

# XLIV JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA TIERRA DE BARROS

IV Congreso Agroalimentario de Extremadura

CENTRO UNIVERSITARIO SANTA ANA ALMENDRALEJO



Del 3 al 6 de Mayo 2022

XLIV JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA  
DE LA TIERRA DE BARROS  
IV CONGRESO AGROALIMENTARIO DE EXTREMADURA

**Edita:**

Centro Universitario Santa Ana  
C/ IX Marqués de la Encomienda, nº 2  
Almendralejo  
Tel. 924 661 689  
<http://www.univsantana.com>

**Colabora:** Cajalmendralejo

**Ilustración de portada:**

© ALBERTO CATILLO

**Diseño original:**

Tecnigraf S.A.

**Maquetación:** Virginia Pedrero

ISBN: 978-84-7930-112-0

D.L.:

Imprime: Impresal

# Desarrollo y optimización de la extracción individual y simultánea de compuestos bioactivos (TPC y TA) en aronia negra

VÁZQUEZ-ESPINOSA, M.

GONZÁLEZ-DE-PEREDO, A.V.

CARRERA, C.

ESPADA-BELLIDO, E.

PALMA, M.

BARBERO, G.F.

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz,  
Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), IVAGRO, 11510 Puerto  
Real, Cádiz, España.

## RESUMEN

Hoy en día, se ha producido un aumento en el interés por el consumo de aronia negra (*Aronia melanocarpa* L.), gracias a su gran cantidad de compuestos de interés biológico, lo que le proporciona un alto valor nutricional con propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias. Debido a que este fruto ha comenzado a comercializarse recientemente, no existen descritas en la bibliografía técnicas de extracción y análisis exhaustivas específicamente desarrolladas. En este trabajo, se ha optimizado un método de extracción asistido por ultrasonidos

de compuestos fenólicos y antocianinas, no solo por separado sino también de forma simultánea. La respuesta múltiple ha demostrado un nivel de efectividad similar a las individuales, lo que supone una reducción considerable de costes, tiempo y trabajo. Las condiciones óptimas para extraer ambas familias de compuestos de forma conjunta fueron: 54% de metanol en agua a pH 2,72 y temperatura de 69,4 °C, 70% de amplitud, un ciclo de 0,7 s y una relación muestra/ disolvente de 0,5:18,2 g:mL. Los métodos desarrollados mostraron un alto nivel de precisión con coeficientes de variación inferiores al 5%. Finalmente, se aplicaron con éxito a muestras comerciales elaboradas a partir de aronia negra.

**Palabras claves:** antocianinas, compuestos fenólicos, *aronia melanocarpa*, análisis agroalimentario, optimización de múltiples respuestas, extracción asistida por ultrasonidos.

#### ABSTRACT

Nowadays, there has been an increase in the interest of the black chokeberry consumption (*Aronia melanocarpa* L.), thanks to their large amount of compounds of biological interest, which provides it a high nutritional value with antioxidant, anti-cancer and anti-inflammatory properties. Due to the fact that this fruit has recently begun to be commercialized, there are no specifically developed exhaustive extraction and analysis techniques described in the literature. In this work, an ultrasound-assisted extraction method of phenolic compounds and anthocyanins has been optimized, not only separately but also simultaneously. The multiple response has shown a level of effectiveness similar to the individual ones, which represents a considerable reduction in costs, time and work. The optimal conditions to extract both families of compounds at the same time were: 54% metanol in water at pH 2.72 and a temperature of 69.4 °C, 70% amplitude, a cycle of 0.7 s and a sample/solvent ratio of 0.5:18.2 g:mL. The developed methods showed a high level of precision with coefficients of variation lower than 5%. Finally, they were successfully applied to commercial samples made from chokeberry.

**Key words:** anthocyanins, phenolic compounds, *aronia melanocarpa*, agrifood analysis, multiple response optimization, ultrasound-assisted extraction.

## 1. INTRODUCCIÓN

La aronia negra (*Aronia melanocarpa* L.) es un arbusto caducifolio de 0,5 a 3 m de altura, perteneciente a la familia de las Rosáceas, que se encuentra en las selvas tropicales templadas. Es originaria de América del Norte, aunque recientemente ha habido un creciente interés por su cultivo en Europa del Este y Asia [1]. Produce pequeñas bayas oscuras, similares a las cerezas, que crecen en racimos. Se cosecha mejor entre agosto y septiembre, cuando exhibe sus extraordinarios beneficios para la salud [2].

Actualmente es conocida por la gran cantidad de propiedades beneficiosas que se le atribuyen, siendo una de las frutas con mayor contenido en compuestos de interés biológico, destacando los compuestos fenólicos (TPC) y las antocianinas (TA), responsables de su color tan intenso, pudiendo ser utilizado como colorante alimentario para hacer más atractivo algún producto [3]. Sin embargo, poseen un cierto nivel de amargor y astringencia, lo que hace que rara vez se consuman de forma directa como fruta fresca, sino que se procesan como mermeladas, jaleas, jarabes de frutas, jugos o bebidas energéticas [4].

Dicho contenido de compuestos fenólicos es superior al de otras frutas conocidas como la guayaba, el kiwi, el pomelo, la papaya, el aguacate o la uva, entre otras [5]. Su alto contenido en compuestos bioactivos y su composición nutricional parecen ser los responsables de la amplia gama de potenciales efectos medicinales y terapéuticos de sus frutos, con propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, antimutagénicas o antivirales. También tienen un papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad o cáncer de colon [6,7]. Además, esta planta y sus extractos se están utilizando como conservantes de alimentos gracias a la inhibición de la peroxidasa lipídica [8]. Esto ha provocado un crecimiento exponencial en la industria de productos elaborados con aronia y se recomienda su abundante consumo en las pautas dietéticas de todo el mundo.

La extracción es un paso crucial en la industria farmacéutica, alimentaria y de control de calidad para el aislamiento y separación de los compuestos bioactivos de interés de la matriz sólida y no existe un método único y estándar [9]. Por lo tanto, se requieren métodos rápidos y fiables para la extracción de dichos compuestos beneficiosos. La eficiencia de extracción está influenciada por varios factores, como el tipo y la polaridad del disol-

vente, la relación muestra-disolvente, la temperatura, el pH o el tiempo, entre otros, y que deben optimizarse para reducir los costos del proceso [10]. En la actualidad existe una demanda creciente de técnicas de extracción verdes, gracias a sus ventajas como la sencillez, mayor eficiencia y rendimiento; además de tratarse de técnicas más ecológicas, respetuosas con el medio ambiente, rápidas, que reducen el consumo de disolvente y energía y garantizan un alto rendimiento y calidad del extracto [11]. En concreto, se empleó la extracción asistida por ultrasonidos (UAE), que consisten en ondas de presión transmitidas por la materia a través de ciclos de compresión y expansión. Las burbujas al colapsar, liberan grandes cantidades de energía, rompiendo las paredes celulares de la matriz vegetal y liberando los analitos de interés [12].

La influencia de los factores en la extracción de compuestos individuales de las frutas ya ha sido bien estudiada [13,14], pero la optimización de múltiples respuestas simultáneamente aún no ha sido investigada en profundidad. Este aspecto podría ser relevante para los laboratorios analíticos y de control de calidad con respecto al ahorro de costes, energía y trabajo de laboratorio. Para ello, se utilizó la función de deseabilidad, que convierte las respuestas múltiples en una sola, la cual posteriormente, es optimizada [15].

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y optimizar dos métodos separados para la extracción de TPC y TA, respectivamente, y un nuevo método para la extracción simultánea de ambas familias de compuestos de interés. Las condiciones específicas que maximizan la extracción de ambos, TPC y TA, se compararon con las de la extracción por separado de cada compuesto.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Como material biológico se han utilizado bayas de aronia crudas y deshidratadas procedentes de la agricultura ecológica NaturGreen (Murcia, España). La muestra fue liofilizada, triturada con un molinillo eléctrico convencional y conservada en una cámara congeladora a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La UAE se llevó a cabo con una sonda UP 200S (Ultraschallprozessor Dr. Hielscher, GmbH, Berlín, Alemania), con la que se controla el ciclo y la amplitud. Esta sonda se encuentra acoplada a un baño termostático con control de temperatura (VWR, Radnor, PA, EEUU). Se pesaron unos 0,5 g de muestra en un tubo "Falcon" de 50 mL y se adicionó el volumen y tipo

de solvente correspondiente según el experimento. Se colocó dentro del vaso de doble pared a temperatura controlada, se introdujo la sonda en su interior, seleccionando la amplitud y el ciclo adecuados y se procedió a su extracción durante 10 minutos. Una vez terminada, tras alcanzar temperatura ambiente, el extracto se centrifugó dos veces durante 5 minutos a 5985g, transfiriendo el sobrenadante a un matraz aforado de 25 mL y enrasando con el mismo disolvente. Los factores optimizados, así como el rango empleado para cada uno de ellos se muestran en la Tabla 1.

Para optimizar el proceso de extracción se empleó un diseño de experimentos de Box-Behnken (BBD) con metodología de superficie de respuesta, que permite la reducción del número de experimentos a realizar, asegurando la máxima información sobre la respuesta del sistema. Además, permite el desarrollo de modelos matemáticos para estudiar la influencia de cada factor, así como sus interacciones, y evita la realización de experimentos en condiciones extremas [16].

Para la cuantificación de los TPC se empleó un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, CA, USA) y el procedimiento de Folin Ciocalteu modificado [17]. Consiste en agregar 250  $\mu$ L de muestra, filtrada con un filtro de jeringa de 0,45  $\mu$ m, 12,5 mL de agua destilada, 1,25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 5 mL de carbonato de sodio al 20% a un matraz aforado de 25 mL, enrasándolo finalmente con agua destilada.

La reacción entre los compuestos fenólicos de la muestra y el reactivo de Folin-Ciocalteu forma un complejo de color azul, que absorbe a un máximo de 765 nm y cuya intensidad de color depende de la proporción de estos compuestos. Debido a la cinética de extracción y la estabilidad del complejo formado, las muestras se mantuvieron en la oscuridad durante 30 min, tiempo necesario para la formación del complejo. Previamente se realizó una recta de calibrado, usando el mismo procedimiento y ácido gálico como estándar, preparando patrones de concentración conocida entre 1 y 1000 mg L<sup>-1</sup>. La recta de calibrado fue  $y = 0.00099x + 0.06311$ ,  $R^2 = 0.9999$ .

La separación y cuantificación de las antocianinas se realizó mediante un equipo de cromatografía Elite LaChrom Ultra System (VWR Hitachi, Tokio, Japón), que consta de un detector UV-Vis L-2420U configurado a 520 nm, un horno de columna L-2300 trabajando a 50 °C, un automuestreador L-2200U, dos bombas L-2160U y una columna Fused-Core C18 en fase reversa (Phenomenex Kinetex, CoreShell Technology, Torrance, CA, EEUU,

2,1 x 100 mm, 2,6  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula). Para la separación cromatográfica se empleó agua Milli-Q acidificada al 5% con ácido fórmico como disolvente A y metanol puro como disolvente B, a un flujo de 0,7 mL  $\text{min}^{-1}$ , una temperatura de 50 °C, un volumen de inyección de 15  $\mu\text{L}$  y el siguiente gradiente: 0.0 min, 15% B; 0,5 min, 25% B; 2,0 min, 25% B; 3,3 min, 30% B; 4,8 min, 40% B; 5,4 min, 55% B; 5,9 min, 60% B; 6,6 min, 95% B; 9,3 minutos, 95% B; 10,0 min, 15% B; 12,0 min, 15% B. Estas son las condiciones óptimas obtenidas tras la optimización del método cromatográfico con la finalidad de conseguir la separación más efectiva de las antocianinas, es decir, la mayor resolución en el menor tiempo posible. Los extractos de aronia negra se filtraron con un filtro de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$  antes de ser inyectados. Para la cuantificación, se realizó una recta de calibrado utilizando cloruro de cianidina como estándar de referencia y preparando patrones de concentración conocida entre 0.1 y 29  $\text{mg L}^{-1}$  ( $y = 262231.56x + 2460.24$ ,  $\text{LOD} = 0.186 \text{ mg L}^{-1}$  y  $\text{LOQ} = 0,620 \text{ mg L}^{-1}$ ). Asumiendo que las diferentes antocianinas tienen absorbancias similares y teniendo en cuenta sus pesos moleculares individuales, se preparó una curva de calibración para cuantificar cada antocianina. Los resultados se expresaron como suma de antocianinas individuales.

La idoneidad de los métodos de extracción desarrollados y optimizados se aplicaron a una serie de muestras comerciales elaboradas con aronia negra en diferentes formatos (polvo, cápsulas y aronia cruda deshidratada).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Optimización del método de extracción individual de TPC

Tras realizar la matriz de 54 experimentos indicada en el BBD para la optimización de los 6 factores, el análisis de la varianza (ANOVA) indica que el modelo explica el 80.80% de la variabilidad total. Las variables e interacciones con  $p$ -valor inferior a 0,05 se consideran significativamente influyentes en la respuesta con un nivel de confianza del 95% (Tabla 2). Concretamente fueron el porcentaje de metanol, la temperatura, la amplitud y las interacciones cuadráticas MeOH-MeOH y amplitud-amplitud. Teniendo en cuenta únicamente estas variables, se obtuvo la ecuación polinómica de segundo orden reducida, que permite predecir de forma fiable los resultados experimentales:



Compuestos fenólicos totales =

$$24,7014 + 3,7671 \text{ MeOH} + 2,7221 \text{ Temperatura} + 1,7705 \text{ Amplitud} \\ -6,2810 \text{ MeOH}^2 + 2,768 \text{ Amplitud}^2.$$

Los resultados se representaron gráficamente mediante un diagrama de Pareto (Figura 1). En este caso, la longitud de cada barra es proporcional al valor absoluto de su efecto estandarizado asociado. La línea vertical representa el límite estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95%. Los factores que superan esta línea de referencia se consideran significativos. El signo positivo o negativo hace referencia a una relación directa o inversa entre cada factor o interacción y la respuesta. Teniendo todo esto en cuenta, se observa la misma información mencionada anteriormente en el ANOVA. Además, los tres factores más influyentes en la respuesta tuvieron un efecto positivo, es decir, un aumento de los mismos favorece la recuperación de TPC en el extracto.

Las condiciones óptimas para la extracción de TPC mediante UAE fueron: 58% de metanol a pH 3,87, una temperatura de 70 °C, una amplitud del 70% del total (200 W), un ciclo de 0,7 s y una relación muestra/disolvente de 0,5:17 g:mL. La concentración media total de TPC en el extracto de aronia obtenido en estas condiciones óptimas fue de 38,057 mg g<sup>-1</sup>.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de extracción, se estudió el tiempo óptimo de extracción. Las extracciones se realizaron por duplicado en períodos que oscilaron entre 2 y 30 min (Figura 2). A partir de los 5 minutos no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Por esta razón, se seleccionó este valor como tiempo óptimo, ya que supone un gran ahorro en cuestiones de tiempo de análisis. Finalmente, bajo estas condiciones, se estudió la precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia, obteniendo como resultados coeficientes de variación de 3,44% y 3,98%, respectivamente, siendo inferior en ambos casos al 5%, que se considera el límite para afirmar que un método es preciso en este tipo de ensayos [18].

### 3.2. Optimización del método de extracción individual de TA

Se realizó un tratamiento estadístico similar para las antocianinas totales presentes en la aronia (Tabla 3). En este caso, el análisis explicó el 93,78% de la variabilidad total, lo que muestra una alta concordancia entre las respuestas medidas y estimadas. Las variables influyentes a un nivel de confianza del 95%, aquellas que presentaron un *p*-valor inferior a 0,05 fueron: porcentaje de metanol, temperatura, amplitud, ciclo, pH y las interacciones MeOH-MeOH, temperatura-temperatura y MeOH-temperatura. Estos efectos e interacciones se muestran en la ecuación polinómica de segundo orden reducida, que proporciona resultados similares a los obtenidos con la ecuación completa:

$$\text{Antocianinas totales} = 0,1941 - 0,0371 \text{ MeOH} + 0,0331 \text{ Temperatura} + 0,0152 \text{ Amplitud} + 0,0223$$

$$\text{Ciclo} - 0,0121 \text{ pH} - 0,0616 \text{ MeOH}^2 - 0,0167 \text{ MeOH} \cdot \text{Temperatura} + 0,0194 \text{ Temperatura}^2$$

Al igual que antes, estos resultados se pueden representar gráficamente mediante el diagrama de Pareto (Figura 3). Cabe destacar que el porcentaje de metanol y la temperatura tuvieron un efecto más relevante sobre la respuesta en comparación con los demás factores. La temperatura, el ciclo y la amplitud influyeron positivamente, es decir, un aumento de estos valores favorece la recuperación de TA. Por el contrario, el porcentaje de metanol y pH tuvieron un efecto negativo.

Tras el correspondiente tratamiento estadístico de los datos, las condiciones óptimas para la extracción de TA mediante UAE fueron: 34% de metanol a pH 2, una temperatura de 70 °C, una amplitud del 70% del total (200 W), un ciclo de 0,7 s y una relación muestra/disolvente de 0,5:13,5 g:mL. La concentración media total de TA en el extracto de aronia obtenido en estas condiciones óptimas fue de 0,305 mg g<sup>-1</sup>.

En la Figura 4, se observa que el tiempo óptimo de extracción fue de 15 minutos, no observándose diferencias significativas a tiempos mayores. Finalmente, bajo estas condiciones, se estudió la precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia, obteniendo coeficientes de variación de 3,12% y 3,42%, respectivamente, siendo inferior en ambos casos al 5% que se considera el límite para afirmar que un método es preciso en este tipo de ensayos [18].

### 3.3. Discusión sobre cada variable que influye en la extracción

La polaridad del disolvente de extracción es uno de los aspectos críticos en la eficiencia de la extracción [19]. Normalmente, se utiliza agua pura combinada con otros disolventes orgánicos. Se ha informado que el metanol inhibe la actividad de las polifenol oxidasas y, de esta manera, reduce la degradación fenólica [20]. Además, se utilizaron disolventes acidificados debido a su mayor estabilidad y capacidad de extracción a valores bajos de pH [21]. Se puede observar como óptimo un valor intermedio del intervalo, que viene determinado tanto por las características del disolvente como por la polaridad de los TPC y TA presentes en la aronia [22]. En el caso de TA, se puede ver un porcentaje de metanol algo inferior, lo que indica que las antocianinas son ligeramente más polares que los compuestos fenólicos [23].

La temperatura también ha tenido una influencia notable, por lo que su control es de gran importancia a la hora de extraer los compuestos bioactivos de los frutos [24]. Se puede observar que, a mayor temperatura, mayor cantidad de compuestos extraídos. Una temperatura elevada reduce la viscosidad del disolvente y mejora su penetración, aumentando así el rendimiento de extracción. Además, provoca el debilitamiento de los enlaces que mantienen unidos a los compuestos, lo que a su vez facilita la desorción y aumenta su velocidad de difusión [25]. A pesar de obtener el valor máximo del intervalo, no se consideró trabajar a un nivel de temperatura superior, ya que el metanol se puede evaporar. Además, las altas temperaturas pueden provocar la degradación y fragmentación de los compuestos de interés [26].

Se ha demostrado que la amplitud también juega un papel importante en la efectividad del proceso de extracción. A medida que ésta aumenta, aumenta el número de ciclos de compresión y expansión de la onda ultrasónica y, como consecuencia, dicha onda se administra de forma más eficaz. Así, una mayor amplitud induce un efecto de cavitación más intenso y mejora el proceso de extracción [27]. Sin embargo, no se recomiendan valores superiores al 70% ya que se pueden producir salpicaduras y perderse parte del extracto. Además, tras una búsqueda bibliográfica, se encontró que no hubo diferencias significativas al emplear amplitudes más altas [28]. En cuanto al pH, no es recomendable el uso de disolventes a un pH inferior a 2, ya que podría ocurrir la hidrólisis ácida de los compuestos fenólicos [29].

Finalmente, en cuanto al volumen de disolvente empleado, se han obtenido valores más cercanos al extremo superior del intervalo. Una menor cantidad de muestra en un mayor volumen de disolvente (mayor variación de concentración) resultó en un mayor gradiente  $\gamma$ , por lo tanto, una mayor extracción, favorecida por la transferencia de masa [30].

### **3.4. Optimización del método de extracción simultánea de TPC y TA**

Tras el correspondiente tratamiento estadístico de los datos, se obtuvieron las condiciones óptimas para maximizar la extracción simultánea de ambas familias de compuestos (Tabla 4).

Al realizar la optimización de múltiples respuestas, la concentración de TPC y TA que se puede extraer es ligeramente inferior a la que se obtiene en la optimización individual. Sin embargo, no se observan diferencias significativas, lo que permite afirmar que se pueden aplicar las condiciones optimizadas para la extracción simultánea en lugar de dos condiciones de extracción por separado para cada uno de ellos, con el consiguiente ahorro de tiempo y costes.

Respecto a los factores analizados, resaltar que el porcentaje de metanol es más próximo al obtenido para los compuestos fenólicos que para las antocianinas; mientras que la temperatura, amplitud y ciclo tomaron exactamente los mismos valores que para cada extracción individual. El pH toma un valor intermedio a los obtenidos en las optimizaciones simples. Finalmente, el volumen de disolvente fue ligeramente superior al utilizado para la extracción de cada compuesto biológico específico.

Al igual que antes, se hicieron ensayos de repetibilidad y precisión intermedia, obteniendo valores de 4,16% y 4,37% para compuestos fenólicos y 3,20% y 3,73% para antocianinas, respectivamente, lo que pone de manifiesto que se trata de un método bastante preciso con coeficientes de variación inferiores al 5% en todos los casos.

### **3.5. Aplicación a muestras reales**

Se evaluó la idoneidad de los nuevos métodos de UAE desarrollados, tanto en las condiciones de extracción individuales como simultáneas, a cuatro muestras comerciales de aronia negra. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado y los resultados se muestran en la Tabla 5, donde se describe cada muestra.

S3 mostró la mayor cantidad de TPC y TA. S1 y S4 tenían una concentración muy similar de compuestos fenólicos. En S1, la mayoría de los compuestos fueron antocianinas, mientras que S4 tuvo un bajo contenido de este tipo de compuestos. Esto puede deberse al hecho de que se trata de aronia seca y una gran cantidad de antocianinas pudieron haberse degradado durante el proceso de secado [31]. También puede deberse a la composición de la matriz inicial. La muestra S1 fue una muestra liofilizada comercializada en forma de polvo, mientras que la muestra S4 consistía en granos de aronia previamente liofilizados en un laboratorio. La concentración más baja de compuestos fenólicos se puede observar en S2. Esta muestra también ha sido sometida a un tratamiento térmico, lo que puede provocar la degradación de parte de los compuestos.

Cuando se implementaron las condiciones óptimas para maximizar la extracción de ambos tipos de compuestos, los resultados fueron similares a los obtenidos al aplicar las condiciones individuales optimizadas para cada familia de compuestos biológicos, es decir, se observó la misma tendencia en las distintas muestras analizadas. Esto apoyaría el uso de este método de extracción simultánea para ahorrar tiempo, costes y trabajo de laboratorio.

#### 4. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que la UAE en condiciones óptimas puede considerarse un método eficaz, sencillo y rápido para la extracción de compuestos antioxidantes presentes en la aronia negra. Este estudio destaca el enorme potencial del desarrollo de un método de extracción simultánea de TPC y TA, ya que no muestra diferencias significativas con respecto a cada método desarrollado para la extracción individual de cada familia de compuestos, lo que supone importantes ahorros en tiempo, costes y trabajo. Además, todos los métodos desarrollados mostraron alta precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia, con coeficientes de variación inferiores al 5%. Las variables que mostraron una mayor influencia sobre la respuesta fueron el porcentaje de metanol y la temperatura.

Finalmente, se ha demostrado con éxito la aplicabilidad de los métodos desarrollados para la extracción y cuantificación de los compuestos de interés (por separado y conjuntamente) a varias muestras comerciales que contienen aronia negra.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al IVAGRO por brindar las facilidades necesarias para llevar a cabo la investigación y a la Universidad de Cádiz por el apoyo brindado a través del proyecto OT2016/046.

## BIBLIOGRAFÍA

1. LEE, J.E.; KIM, G.S.; PARK, S.; KIM, Y.H.; KIM, M.B.; LEE, W.S.; JEONG, S.W.; LEE, S.J.; JIN, J.S.; SHIN, S.C., "Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity", *Food Chemistry*, 146, 2014, 1-5.
2. JURIKOVA, T.; MLCEK, J.; SKROVANKOVA, S.; SUMCZYNSKI, D.; SOCHOR, J.; HLAVACOVA, I.; SNOPEK, L.; ORSAVOVA, J., "Fruits of black chokeberry *Aronia melanocarpa* in the prevention of chronic diseases", *Molecules*, 22, 2017, 944.
3. JAKOBEK, L.; DRENJANČEVIĆ, M.; JUKIĆ, C.V.; SERUGA, M., "Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of 'Nero', 'Viking', 'Galicianka' and wild chokeberries", *Scientia Horticulturae*, 147, 2012, 56-63.
4. OSZMIAŃSKI, J.; LACHOWICZ, S., "Effect of the production of dried fruits and juice from chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the content and antioxidative activity of bioactive compounds", *Molecules*, 21, 2016, 1098.
5. FU, L.; XU, B.T.; XU, X.R.; GAN, R.Y.; ZHANG, Y.; XIA, E.Q.; LI, H.B., "Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits", *Food Chemistry*, 129, 2011, 345-350.
6. SAMOTICHA, J.; WOJDYLO, A.; LECH, K., "The influence of different drying methods on chemical composition and antioxidant activity in chokeberries", *LWT Food Science and Technology*, 66, 2016, 484-489.
7. ZAPOLSKA-DOWNAR, D.; BRYK, D.; MALECKI, M.; HAJDUKIEWICZ, K.; SITKIEWICZ, D., "*Aronia melanocarpa* fruit extract exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells", *European Journal of Nutrition*, 51, 2012, 563-572.

8. CVETANOVIĆ, A.; ŠVARC-GAJIĆ, J.; ZEKOVIĆ, Z.; MAŠKOVIĆ, P.; DUROVIĆ, S.; ZENING, G.; DELERUE-MATOS, C.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; JAKŠIĆ, A., "Chemical and biological insights on aronia extracts obtained by different extraction techniques: From wastes to functional products", *The Journal of Supercritical Fluids*, 128, 2017, 173-181.
9. BUCIC-KOJIC, A.; PLANINIC, M.; TOMAS, S.; BILIC, M.; VELIC, D., "Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds", *Journal of Food Engineering*, 81, 2007, 236-242.
10. YANG, Q.Q.; GAN, R.Y.; GE, Y.Y.; ZHANG, D.; CORKE, H., "Ultrasonic treatment increases extraction rate of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) antioxidants", *Antioxidants*, 8, 2019, 83.
11. CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; MEULLEMIESTRE, A.; TURK, M.; PERINO, S.; FABIANO-TIXIER, A.S.; ABERT-VIAN, M., "Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41, 2017, 357-377.
12. CHEMAT, F.; KHAN, M.K., "Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction", *Ultrasonic Sonochemistry*, 18, 2011, 813-835.
13. ANDRADE, S.C.; GUINÉ, R.P.F.; GONÇALVEZ, F.J.A., "Evaluation of phenolic compounds, antioxidant activity and bioaccessibility in White crowberry (*Corema album*)", *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11, 2017, 1936-1946.
14. VÁZQUEZ-ESPINOSA, M.; GONZÁLEZ-DE-PEREDO, A.V.; ESPADA-BELLIDO, E.; FERREIRO-GONZÁLEZ, M.; CARRERA, C.; PALMA, M.; BARROSO, C.G.; BARBERO, G.F., "Optimization of microwave-assisted extraction for the recovery of bioactive compounds from the Chilean Superfruit (*Aristotelia chilensis*)", *Agronomy*, 8, 2018, 240.
15. VERA CANDIOTI, L.; DE ZAN, M.M.; CÁMARA, M.S.; GOICOECHEA, H.C., "Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development", *Talanta*, 124, 2014, 123-138.

16. WATSON, M.; LONG, H.; LU, B., "Investigation of wrinkling failure mechanics in metal spinning by Box-Behnken design of experiments using finite elemental method", *The International Journal of Advanced Manufacturing*, 78, 2015, 981-995.
17. SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A., "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents", *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 1965, 144-158.
18. AOAC (Ed.) AOAC Peer Verified Methods Program. In A International, Manual on Policies and Procedures; Maryland: Arlinght VA, USA, 1998.
19. OOSTHUIZEN, D.; GOOSEN, N.J.; STANDER, M.A.; IBRAHIM, A.D.; PEDAVOACH, M.M.; USMAN, G.O.; ADERINOLA, T., "Solvent extraction of polyphenolics from the indigenous African fruit *Ximenia caffra* and characterization by LC-HRMS", *Antioxidants*, 7, 2018, 103.
20. VAJIĆ, U.J.; GRUJIĆ-MILANOVIĆ, J.; ZIVKOVIĆ, J.; SAVIKIN, K.; GODEVAC, D.; MILORADOVIĆ-STANOJEVIC, N., "Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology", *Industrial Crops Product*, 74, 2015, 912-917.
21. KALT, W.; MCDONALD, J.E.; DONNER, H., "Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products", *Food Chemistry*, 65, 2000, 390-393.
22. SU, X.; XU, J.; RHODES, D.; SHEN, Y.; SONG, W.; KATZ, B.; TOMICH, J.; WANG, W., "Identification and quantification of anthocyanins in transgenic purple tomato", *Food Chemistry*, 202, 2016, 184-188.
23. KULLING, S.E.; RAWEL, H.M., "Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects", *Planta Medica*, 74, 2008, 1625-1634.
24. PATRAS, A.; BRUNTON, N.P.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B.K., "Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods: mechanisms and kinetics of degradation", *Trends in Food Science and Technology*, 21, 2010, 3-11.



25. VÁZQUEZ-ESPINOSA, M.; GONZÁLEZ-DE-PEREDO, A.V.; FERREIRO-GONZÁLEZ, M.; CARRERA, C.; PALMA, M.; BARBERO, G.F.; ESPADA-BELLIDO, E., "Assessment of ultrasound assisted extraction as an alternative method for the extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from Maqui Berries (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz)", *Agronomy*, 9, 2019, 148.
26. LIANFU, Z.; ZELONG, L., "Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic extraction (UAE) of lycopene from tomatoes", *Ultrasonic Sonochemistry*, 15, 2008, 731-737.
27. SHARAYEL, P.; AZARPAZHOOH, E.; ZOMORODI, S.; RAMASWAMY, H.S., "Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel", *LWT Food Science and Technology*, 101, 2019, 342-350.
28. CARRERA, C.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G., "Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes", *Analytica Chimica Acta*, 732, 2012, 100-104.
29. CASTAÑEDA-OVANDO, A.; DE LOURDES PACHECO-HERNÁNDEZ, M.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M.E.; RODRÍGUEZ, J.A.; GALÁN-VIDAL, C.A., "Chemical studies of anthocyanins: A review", *Food Chemistry*, 113, 2009, 859-871.
30. GARCÍA-VALCÁRCEL, A.I.; TADEO, J.L., "Fast ultrasound-assisted extraction combined with LC-MS/MS of perfluorinated compounds in manure", *Journal of Separation Science*, 36, 2013, 2507-2513.
31. LEE, J.; DURST, R.W.; WROLSTAD, R.E., "Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: Comparison of two pretreatments", *Food Chemistry*, 67, 2002, 1660-1667.

## TABLAS Y FIGURAS

**Tabla 1:** Rango de las variables de estudio para las experiencias del diseño en UAE.

| FACTOR                      | VALORES                 |
|-----------------------------|-------------------------|
| MeOH (%)                    | 25 - 50 - 75            |
| Temperatura (°C)            | 10 - 40 - 70            |
| Amplitud (%)                | 30 - 50 - 70            |
| Ciclo                       | 0,2 - 0,45 - 0,7        |
| pH                          | 2 - 4,5 - 7             |
| Ratio (g mL <sup>-1</sup> ) | 0,5:10- 0,5:15 - 0,5:20 |

**Tabla 2:** Análisis de la varianza (ANOVA) para compuestos fenólicos totales (TPC).

| EFEECTO                 | COEFICIENTE ESTIMADO | <i>p</i> -VALOR |
|-------------------------|----------------------|-----------------|
| MeOH                    | 3,7671               | 0,0000          |
| Temperatura             | 2,7221               | 0,0008          |
| Amplitud                | 1,7705               | 0,0207          |
| Ciclo                   | 0,7091               | 0,3328          |
| pH                      | -1,0841              | 0,1434          |
| Ratio                   | -0,0772              | 0,9153          |
| MeOH-MeOH               | -6,2810              | 0,0000          |
| MeOH-Temperatura        | -0,2556              | 0,8389          |
| MeOH-Amplitud           | -0,0607              | 0,9615          |
| MeOH-Ciclo              | -0,0741              | 0,9335          |
| MeOH-pH                 | -1,5354              | 0,2283          |
| MeOH-Ratio              | 0,9888               | 0,4340          |
| Temperatura-Temperatura | 1,4981               | 0,1839          |
| Temperatura-Amplitud    | 0,9282               | 0,4624          |
| Temperatura-Ciclo       | -0,7275              | 0,5638          |
| Temperatura-pH          | 0,4708               | 0,5972          |
| Temperatura-Ratio       | 1,3344               | 0,2934          |
| Amplitud-Amplitud       | 2,7683               | 0,0181          |
| Amplitud-Ciclo          | 0,8617               | 0,4948          |
| Amplitud-pH             | 1,1837               | 0,3502          |
| Amplitud-Ratio          | -0,4697              | 0,5980          |
| Ciclo-Ciclo             | 1,7305               | 0,1269          |
| Ciclo-pH                | -0,6086              | 0,6288          |
| Ciclo-Ratio             | 1,0368               | 0,4123          |
| pH-pH                   | -1,8673              | 0,1008          |
| pH-Ratio                | -1,7954              | 0,1610          |
| Ratio-Ratio             | -1,6375              | 0,1477          |

**Tabla 3:** Análisis de la varianza (ANOVA) para antocianinas totales (TA).

| EFEECTO                 | COEFICIENTE ESTIMADO | <i>p</i> -VALOR |
|-------------------------|----------------------|-----------------|
| MeOH                    | -0,0371              | 0,0000          |
| Temperatura             | 0,0331               | 0,0000          |
| Amplitud                | 0,0152               | 0,0009          |
| Ciclo                   | 0,0223               | 0,0000          |
| pH                      | -0,0121              | 0,0061          |
| Ratio                   | -0,0075              | 0,0772          |
| MeOH-MeOH               | -0,0616              | 0,0000          |
| MeOH-Temperatura        | -0,0167              | 0,0249          |
| MeOH-Amplitud           | -0,0076              | 0,2888          |
| MeOH-Ciclo              | -0,0074              | 0,1475          |
| MeOH-pH                 | -0,0046              | 0,5212          |
| MeOH-Ratio              | 0,0111               | 0,1259          |
| Temperatura-Temperatura | 0,0194               | 0,0043          |
| Temperatura-Amplitud    | -0,0041              | 0,5650          |
| Temperatura-Ciclo       | -0,0046              | 0,5194          |
| Temperatura-pH          | 0,0067               | 0,1867          |
| Temperatura-Ratio       | 0,0083               | 0,2474          |
| Amplitud-Amplitud       | 0,0070               | 0,2717          |
| Amplitud-Ciclo          | 0,0119               | 0,1016          |
| Amplitud-pH             | -0,0010              | 0,8824          |
| Amplitud-Ratio          | -0,0094              | 0,0695          |
| Ciclo-Ciclo             | -0,0010              | 0,8736          |
| Ciclo-pH                | -0,0062              | 0,3880          |
| Ciclo-Ratio             | 0,0050               | 0,4810          |
| pH-pH                   | 0,0001               | 0,9900          |
| pH-Ratio                | 0,0025               | 0,7230          |
| Ratio-Ratio             | -0,0036              | 0,5613          |

**Tabla 4:** Comparativa de las condiciones óptimas de extracción de compuesto fenólicos y antocianinas mediante UAE usando la optimización individual y múltiple.

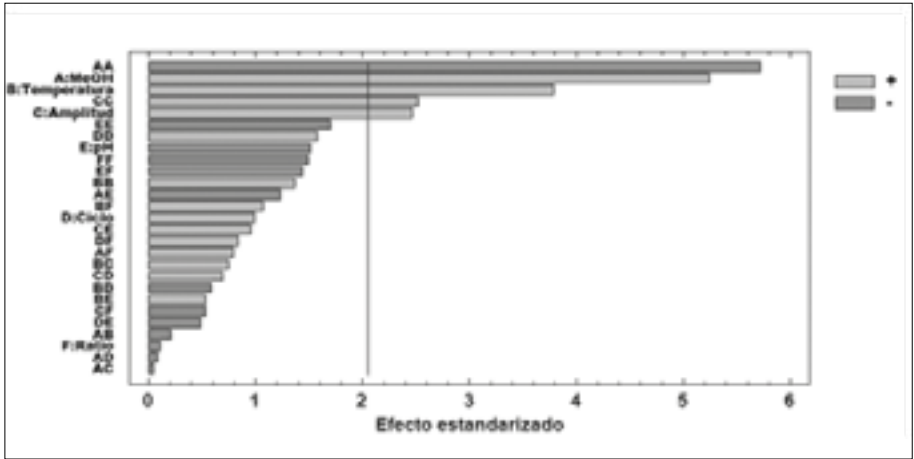
| Factor   | Compuestos fenólicos totales | Antocianinas totales | Compuestos fenólicos totales + Antocianinas totales |
|--|------------------------------|----------------------|---|
| MeOH (%)   | 58                           | 34                   | 54  |
| Temperatura (°C)                                       | 70                           | 70                   | 70  |
| Amplitud (%)   | 70                           | 70                   | 70  |
| Ciclo  | 0,7                          | 0,7                  | 0,7   |
| pH   | 3,87                         | 2                    | 2,72  |
| Ratio (mL)   | 0,5:17                       | 0,5:13,5             | 0,5:18,2  |
| Cantidad óptima extraída teórica (mg g <sup>-1</sup> ) | 38,159                       | 0,325                | 37,823 + 0,283                                      |

**Tabla 5:** Cuantificación de los compuestos bioactivos (compuestos fenólicos y antocianinas totales) ( $n = 3$ ) en muestras comerciales de aronia negra empleando las condiciones óptimas.

| Muestras comerciales de Aronia negra    | Compuestos fenólicos totales (mg g <sup>-1</sup> ) | Antocianinas totales (mg g <sup>-1</sup> ) | Respuesta múltiple de ambos compuestos (mg g <sup>-1</sup> ) TPC/TA |
|---|--|--|---|
| S1: Aronia liofilizada en polvo         | 34,9415 <sup>a</sup>                               | 23,2470 <sup>b</sup>                       | 32,6105 <sup>a</sup> / 21,9845 <sup>b</sup>                         |
| S2: Aronia cruda deshidratada           | 13,4554 <sup>a</sup>                               | 2,5728 <sup>b</sup>                        | 12,0526 <sup>a</sup> / 2,1902 <sup>b</sup>                          |
| S3: Cápsulas de aronia                  | 51,1829 <sup>a</sup>                               | 26,9411 <sup>b</sup>                       | 50,6458 <sup>a</sup> / 24,0754 <sup>b</sup>                         |
| S4: granos de aronia cruda deshidratada | 37,1157 <sup>a</sup>                               | 0,2982 <sup>b</sup>                        | 35,4224 <sup>a</sup> / 0,2856 <sup>b</sup>                          |

<sup>a,b</sup> La presencia de letras iguales en la misma fila indica que no hay diferencia significativa según el Test de Tuckey.

**Figura 1:** Diagrama de Pareto para compuestos fenólicos totales (TPC).



**Figura 2:** Concentración de compuestos fenólicos totales frente al tiempo de extracción.

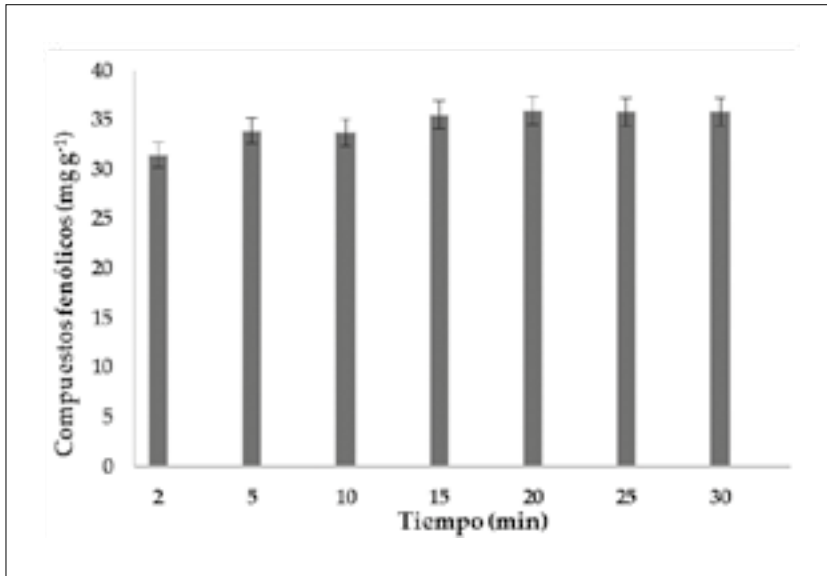


Figura 3: Diagrama de Pareto para antocianinas totales (TA).

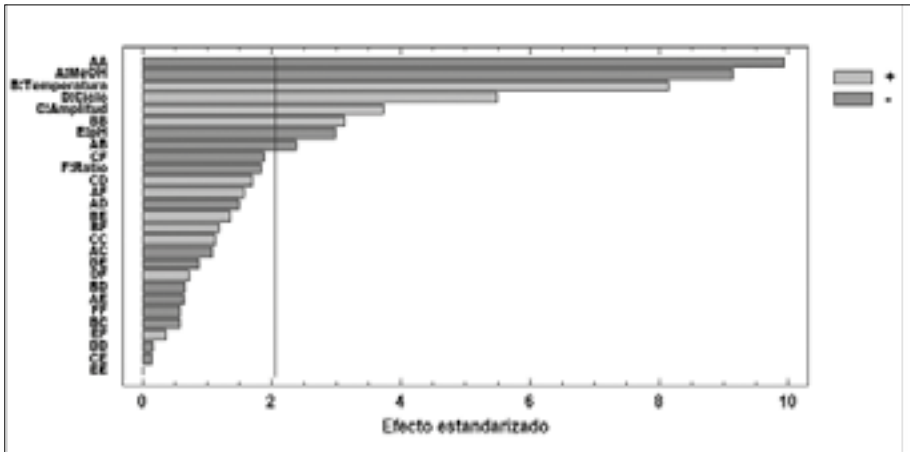


Figura 4: Concentración de antocianinas totales frente al tiempo de extracción.

