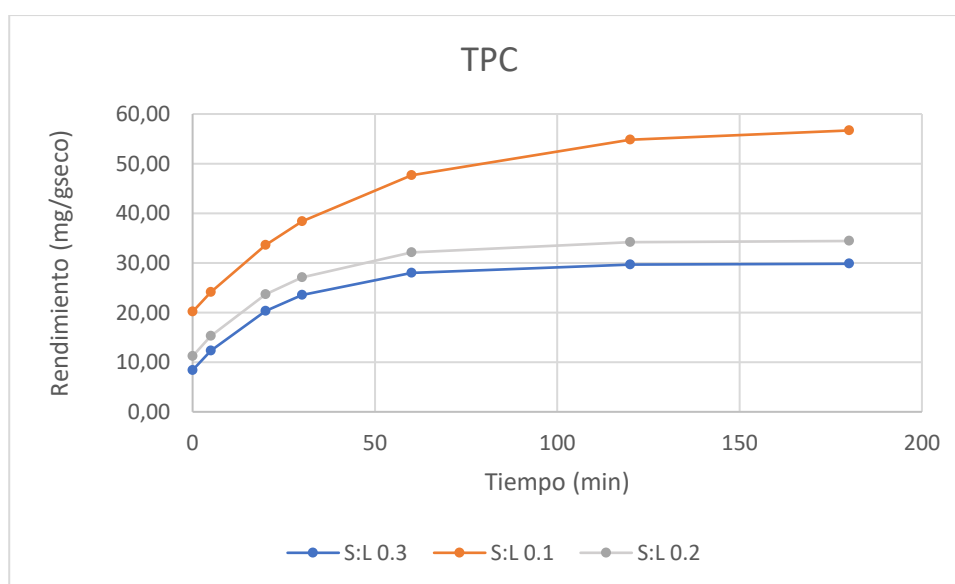


Figura 1. Eficiencia de extracciones convencionales

Para encontrar explicación a este suceso se han realizado los últimos experimentos mostrados en la Tabla 15 en los que se ha medido el pH durante la extracción para comprobar las variaciones de este y su posible influencia en la extracción.

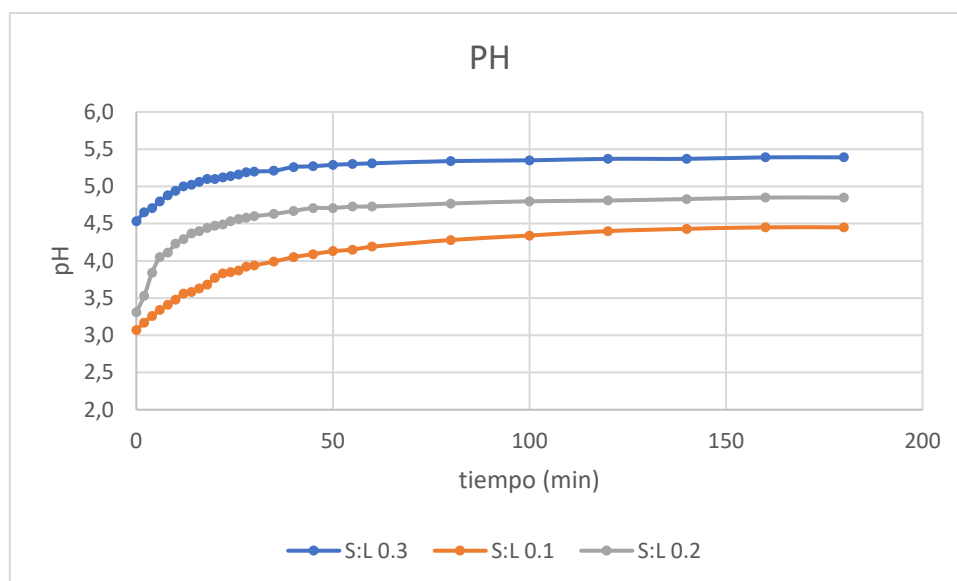


Figura 2. Variación del pH con el tiempo de las extracciones convencionales

Como se observa en la Figura 2 el pH aumenta según aumenta la relación S:L. Contraponiendo estos resultados con los datos de riqueza mostrados en la Tabla 15 se concluye que se produce una hidrólisis ácida en las relaciones S:L más bajas que provoca la ruptura de las estructuras internas de la materia prima y facilita la extracción de los componentes y es por ello que se alcanza un mayor rendimiento en estas extracciones.

Para la determinación del punto óptimo de extracción se ha tenido en cuenta que el disolvente empleado para llevar a cabo las extracciones contiene un producto orgánico que es el etanol. El uso de este componente está regulado y controlado, por lo que se ha intentado optimizar la cantidad de disolvente utilizada. En base a esto y a las conclusiones anteriores se ha determinado que las condiciones óptimas para las extracciones convencionales son una relación S:L de 0,3, una temperatura de extracción de 30°C y un tiempo de extracción de 3 horas.

Como se puede observar en la Tabla 15, el experimento con las características óptimas de extracción se ha realizado 3 veces de manera que se puede determinar el error estándar y la cinética media tanto para la extracción de polifenoles como para la de antocianinas. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 16. Resultados TPC de la cinética de extracción óptima

tiempo(min)	Riqueza TPC (g/g RS)	SD	Rendimiento	
			TPC (mg/gseco)	SD
0	39,59	1,22	8,15	0,34
5	42,69	2,00	12,28	0,39
20	41,80	2,50	18,58	2,48
30	42,25	0,03	20,49	1,04
60	41,94	2,72	25,07	2,68
120	42,32	2,14	27,71	2,79
180	44,34	1,07	29,84	2,37

Con estos datos se ha realizado un ajuste de regresión para calcular la eficiencia o rendimiento de la extracción de TPC mediante la ecuación cinética descrita en el capítulo 2. De manera que los valores obtenidos han sido los siguientes.

$$C = 8,15 + 19,96 \cdot (1 - e^{(-0,0326t)}) \quad \text{Ec. 24}$$

Donde C es la concentración en mg/g<sub>seco</sub> y t es el tiempo en segundos.

Representando gráficamente los datos obtenidos se obtiene la siguiente representación.

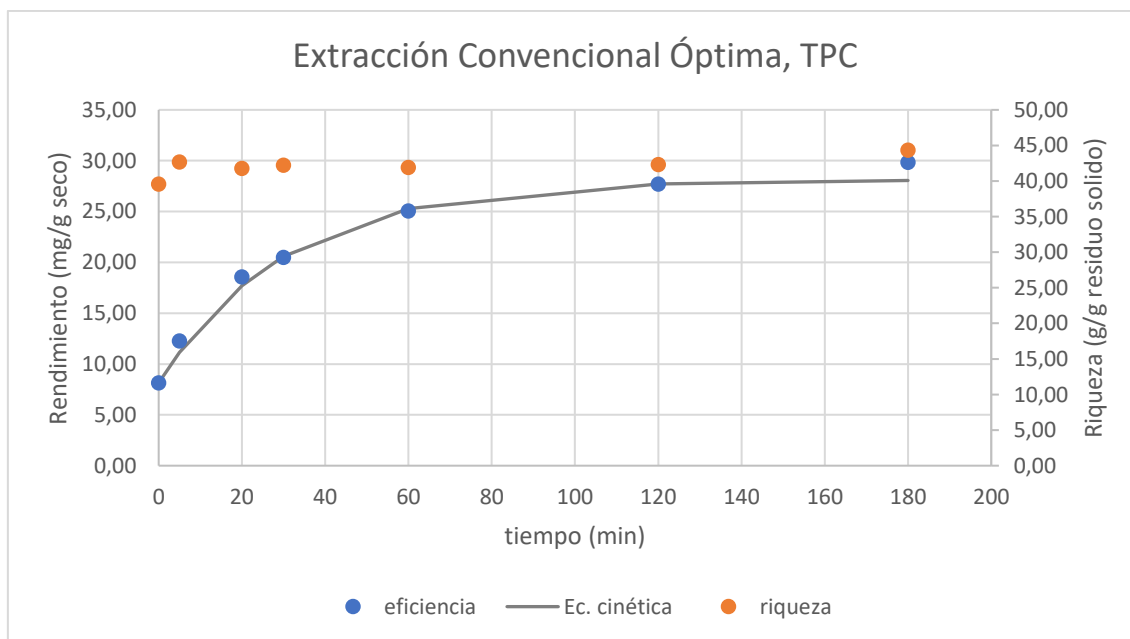


Figura 3. Resultados gráficos TPC extracción óptima

En la Figura 3 se observa como se produce un aumento progresivo del rendimiento, lo que indica una extracción lenta, mientras que el aumento moderado de la riqueza indica que la relación entre la cinética de extracción de los TPC y el resto de compuestos extraídos se mantiene aproximadamente constante durante el proceso.

Tabla 17. Resultados AC extracción convencional óptima

tiempo(min)	Riqueza AC (g/g RS)	SD	Eficiencia AC(mg/gseco )	SD
<b>0</b>	6,09	0,36	1,25	0,02
<b>5</b>	7,77	0,06	2,24	0,19
<b>20</b>	9,53	0,19	4,22	0,23
<b>30</b>	10,10	0,21	4,90	0,34
<b>60</b>	10,51	0,81	6,28	0,75
<b>120</b>	10,98	0,03	7,18	0,38
<b>180</b>	11,46	0,77	7,69	0,28

Al igual que se ha realizado la regresión para obtener una ecuación que relacione la cinética de la extracción de TPC con el rendimiento de extracción se ha realizado también para la extracción de las antocianinas y se ha obtenido la siguiente expresión.

$$C = 1,25 + 6,69 \cdot (1 - e^{(-0,0244t)}) \quad \text{Ec. 25}$$

Donde C es la concentración en mg/g<sub>seco</sub> y t es el tiempo en segundos.

E igualmente representándolo, obtenemos la siguiente gráfica.

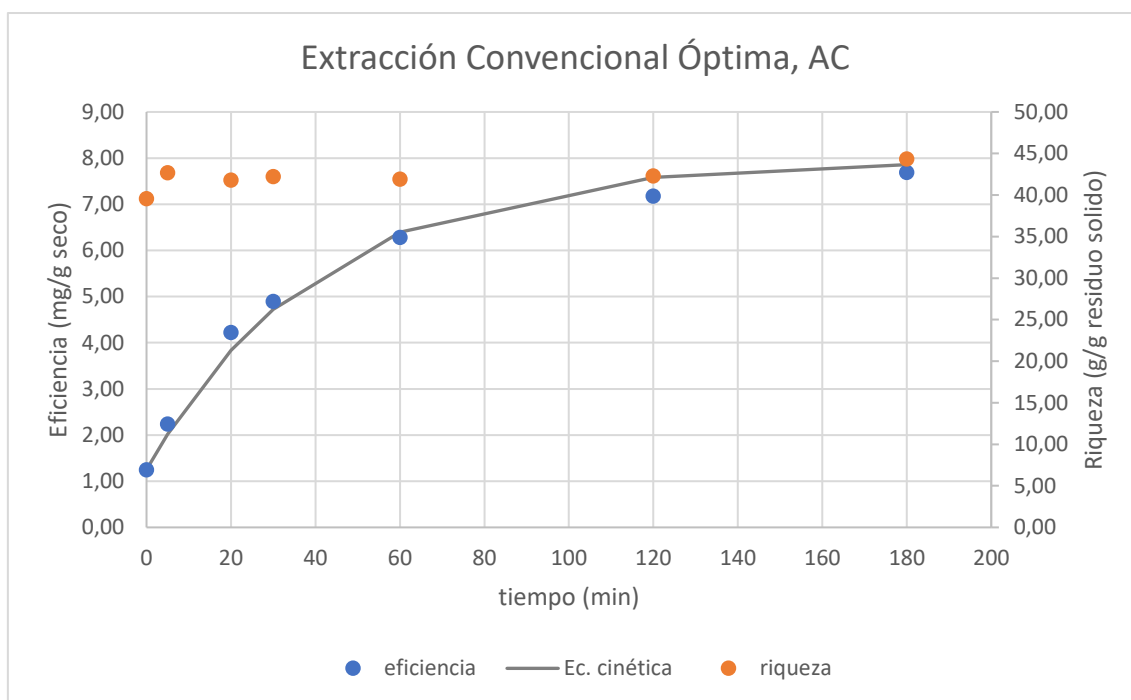


Figura 4. Resultados gráficos AC extracción convencional óptima

Al igual que para los TPC, en la Figura 4 se observa para las antocianinas, un aumento progresivo en el rendimiento indicando una extracción lenta, mientras que la riqueza se mantiene prácticamente constante indicando también que la relación entre la cinética de extracción de las antocianinas extraídas y el resto de extractivos se mantiene constante.

### 3.2.3 RESULTADOS TPC Y AC DE LAS EXTRACCIONES CON PRETRATAMIENTO ASISTIDO POR MICROONDAS

Tras la determinación del punto óptimo de las extracciones convencionales se han llevado a cabo las extracciones con el pretratamiento de microondas. Las condiciones utilizadas para la extracción tras el pretratamiento son las óptimas determinadas para la extracción convencional. Se ha añadido, si ha sido necesario, cierta cantidad de disolvente para seguir la extracción con una relación S:L de 0,3, se ha llevado a cabo a una temperatura de 30°C y se han realizado durante un tiempo de 3 horas.



Se han realizado 16 experimentos de manera que se ha podido analizar posteriormente la influencia de las diferentes variables, S:L y energía absorbida, mediante un análisis ANOVA.

Al igual que en los experimentos convencionales se han calculado las riquezas de todos los productos tanto de antocianinas como de TPC y como se han extraído muestras siempre en los mismos puntos de extracción pudiendo calcular así sus cinéticas de extracción y posteriormente obtener el valor de las velocidades iniciales de extracción y las concentraciones obtenidas para un tiempo infinito (rendimiento final), y compararlas.

Los resultados obtenidos para estos experimentos han sido los siguientes.

Tabla 18. Resultados pretratamiento microondas

	PRETRATAMIENTO			TPC		AC		
	S:L (g/ml)	Energía (KJ/ml)	$C_{\infty}$ (g/g seco)	$U_0$	Riqueza (g/g RS)	$C_{\infty}$ (g/g seco)	$U_0$	Riqueza (g/g RS)
<b>1</b>	0,5	0,35	26,62	2,85	45,51	6,97	0,58	11,71
<b>2</b>	0,5	0,34	29,00	2,56	43,69	8,00	0,58	11,76
<b>3</b>	0,5	0,44	24,99	2,45	44,40	6,97	0,58	9,88
<b>4</b>	0,5	0,32	27,68	3,00	47,50	8,43	0,72	13,36
<b>5</b>	0,7	0,32	21,05	1,96	41,52	5,00	0,56	10,58
<b>6</b>	0,3	0,26	28,12	10,45	42,08	7,94	2,51	11,74
<b>7</b>	0,5	0,31	26,62	1,77	41,95	6,70	0,49	10,23
<b>8</b>	0,3	0,37	29,53	9,25	45,94	8,05	2,38	12,52
<b>9</b>	0,7	0,38	24,17	2,57	44,02	7,17	0,68	12,37
<b>10</b>	0,5	0,51	23,01	3,52	42,80	9,34	0,97	14,18
<b>11</b>	0,3	0,26	23,82	1,62	44,78	7,62	0,42	12,01
<b>12</b>	0,7	0,17	27,64	1,14	42,27	6,93	0,34	10,89
<b>13</b>	0,7	0,36	26,01	7,11	45,18	6,52	1,52	11,51
<b>14</b>	0,3	0,35	28,62	10,98	52,21	5,51	1,83	10,06
<b>15</b>	0,7	0,43	25,64	1,03	45,35	4,55	0,15	8,28
<b>16</b>	0,5	0,58	26,68	0,98	53,34	5,06	0,18	9,88

Observando los datos obtenidos, se puede afirmar que no se obtienen cambios significativos en cuanto a la riqueza del producto final, tanto en las AC como en los TPC. La disminución de la riqueza de las antocianinas en los últimos experimentos ha podido ser debida a la degradación de éstas provocada por las elevadas temperaturas a las que se realiza la extracción (Sólyom et al., 2014).

Una vez obtenidos dichos resultados se han analizado mediante el programa Statgraphics realizando una ANOVA que ha permitido conocer la significancia de cada variable y obtener una relación de energía y disolvente óptima para trabajar.

Se ha analizado cada variable respuesta tanto para TPC como para AC y los resultados obtenidos han sido los siguientes.

En lo referente a la extracción de polifenoles totales, para la concentración a tiempo infinito ( $C_{\infty}$ ) no se ha determinado que las variables sean significativas ni la relación S:L ni la energía absorbida operando con un P-valor del 0,05. Sin embargo podríamos considerar significativa la relación S:L si operamos con un P-valor de 0,1. Para la velocidad inicial de extracción, sí que existe que se obtiene que la relación S:L es una variable significativa operando con un P-valor del 0,05 y se ha podido observar como la relación cuadrática del ratio S:L también es significativa. Por último, para la riqueza operando con un P-valor del 0,05 se podría considerar significativa la variable de energía absorbida.

**Análisis de Varianza para Cinf TPC (g/g seco)\_1**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:S:L (g/ml)	19,3417	1	19,3417	3,46	0,0925
B:Energía (KJ/ml)	0,504599	1	0,504599	0,09	0,7700
AA	0,180262	1	0,180262	0,03	0,8611
AB	5,94964	1	5,94964	1,06	0,3265
BB	0,671898	1	0,671898	0,12	0,7360
Error total	55,8914	10	5,58914		
Total (corr.)	81,6166	15			

**Análisis de Varianza para U0 TPC**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:S:L (g/ml)	64,9803	1	64,9803	10,39	0,0091
B:Energía (KJ/ml)	7,94568	1	7,94568	1,27	0,2860
AA	40,6918	1	40,6918	6,51	0,0288
AB	11,8737	1	11,8737	1,90	0,1983
BB	20,3236	1	20,3236	3,25	0,1016
Error total	62,5434	10	6,25434		
Total (corr.)	177,515	15			

**Análisis de Varianza para Riqueza TPC**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:S:L (g/ml)	24,0303	1	24,0303	2,37	0,1546
B:Energía (KJ/ml)	48,7492	1	48,7492	4,81	0,0530
AA	6,56319	1	6,56319	0,65	0,4396
AB	4,72152	1	4,72152	0,47	0,5103
BB	0,601332	1	0,601332	0,06	0,8125
Error total	101,324	10	10,1324		
Total (corr.)	174,002	15			

Ilustración 6. Análisis de varianza para la extracción de TPC

Con este análisis se ha permitido también obtener las interacciones de las variables para cada respuesta y los efectos principales. Los resultados obtenidos se muestran a continuación, y se ha podido observar como existe una interacción entre la energía y la relación S:L en los casos de la concentración a tiempo infinito y la velocidad inicial de la extracción. Se ha buscado un producto de alta riqueza y observando la Ilustración se ha comprobado que trabajando con niveles bajos de energía la relación S:L no tiene gran influencia en la riqueza obtenida mientras que si se trabaja con niveles de energía más altos, la influencia de la relación S:L aumenta, obteniendo riquezas más altas cuanto más pequeña es la relación S:L. En la Ilustración se observan los efectos principales y se aprecia como para la velocidad inicial de extracción la relación S:L, que era la variable más significativa, tiene un efecto cuadrático. También se observa como la riqueza varía notoriamente según la energía aumentando conforme aumenta ésta.

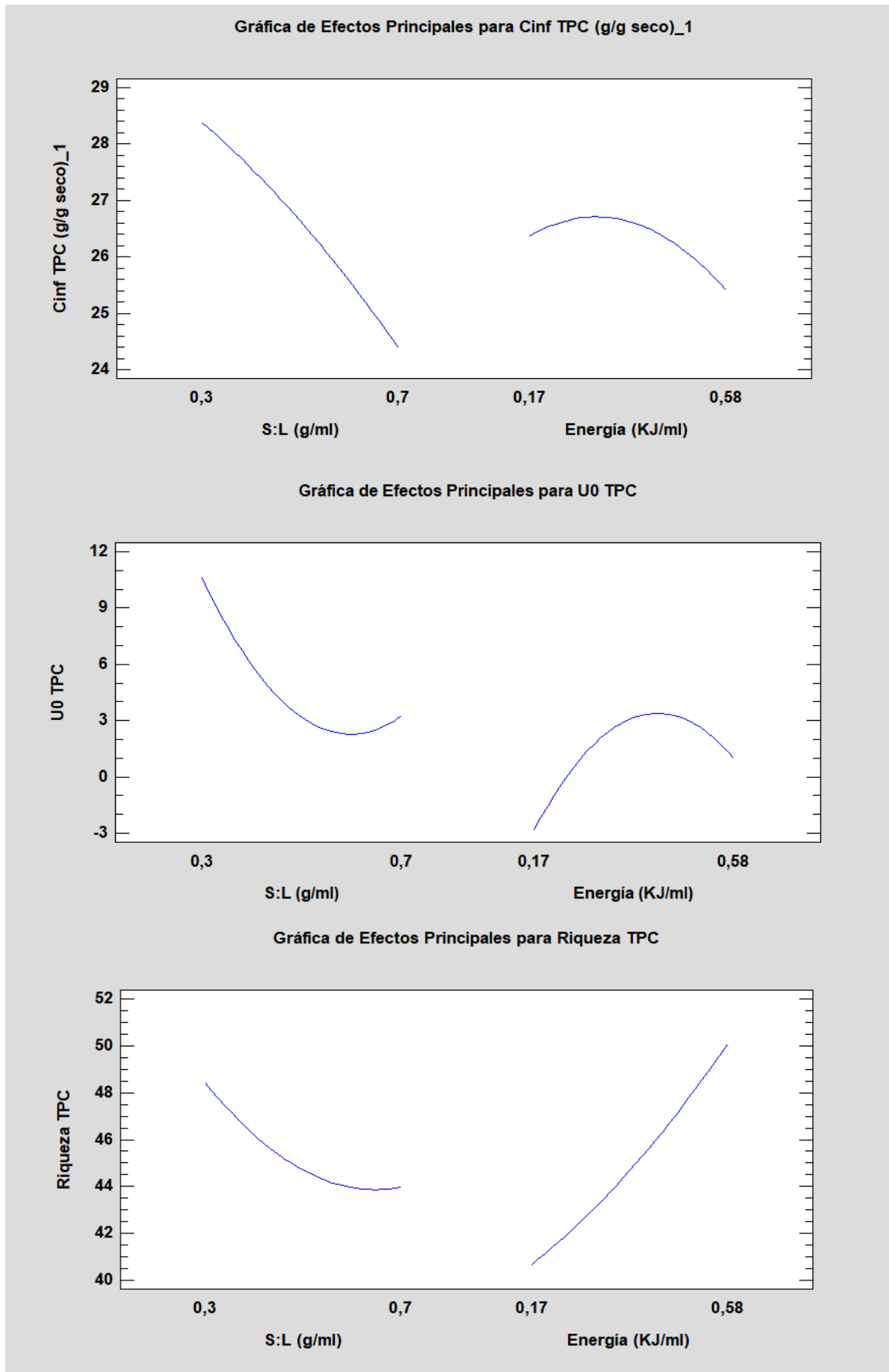


Ilustración 6. Efectos principales de las variables analizadas para cada respuesta en la extracción de TPC

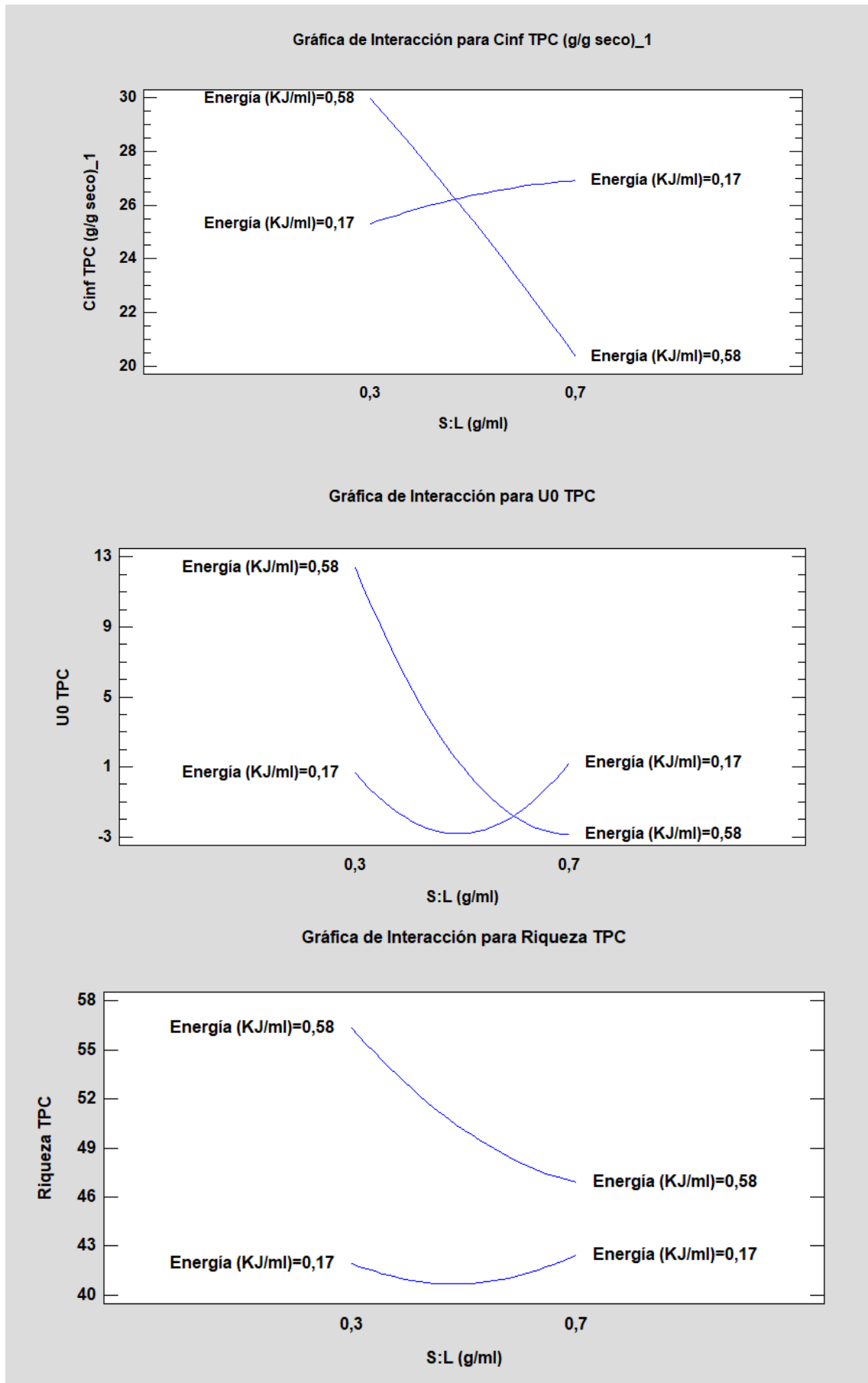


Ilustración 7. Interacciones de las variables analizadas para cada respuesta en la extracción de TPC

En cuanto a la extracción de las antocianinas, los resultados al análisis de varianza han permitido observar que solo existe significancia de la variable relación S:L para la velocidad inicial de extracción trabajando con un P-valor de 0,05, mientras que la energía no es significativa. Para las demás respuestas, riqueza y concentración a tiempo infinito, no existe una influencia significativa ni de la variable energía ni de la variable relación S:L. La siguiente imagen muestra los resultados del análisis de varianza.

**Análisis de Varianza para Cinf AC (g/g seco)**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:S:L (g/ml)	1,82766	1	1,82766	0,98	0,3467
B:Energía (KJ/ml)	1,80215	1	1,80215	0,96	0,3499
AA	3,37069	1	3,37069	1,80	0,2095
AB	0,0271115	1	0,0271115	0,01	0,9066
BB	0,109762	1	0,109762	0,06	0,8137
Error total	18,7394	10	1,87394		
Total (corr.)	27,1371	15			

**Análisis de Varianza para U0 AC**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:S:L (g/ml)	2,82595	1	2,82595	8,55	0,0152
B:Energía (KJ/ml)	0,243371	1	0,243371	0,74	0,4110
AA	1,70657	1	1,70657	5,16	0,0464
AB	0,461201	1	0,461201	1,40	0,2649
BB	0,77523	1	0,77523	2,35	0,1567
Error total	3,30553	10	0,330553		
Total (corr.)	8,33279	15			

**Análisis de Varianza para Riqueza AC**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:S:L (g/ml)	1,42997	1	1,42997	0,49	0,4984
B:Energía (KJ/ml)	0,369872	1	0,369872	0,13	0,7283
AA	0,99649	1	0,99649	0,34	0,5706
AB	0,266575	1	0,266575	0,09	0,7679
BB	0,390716	1	0,390716	0,13	0,7211
Error total	28,9807	10	2,89807		
Total (corr.)	32,8134	15			

Ilustración 7. Resultados análisis de varianza para la extracción de antocianinas

Al igual que para la extracción de TPC se han analizado las intersecciones de la relación S:L y energía para todas las respuestas estudiadas y los efectos principales. Observando los resultados se han encontrado interacciones entre ambas variables para el análisis de la riqueza y de la velocidad inicial de extracción, siendo inexistente la interacción en la variable de concentración a tiempo infinito. La Ilustración muestra los efectos principales de las variables analizadas y la Ilustración las interacciones entre las variables.

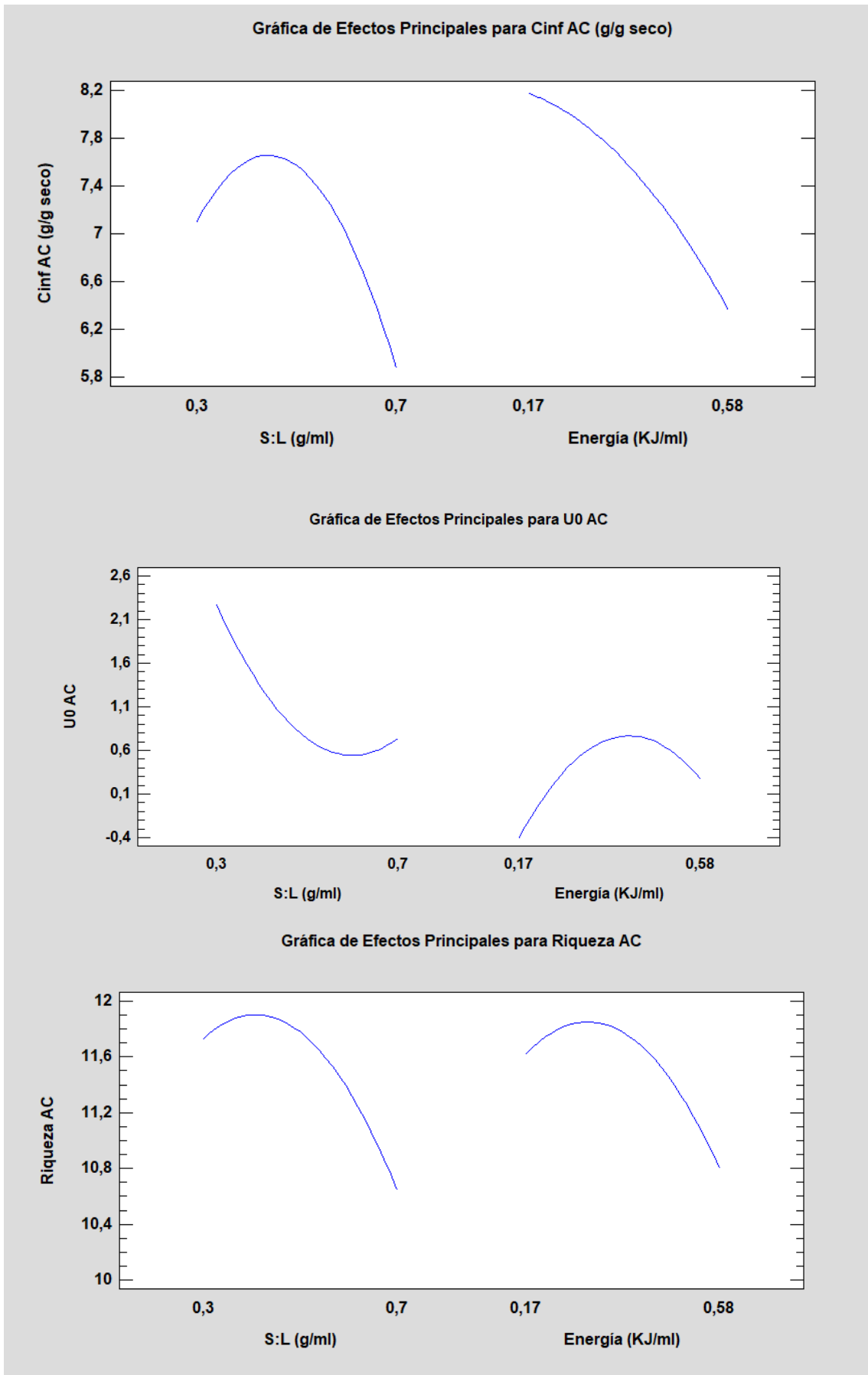


Ilustración 9. Efectos principales analizadas para cada respuesta en la extracción de AC

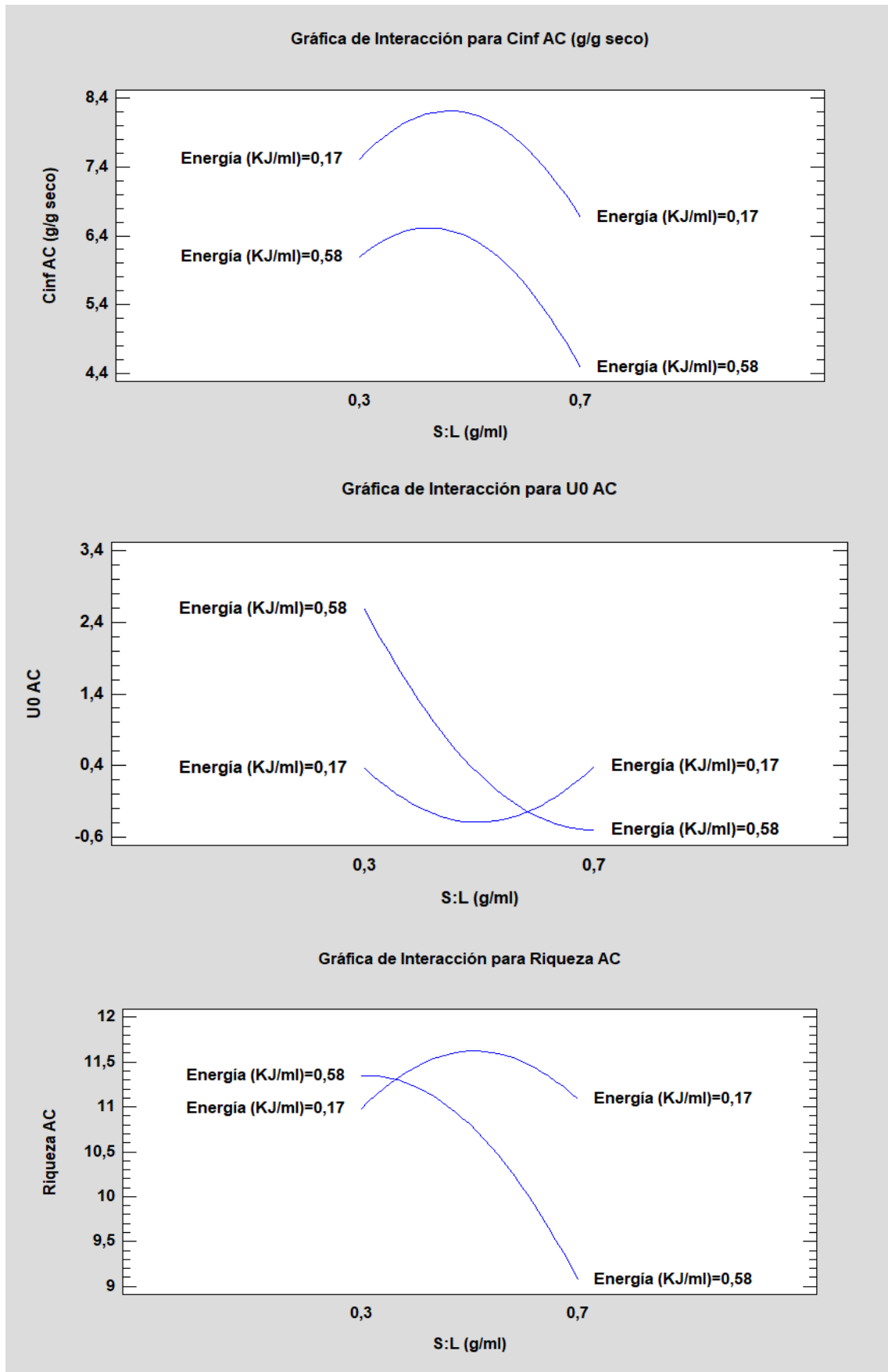


Ilustración 10. Interacciones de las variables analizadas para cada respuesta en la extracción de AC



En la Ilustración se observa como en la velocidad inicial de extracción, teniendo en cuenta que la única variable significativa es la relación S:L, la relación S:L tiene un efecto cuadrático. Se observan también los efectos de las demás variables en las diferentes respuestas, sin embargo, éstas no son significativas.

Con estos análisis además de observar la significancia de las variables de operación se ha buscado un punto óptimo de extracción. El objetivo de la extracción es la obtención de un producto con una elevada riqueza tanto de TPC como de AC, observando los resultados se aprecia como la riqueza de las antocianinas no sufre grandes cambios significativos, de manera que se ha decidido optimizar el proceso con el fin de aumentar la riqueza de TPC en el producto. Observando los resultados de optimización dados por el programa se ha tomado como punto óptimo el mostrado en la siguiente imagen.

**Optimizar Respuesta**  
Meta: maximizar Riqueza TPC

Valor óptimo = 56,3229

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
S:L (g/ml)	0,3	0,7	0,3
Energía (KJ/ml)	0,17	0,58	0,58

Ilustración 8. Condiciones óptimas del pretratamiento de microondas

Estimar la energía absorbida por mezcla es un proceso complicado de manera que se ha realizado una extracción con los parámetros más próximos al óptimo. Los resultados obtenidos han sido los siguientes.

Tabla 19. Resultados extracción con condiciones óptimas de pretratamiento

	S:L (g/ml)	Energía (KJ/ml)	Riqueza TPC (g/gRS)	Riqueza AC (g/gRS)
<b>M.ópt.</b>	0,3	0,49	56,48	11,56

Se observa como en las condiciones óptimas de operación se aprecia un aumento de la riqueza de TPC, mientras que la riqueza de AC se mantiene sin cambios significativos.

Mediante el análisis de las cinéticas de las extracciones se ha comprobado que los tiempos de extracción disminuyen al aplicar el pretratamiento de microondas. Este análisis se ha realizado tanto para la extracción de TPC como para la extracción de AC. Para mostrar el resultado se ha tomado uno de los experimentos realizados mediante extracción con pretratamiento, M.8, y se ha comparado con la extracción convencional óptima.

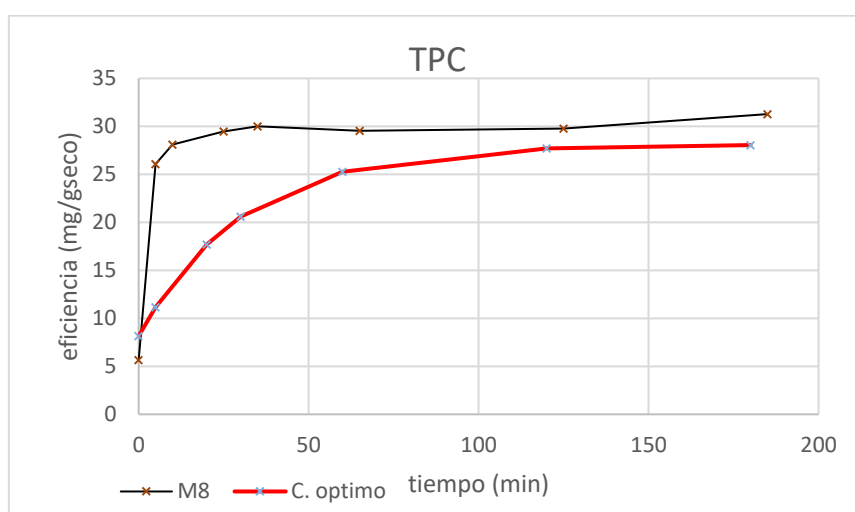


Figura 5. Comparación de la cinética de las extracciones de TPC convencionales y las extracciones con pretratamiento.

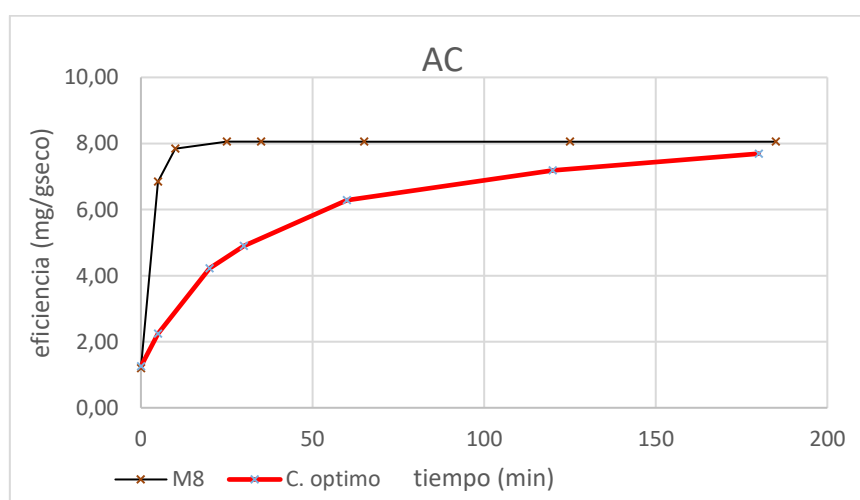


Figura 6. Comparación de la cinética de las extracciones de AC convencionales y las extracciones con pretratamiento.

Tabla 20. Comparación velocidades iniciales de extracción de extracción con microondas y extracción convencional óptima

	<b>U<sub>0</sub> polifenoles</b>	<b>U<sub>0</sub> antocianinas</b>
<b>C.opt</b>	0,65	0,16
<b>M.1</b>	2,85	0,58
<b>M.2</b>	2,56	0,58
<b>M.3</b>	2,45	0,58
<b>M.4</b>	3,00	0,72
<b>M.5</b>	1,96	0,56
<b>M.6</b>	10,45	2,51
<b>M.7</b>	1,77	0,49
<b>M.8</b>	9,25	2,38
<b>M.9</b>	2,57	0,68
<b>M.10</b>	3,52	0,97
<b>M.11</b>	1,62	0,42
<b>M.12</b>	1,14	0,34
<b>M.13</b>	7,11	1,52
<b>M.14</b>	10,98	1,83
<b>M.15</b>	1,03	0,15
<b>M.16</b>	0,98	0,18

Como se observa en la Figura 5 y en la Figura 6, las extracciones asistidas por microondas alcanzan una eficiencia constante en un menor tiempo de extracción, también se observa en la Tabla 20 cómo las velocidades iniciales de extracción aumentan en las extracciones con pretratamiento. Es por ello que se puede afirmar que, aplicando el pretratamiento de microondas, se reduce el tiempo de extracción necesario para alcanzar un extracto constante tanto para AC como para TPC. En las extracciones convencionales el tiempo requerido para no apreciar cambios significativos ronda las 3 horas, mientras que para las extracciones asistidas por microondas se puede reducir el tiempo de extracción a 45 minutos, consiguiendo concentraciones altas en tan sólo 10 minutos.

### 3.2.4 RESULTADOS MEDIDA DE COLOR

Para el análisis del color de los pigmentos obtenidos tras la liofilización del extracto se ha seguido el método anteriormente descrito en el capítulo 2.

Los resultados de los parámetros de la medida del color tras una extracción convencional son los que se muestran a continuación.

Tabla 21. Valores de control de los parámetros de color

$a_0^*$	$b_0^*$	$L_0^*$
45,95	-16,92	82,61

Tras la medida de la muestra de control, correspondiente a la extracción convencional óptima, se han medido todos los pigmentos obtenidos de las extracciones que se han realizado con el pretratamiento. Los resultados son los siguientes.

Tabla 22. Valores de las coordenadas de color de las extracciones con pretratamiento y comparativa con el control

	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>	<b>M8</b>
<b>X</b>	84,22	82,84	84,12	81,24	84,50	76,50	83,09	81,73
<b>Y</b>	71,12	69,95	73,08	67,55	73,76	60,41	71,99	68,90
<b>Z</b>	100,34	95,82	98,99	95,88	100,01	88,93	97,88	96,64
<b>L*</b>	84,31	83,75	85,22	82,60	85,53	79,00	84,71	83,25
<b>a*</b>	42,91	42,69	38,79	44,59	38,14	50,81	39,01	42,73
<b>b*</b>	-16,54	-14,61	-14,11	-16,64	-14,21	-18,22	-14,28	-16,00
<b>C*</b>	45,99	45,12	41,27	47,59	40,70	53,98	41,54	45,62
<b>h</b>	338,92	341,11	340,01	339,54	339,57	340,27	339,90	339,47
<b>ΔE</b>	3,50	4,16	8,13	1,39	8,77	6,19	7,72	3,42
	<b>M9</b>	<b>M10</b>	<b>M11</b>	<b>M12</b>	<b>M13</b>	<b>M14</b>	<b>M15</b>	<b>M16</b>
<b>X</b>	83,15	78,72	80,61	83,86	84,40	85,40	84,42	84,93
<b>Y</b>	69,95	61,74	65,63	74,07	71,83	73,38	71,69	72,94
<b>Z</b>	97,91	92,88	95,00	93,31	101,58	102,15	101,35	100,73
<b>L*</b>	83,75	79,69	81,65	85,67	84,64	85,36	84,57	85,16
<b>a*</b>	43,28	52,24	47,44	36,34	41,81	40,59	42,14	40,58
<b>b*</b>	-15,95	-19,69	-17,69	-9,65	-16,74	-15,86	-16,71	-15,32
<b>C*</b>	46,12	55,83	50,63	37,60	45,04	43,58	45,33	43,37
<b>h</b>	339,77	339,35	339,56	345,13	338,18	338,66	338,37	339,32
<b>ΔE</b>	3,06	7,47	1,93	12,44	4,61	6,11	4,30	6,16

Observando la esfera de color en la que se sitúan las coordenadas CIElab, se puede situar las muestras analizadas en la parte inferior derecha como se muestra en la siguiente imagen.

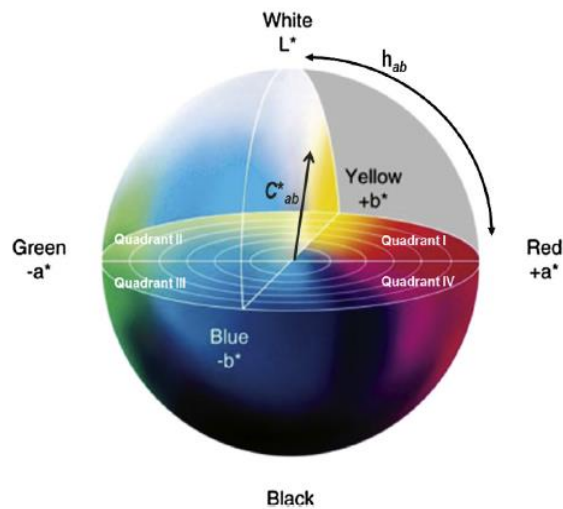


Ilustración 9. Esfera CIELAB (Sant'Anna et al., 2013)

Separando los resultados obtenidos según las temperaturas hasta las que llega el pretratamiento, como se muestra en la

Figura 7 observamos como para los pretratamientos que alcanzan más temperaturas, los colores se acercarían más al centro de la esfera. A pesar de ello, todas las muestras se mueven en un espacio muy pequeño de color por lo que se cree que este problema viene de que las muestras han sido diluidas con un disolvente ácido. Al disolver las antocianinas en un medio ácido estas tornan a un color rosáceo (Segneanu et al., 2013) lo que ha podido provocar que se distorsionen los posibles cambios que se encontrarían en las muestras obtenidas de las extracciones con pretratamiento.

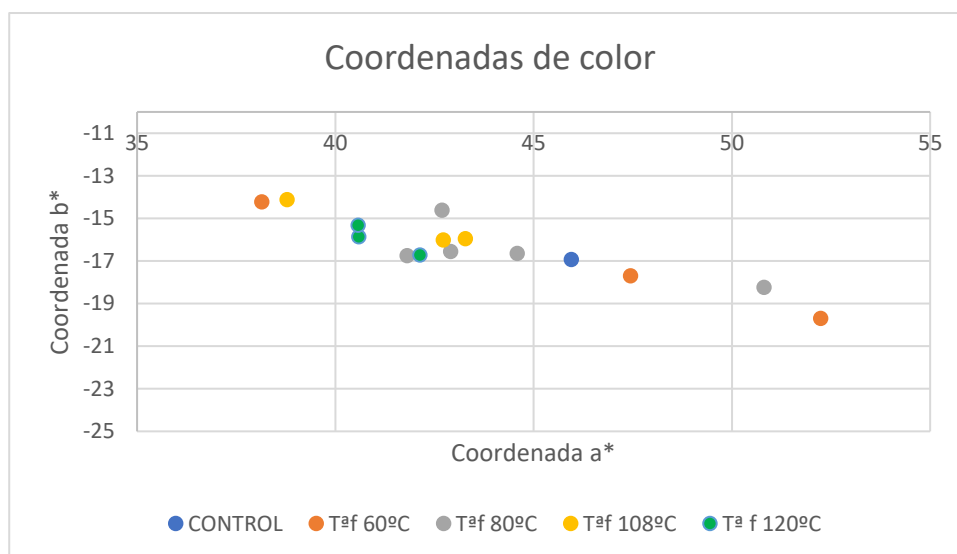


Figura 7. Puntos de análisis de color separados por temperaturas finales del pretratamiento

### 3.2.5 RESULTADOS CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los resultados obtenidos en cuanto a la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ORAC se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Capacidad antioxidante del extracto

	Capacidad antioxidante (mmolTE/L)
<b>C.op</b>	1,04 ± 0,04
<b>M.1</b>	1,09 ± 0,06
<b>M.2</b>	1,96 ± 0,22
<b>M.3</b>	2,30 ± 0,08
<b>M.4</b>	1,42 ± 0,08
<b>M.5</b>	2,04 ± 0,23
<b>M.6</b>	1,61 ± 0,15
<b>M.7</b>	1,56 ± 0,11
<b>M.8</b>	1,43 ± 0,10
<b>M.9</b>	1,11 ± 0,08
<b>M.10</b>	1,32 ± 0,08
<b>M.11</b>	0,74 ± 0,04
<b>M.12</b>	1,04 ± 0,10
<b>M.13</b>	1,32 ± 0,08
<b>M.14</b>	1,70 ± 0,11
<b>M.15</b>	0,77 ± 0,09
<b>M.16</b>	1,27 ± 0,07

Como se observa en la Tabla 23 no se aprecian grandes aumentos al aplicar un pretratamiento a las extracciones convencionales. Esta medida, es una medida proporcional a la cantidad de polifenoles que se encuentran en el extracto (Álvarez et al., 2017) de manera que al igual que se observa en la determinación de TPC que no se aprecia un aumento en la concentración de polifenoles, la capacidad antioxidante tampoco aumenta de manera significativa.

#### 3.2.6 RESULTADOS CARACTERIZACIÓN DE ANTOCIANINAS Y POLIFENOLES

Tras el análisis de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se han observado los resultados para las longitudes de onda de 280 y 520 nm y se han comparado los espectros de los compuestos de los que se disponía muestra patrón, ácido gálico, catequina, ProC-B2, epicatequina y elágico, para la longitud de onda de 280nm, y malvidina, para la longitud de onda de 520 nm. En las demás longitudes de onda no se han encontrado compuestos. Los resultados obtenidos no han mostrado diferencias significativas entre la extracción convencional y la extracción con pretratamiento.

En las longitudes de onda donde se han obtenido respuesta, 280 y 520 nm se han observado diferentes picos cuyos espectros no coincidían con los espectros de los patrones que se poseían. Para la longitud de onda de 280 nm, donde se aprecian los polifenoles, se ha observado en el barrido dos picos, por lo que se podría afirmar la presencia de dos especies fenólicas. Uno de ellos ocupa un 66% del área formada y el otro un 11%. El espectro de la sustancia que genera el pico de mayor área se observa en la Ilustración 10. Comparando dicho espectro con otros espectros encontrados en la bibliografía de especies fenólicas se cree que la especie a la que puede caracterizar es el Kaempferol.

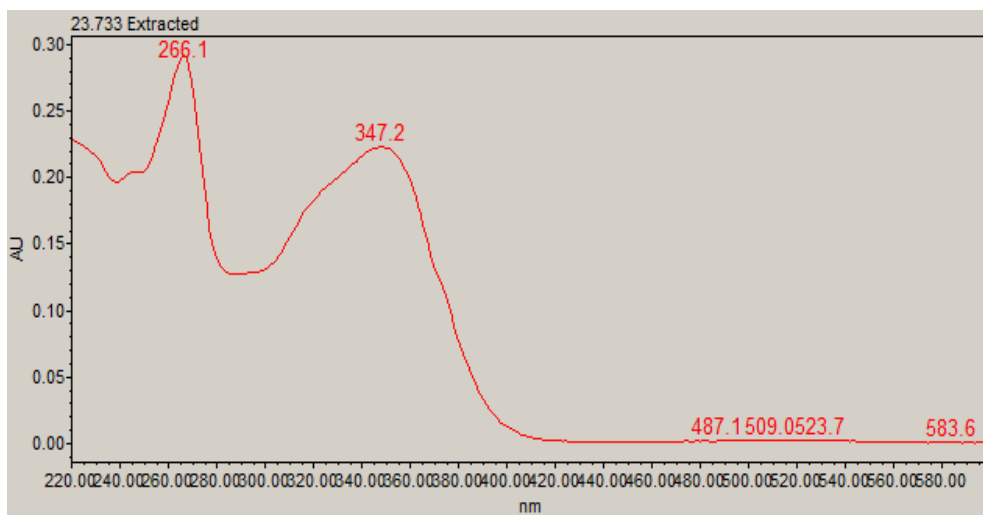


Ilustración 10. Espectro de una la especie fenólica más abundante en el extracto

En la longitud de 520 nm se pueden identificar las antocianinas. En el barrido realizado se aprecian 3 picos, correspondientes a diferentes antocianinas. Entre estos 3 picos, uno posee una mayor área por lo que se determina una alta cantidad de dicho compuesto. El porcentaje del área de cada antocianina es de 80%, 8% y 8%, para esa longitud de onda. La antocianina con un área del 80% está caracterizada por el espectro mostrado en la Ilustración 11. Al igual que ocurre con los polifenoles presentes, no se disponía de un patrón que correspondiera a dicho espectro. Sin embargo, según datos bibliográficos se cree que la antocianina a la que corresponde dicho espectro es la delfinidina, antocianina presente en otro tipo de flores que otorga colores azules.

La obtención de un extracto tan rico en uno de los compuestos como la antocianina citada anteriormente, permite que mediante técnicas de separación obtener el compuesto puro, lo que permitiría obtener un pigmento natural con tonalidades azuladas.



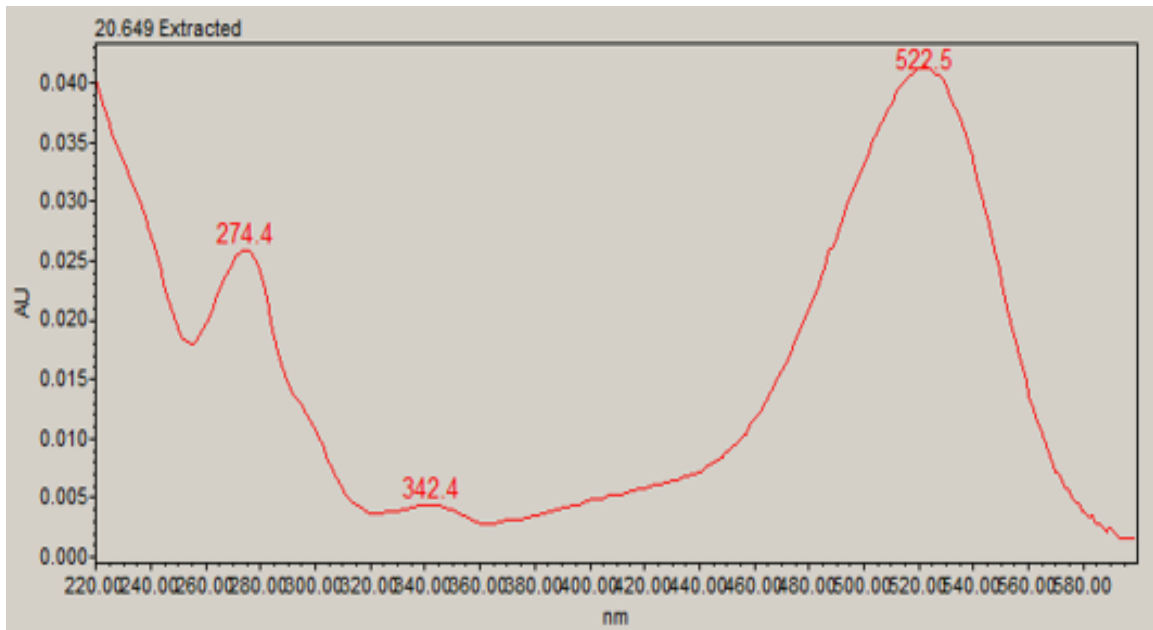


Ilustración 1.1. Espectro de antocianina más abundante en el extracto



# CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES



## 4. CONCLUSIONES

Los procesos de extracción llevados a cabo mediante una extracción con pretratamiento previo de microondas han tenido una baja repetitividad. Este problema se debe a que la materia prima con la que se ha trabajado es una materia prima natural que no tiene una composición fija, mostrando importantes variaciones según la muestra seleccionada.

La realización de estas extracciones con pretratamiento ha permitido observar como no se producen grandes cambios en cuanto a la riqueza del producto final, tanto de antocianinas como de compuestos fenólicos. Sin embargo, la adición de este pretratamiento sí que supone una gran disminución del tiempo de extracción. Se ha observado como para la extracción tanto de antocianinas como de polifenoles se alcanza un máximo rendimiento en apenas 45 minutos, apreciando a los 10 minutos concentraciones altas, mientras que en las extracciones convencionales este tiempo alcanzaba las 3 horas.

La caracterización del extracto ha permitido conocer el alto contenido de una especie de antocianinas presente en él, presumiblemente la delfinidina. El disponer de un concentrado tan elevado de una antocianina puede ser de gran interés de cara a su aislamiento para ser utilizada como un colorante azulado natural, de gran demanda en la actualidad.



# CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA





## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, M., Ashraf, B., Gani, A., & Gani, A. (2018). Microencapsulation of saffron anthocyanins using  $\beta$  glucan and  $\beta$  cyclodextrin: Microcapsule characterization, release behaviour & antioxidant potential during in-vitro digestion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 435–442.  
<http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.122>
- Albarado, J., & Aguilera, J. (2001). Métodos para medir propiedades físicas en industrias de alimentos. Zaragoza: Acribia.
- Almodóvar, P., Prodanov, M., & Arruñada, O. (2018). Saffron eye, a natural extract of saffron (*Crocus sativus* L.) with colorant properties as novel replacer of saffron stigmas in culinary and food. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 12(August 2017), 1–5.  
<http://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2018.03.001>
- Álvarez, A., Poejo, J., Matias, A. A., Duarte, C. M. M., Cocero, M. J., & Mato, R. B. (2017). Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on antioxidant bioactivity. *Food and Bioprocess Technology*, 106(2015), 162–170.  
<http://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.09.007>
- Andrew L. Waterhouse. (2002). Determination of Total Phenolics (pp. 1–8).
- Araújo, P., Basílio, N., Azevedo, J., Fernandes, A., Mateus, N., Pina, F., ... Oliveira, J. (2018). Dyes and Pigments Colour modulation of blue anthocyanin-derivatives. Lignosulfonates as a tool to improve the water solubility of natural blue dyes. *Dyes and Pigments*, 153(December 2017), 150–159.  
<http://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.02.019>
- Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin – Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91(1). <http://doi.org/10.1016/j.microc.2008.08.011>
- Jafari, S. M., Mahdavi-Khazaei, K., & Hemmati-Kakhki, A. (2016). Microencapsulation of saffron petal anthocyanins with cress seed gum

- compared with Arabic gum through freeze drying. *Carbohydrate Polymers*, 140, 20–25. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.079>
- Kaur, G., Jabbar, Z., Athar, M., & Alam, M. S. (2006). Punica granatum (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 44(7), 984–993. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2005.12.001>
- Lotfi, L., Kalbasi-ashtari, A., & Hamedi, M. (2015). ScienceDirect Effects of enzymatic extraction on anthocyanins yield of saffron tepals ( *Crocus sativus* ) along with its color properties and structural stability. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(2), 210–218. <http://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.10.011>
- Mahdavee Khazaei, K., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Hemmati Kakhki, A. (2014). Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate Polymers*, 105(1), 57–62. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.042>
- Marie, A., & Building, C. (2007). Simultaneous microwave-assisted solid – liquid extraction of polar and nonpolar compounds from alperujo, 2, 82–88. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2007.09.008>
- Reagents, C., Principle, A., Apparatus, B., & Determination, E. (2006). pH 1.0 buffer (potassium chloride, 0.025M), 2005–2006.
- Sant'Anna, V., Gurak, P. D., Ferreira Marczak, L. D., & Tessaro, I. C. (2013). Tracking bioactive compounds with colour changes in foods - A review. *Dyes and Pigments*, 98(3), 601–608. <http://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.04.011>
- Segneanu, A. E., Orbeci, C., Lazau, C., Sfirloaga, P., Vlazan, P., Bandas, C., & Grozescu, I. (2013). We are IntechOpen , the first native scientific publisher of Open Access books TOP 1 % Waste Water Treatment Methods. *Web of Science*, 29. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/46845>
- Serrano-Díaz, J., Estevan, C., Sogorb, M. Á., Carmona, M., Alonso, G. L., & Vilanova, E. (2014). Cytotoxic effect against 3T3 fibroblasts cells of saffron floral bio-residues extracts. *Food Chemistry*, 147, 55–59. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.130>

- Serrano-Díaz, J., Sánchez, A. M., Martínez-Tomé, M., Winterhalter, P., & Alonso, G. L. (2013). A contribution to nutritional studies on *Crocus sativus* flowers and their value as food. *Journal of Food Composition and Analysis*, *31*(1), 101–108. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.03.009>
- Sólyom, K., Mato, R. B., Pérez-elvira, S. I., & Cocero, M. J. (2011). Bioresource Technology The influence of the energy absorbed from microwave pretreatment on biogas production from secondary wastewater sludge, *102*, 10849–10854. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.052>
- Sólyom, K., Solá, R., Cocero, M. J., & Mato, R. B. (2014). Thermal degradation of grape marc polyphenols. *Food Chemistry*, *159*, 361–366. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.021>
- Zeka, K., Ruparelía, K. C., Continenza, M. A., Stagos, D., Vegliò, F., & Arroo, R. R. J. (2015). Petals of *Crocus sativus* L. as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol. *Fitoterapia*, *107*, 128–134. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.05.014>



## NOMENCLATURA

**$\epsilon$** : coeficiente de extinción molar

**A**: Absorbancia

**AC**: antocianinas

**C**: concentración en un tiempo t.

**C<sub>0</sub>**: concentración inicial

**C<sub>∞</sub>**: concentración en un tiempo infinito

**C.** : experimento convencional

**C<sub>f</sub>**: concentración final

**C<sub>AC</sub>**: concentración de antocianinas

**CGE**: equivalentes de cianidina-3-glucósido

**DF**: factor de dilución

**H**: humedad

**HPLC**: cromatografía líquida de alta eficacia

**GAE**: equivalentes de ácido gálico

**k**: ratio constante expresado en min<sup>-1</sup>

**M.** : experimento con pretratamiento de microondas

**M<sub>m</sub>**: peso molecular

**m<sub>v</sub>**: masa vial

**m<sub>v+rh</sub>**: masa de vial y flores húmedas

**m<sub>v+rs</sub>**: masa de flores secas y vial

**N**: normalidad

**ORAC**: capacidad de absorción de los radicales de oxígeno

**ppm**: partes por millón

**RS:** residuo seco

**S:L :** relación sólido:líquido

**T<sup>a</sup>:** temperatura

**T<sup>a</sup> amb:** temperatura ambiente

**T<sub>x</sub>:** transmitancia para cada una de las longitudes de onda necesarias para calcular la coordenada x.

**T<sub>y</sub>:** transmitancia para cada una de las longitudes de onda necesarias para calcular la coordenada y.

**T<sub>z</sub>:** transmitancia para cada una de las longitudes de onda necesarias para calcular la coordenada z.

**TPC:** compuestos polifenólicos totales

**t:** tiempo

**U<sub>0</sub>:** velocidad inicial de extracción

**UV/VIS:** espectro ultravioleta-visible

**V:** volumen

**v/v:** porcentaje en volumen

# ANEXOS





## ANEXO 1.

La siguiente tabla muestra las longitudes de onda a las que se ha tomado el valor de la transmitancia para poder determinar las coordenadas en la medida del color.

Tabla 24. Longitudes de onda para la determinación de coordenadas XYZ

X	Y	Z
<b>Longitud de onda (nm)</b>		
663,0	647,4	511,2
645,9	627,3	495,2
636,6	616,1	487,2
629,8	607,7	481,8
624,2	600,8	477,7
619,4	594,8	474,3
615	589,6	471,4
610,9	584,8	468,7
607,0	580,4	466,3
603,3	576,4	464,1
599,6	572,5	462,0
596,0	568,9	459,9
592,4	565,3	457,9
588,7	561,9	455,9
585,0	558,5	454,0
581,3	555,1	452,1
577,4	551,8	450,1
573,2	548,4	448,2
568,9	544,9	446,3
564,1	541,4	444,4
558,7	537,7	442,5
552,4	533,9	440,6
544,3	529,8	438,6
531,2	525,4	436,5
474,0	520,6	434,3
461,2	515,2	432,0
452,1	508,7	429,4
443,9	500,4	426,3
435,5	489,5	422,2
424,4	465,9	414,1